



Eficàcia dels desinfectants de l'aigua sobre *Legionella* spp. i les seves amebes hostes

Efficiency of water disinfectants against *Legionella* spp. and their amoeba hosts

Silvia Cervero Aragó

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) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (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) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) 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 o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (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 and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) 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 nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those 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.

TESI DOCTORAL / *THESIS*

**EFICÀCIA DELS DESINFECTANTS DE L'AIGUA SOBRE *LEGIONELLA* SPP. I LES
SEVES AMEBES HOSTES**

***EFFICIENCY OF WATER DISINFECTANTS AGAINST LEGIONELLA SPP. AND
THEIR AMOEBA HOSTS***

Memoria presentada per Sílvia Cervero Aragó per obtenir el grau de Doctor per la
Universitat de Barcelona

*Memory presented by Sílvia Cervero Aragó to obtain the degree of Doctor by the
University of Barcelona*

Tesi realitzada sota la supervisió de la Dra. Rosa M^a Araujo i Boira (Professora titular)
al Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

*Thesis supervised by Dr. Rosa M^a Araujo i Boira (Professor) in the Department of
Microbiology, Faculty of Biology, University of Barcelona.*

Director/a,
Supervisor,

Autor/a,
Author,

Rosa M^a Araujo i Boira

Sílvia Cervero Aragó



Rosa M^a Araujo i Boira, Professor of Microbiology at the University of Barcelona

DECLARES THAT:

Sílvia Cervero Aragó has performed the work entitled “Efficiency of water disinfectants against *Legionella* spp. and their amoeba hosts” under my direction in order to obtain the degree of Doctor by the University of Barcelona and that this thesis fulfills the requirements to obtain the “European Doctor” mention. This work is ready to be presented from the present day.

Signature,

Rosa M^a Araujo i Boira

Barcelona, 20 de Setembre de 2013

**A la meva família,
i en especial,
a l'avi**

AGRAÏMENTS

I per fi ja la tenim aquí, la TESI!!! Poques lletres per una gran paraula. La tesi, segons el diccionari de la llengua catalana és una dissertació escrita sobre un tema l'estudi del qual comporta un treball d'investigació i d'aportació personal, presentada per l'aspirant al títol acadèmic de doctor a la corresponent facultat universitària.

Doncs aquí estem, tècnicament ja la hem escrit, hi hem treballat molt (moltíssim!! encara no em crec que estigui escrivint això) però sobretot hi hem fet aportacions personals, on cadascú ha posat el seu granet de sorra o una muntanya sencera calgués o no. Perquè no oblidem una cosa, la tesi, aquesta tesi porta el meu nom, jo la defenso, però tota aquesta feina no hagués estat possible sense la col·laboració d'un munt de persones i és en aquest apartat on es parla d'això, de persones. D'aquestes persones que d'alguna manera o altra m'han acompanyat i sobretot aguantat i ajudat durant tots aquests anys a la realització de la tesi que teniu a les mans. Així que intentaré no fer-me massa pesada i no deixar-me a ningú, si ho faig (qualsevol d'ambdues coses) ja em perdonareu.

En primer lloc, m'agradaria agrair a la Dra. Rosa M^a Araujo i Boira la oportunitat de formar part del seu grup d'investigació. Encara recordo quan ho vas preguntar a classe! Gràcies per creure i apostar per mi, perquè amb les notes que tenia ho hagués fet poca gent. I en especial, per introduir-me al món de la investigació, on hem jugat a fer ciència, però sobretot ens hem fet un tip de treballar i aprendre. Per tot això, i moltes altres coses, moltes gràcies Rosa.

M'agradaria també agrair efusivament a dues persones sense les quals aquesta tesi no s'hagués pogut realitzar i que probablement no ho sàpiguen ni elles mateixes, són en Tomàs Company i en Josep Pérez, els Responsables del Servei de Manteniment del Parc Científic de Barcelona. Ells sempre han cregut en la bona feina realitzada pel nostre grup tot i els maldecaps que suposaven les nostres trucades d'alerta. El més sincer agraïment.

Al Dr. Humbert Savadó i al seu equip, l'Oriol Canals (el titi de les amebes ninja) i la Carme (la chica DAPI) del Departament de Biologia Animal. Gràcies per compartir el vostre coneixement sobre el món de les amebes i deixar que me l'apropriï amb tota la barra del món. Gràcies pels vostres consells, les xerrades als passadissos i per deixar-me potinejar el microscopi de fluorescència!

A les Araujos, amb la Rosa al capdavant, l'Alejandra i la Sarah les meves mestres jedi. A l'Ale per descobrir-me alguns dels secrets i trucs per vèncer al món legionelloide, i a la Sari

amb qui me n'aniria a l'altra banda del món a treballar (i de festa) sense dubtar-ho un segon. Algú a qui admiro per la seva energia, vitalitat, constància i força (entre moltes altres coses), i perquè se que sempre podré comptar amb ella. Orgullosament "simplys but elegants" som el duo dinàmic de l'Hospi!!! Saps que la meitat d'aquesta tesi és teva. I juntament amb elles als Araujitos, tota aquesta gent que ha passat pel nostre petit grup i amb qui també he compartit grans moments, com la Iraidins, amb la seva màgia, dolçor i sobretot la sensació de pau que contagia; i en pol oposat la superCarmina, la terratrèmol més sexy del Departament, gràcies per aquest cop de mà i posar una mica d'ordre al lab, que ja li calia!. A en Toni (el petit chef, un cop de mà d'última hora que sempre agrairé), en Jordi, la Mariona, la Yaiza, gràcies nois per la vostra paciència i aguantar-me com a mestra, sé que no sóc fàcil!!!

Parlant de paciència...vull agrair molt, moltíssim als meus companys de lab, el LAB 8, perquè tot i ser uns sapastres i intentar-me intoxicar amb olors vàries (musclos, pipis, aigües residuals, etc.) ha estat un luxe compartir tots aquests anys amb vosaltres!!! Us trobaré molt a faltar!!! Des dels Rosinots viejunos, la Pili, en Charlie, en Néstor amb qui vaig estar al començament als Rosinots més coetanis, l'Ayalke (assssuuuucar chiquito!!! Nunca dejes de sonreir), el Chus (el Xusman, su primavera trompetera y demás hits, com hem rigut!!!), el Byron (lo logramooooo, ya está echo!!!), l'Anna (déu salvi al GraphPad ;)), la Martus (i les xerrades de com trobar el nostre petit raconet al món, ni que sigui criant ovelles), la Laurus (a les barricades! la defensora dels pobres i els desvalguts), el Xavi (el maldito peluquero i mestre de la cultura trash); als Rosinots que s'estan fent un lloc, la Tecles (un diamant en brut, cuideu-la!!!) i la Pèrsia (el neguit d'ulls blaus). Tampoc m'oblidaré els Rosinots temporals que han anat passant i amb qui ens hem internacionalitzat, el trio carioca, la Marizze, la Celia i en especial l'Adriana (que saudades camundonga!!!). Bofill no m'he oblidat de tu! Segueix llegint....

A la gent de Fase II, als veïns usurpadors dels UV del lab 7, i als marsos, a la gent del lab 9, la superRachi (una amor i la companya ideal de fricades), la Marus (marica! Se't troba a faltar mamita) i la Júlia (gracias por echarme una mano con el poster :)); a l'Arnau (es muy bien que hagas marxat a Yale! I el seu humor tant català, se t'enyora!), la Laura que ha agafat el relleu amb empena i la Eli i la Cris, grans!!! dues lluitadores nates! A les nenes del 10 i als galls del corral, jejejeje no se si han de tenir més paciència ells amb elles o al revés, gràcies pel vostre bon humor gent, Martes, l'Anna, la Míriam petita i l'Àlex.

Dra. Agulló-Barceló, no me n'havia oblidat de tu!!! Mira que hem fet l'animal, eh?! Hi ha molts documents gràfics que ho demostren....Perquè juntament amb la Bofill o Bòfill, som el

trio maravilles, les capgrosses p*****. I amb el forofo com si fos el batmòbil i els Mumford and Sons de banda sonora hem arreglat el món unes quantes vegades, hem cotillejat molt, participat de força caravanes i sobretot hem fet molta, molta teràpia. Gràcies ties, de debò! Grans consells i grans persones.

A la gent de la resta del Departament, als professors titulars com la Rosina i la Maite, al Xavi Méndez, a la gent de les reunions de responsables, i en especial a la gent de Secretaria. La Rosario, la Bea, la Macu, la Susana i el Manolo. Moltíssimes gràcies.

I would also want to thank the people of the Wasser Hygiene Group, at the Medical University of Vienna. In special, Dr. Regina Sommer, a great scientist but even a better person, one of the most generous person i've ever met who shared with me her knowledge about UV, science and life matters in general. Vielen dank für alles!!!

I would also want to thank Dr. Alex Kirschner and Dr. Julia Walochnik for their suggestions and advices and for letting me use the microscopes. Of course i won't forget the rest of the group, Sonja S., Steffan, Rolland, Marion, Elisabeth, Christa, Susie, Angelika, Andrea, and specially Sonja K. Vielen dank for made me feel like home and took care of me, because jointly with Sonja (my flatmate) Georg, René, Gabi, etc. you all are the reason why every time i think about Vienna i smile ☺. Genau!

Però apart de la gent del curro, la que s'ha acostumat a veure'm amb bata blanca, aquesta tesi tampoc hagués sigut com és sense la ajuda i col·laboració de molta altra gent, els incondicionals que m'han donat ànims per continuar sense molts cops saber ben bé com ajudar-me. En primer lloc a l'Anna, a qui li dec més d'un viatge i més d'una aventura!! Moltes gràcies per la paciència, espero poder-ho compensar algun dia!!!

Al meu grup de teràpia setmanal, als meus "amigüitos" dels dimecres al migdia amb qui sense adonar-te'n pots estar parlant de mosques tot un dinar. Biofrikis sí, i què??!!!, el Pietru, la Lais, la Senda, la Gemmeta i les meravelloses incorporacions, el Montons i el Pin. Per quan la propera??

A la gran tropa química, que m'ha acollit i adoptat com una més!!! Gràcies gent pels grans momentazos als Gallifes Summer Festivals i les mostres de suport en aquests últims mesos!! Ah! I sobretot gràcies als caballeros de la pensión Loli amb qui he descobert el que fardes fent servir una gran hendedura, compteu amb la destrala pel que faci falta!! ;)

Als maresmencs lliures i tropicals, l'Abel, en Víctor, la Núria, la Verdipedia i en Jose, quanta paciència (moltíssimes gràcies!!!!). Als Capgrossos, l'Elisenda, en Dani, en Paco, l'Àngels, i

a la colla en general, perquè descarregar la torre de nou amb folre i manilles a Vilafranca va ser una experiència inoblidable i gràcies a vosaltres la integració a Mataró va ser molt i molt fàcil. Ens veiem a les places!!! I com no podia ser d'altra manera, Glòria a les Santes!!!!

A la família, els més incondicionals de tots. Als que faci el que faci els hi semblarà bé i seran allà per recollir-me si alguna cosa falla. Als pares, al Pauix i a les tropes Cerveros i Aragós, i en especial a l'avi perquè crec que li faria il·lusió veure'm acabar la tesi i compartir aquest dia amb mi i sobretot perquè crec que és el culpable principal de que a mi m'agradi la biologia.

Finalment a tu tofeta, perquè sense tu no hagués pujat ni el Canigó, ni l'Aneto, ni el Toubkal, ni la Tesi, el cim més alt de tots. Gràcies per ser al meu cantó i donar-me una empenyeta (o empenyassa) per no quedar-me enrere. Així qualsevol cosa és possible. Som un gran equip!!!

Resum de la tesi doctoral

Les infeccions causades per *Legionella* són un greu problema de salut pública al nostre país. La majoria de casos esporàdics i de brots epidèmics es relacionen amb aigües de consum que han estat sotmeses a un o més processos de desinfecció. Tot i això, *Legionella* spp. no només és capaç de sobreviure a aquests tractaments sinó que es multiplica al llarg dels sistemes de distribució convertint-se en un risc ambiental.

Els principals factors que afavoreixen la supervivència i multiplicació de *Legionella* als sistemes d'aigua resideixen en la pròpia biologia del bacteri, que ha demostrat en moltes ocasions ser resistent a condicions físico-químiques extremes, així com les interrelacions que estableix amb altres microorganismes com els protozous, amb els que comparteix hàbitat. Els protozous, i en concret les amebes de vida lliure dels gèneres *Acanthamoeba* o *Hartmannella* s'han descrit en els últims anys com habitants freqüents dels sistemes de distribució d'aigua. Aquestes sobreviuen a condicions adverses mitjançant la formació d'estructures de resistència anomenades cists. La font nutricional de les amebes són els bacteris els qual fagocita i digereix. Tot i això, alguns d'aquests bacteris han desenvolupat estratègies per sobreviure la digestió amebiana i no sols això sinó que com en el cas de *Legionella*, poden fins i tot aprofitar els recursos cèl·lula hoste per multiplicar-se. A més, en estat endosimbiòtic *Legionella* queda protegida de l'efecte de desinfectants fet que podria originar una ràpida recolonització dels sistemes d'aigua un cop acabats els tractaments de desinfecció.

Tres dels desinfectants més utilitzats a nivell europeu per tractar l'aigua de consum són el clor, la temperatura i la radiació UV. Tot i que el seu ús està regulat en nombroses normatives estatals, aquestes s'apliquen sense tenir en compte les amebes de vida lliure i les interrelacions que aquestes poden tenir amb altres microorganismes. L'objectiu principal d'aquest treball va ser estudiar l'eficàcia d'aquests tres desinfectants de l'aigua aplicant les mateixes condicions d'estudi sobre *Legionella* spp.; amebes de vida lliure en els dos estats de vida, trofozoïts i cists; i sobre els simbiòtics que estableixen *Legionella* i *Acanthamoeba*.

En primer lloc es van obtenir soques de *Legionella* spp., i amebes de vida lliure de diferents orígens, tant ambientals com de col·lecció i es van optimitzar els protocols de cultiu dels diferents microorganismes, especialment pel que fa a les amebes. A continuació es van posar a punt mètodes quantitius que ens permetessin comparar la viabilitat cel·lular després de cada tractament amb els tres desinfectants. I es van establir les condicions d'assaig per a cada un dels desinfectants. Finalment es van establir co-cultius per observar si l'associació entre *Legionella* i *Acanthamoeba* modificava d'alguna manera l'eficàcia dels desinfectants envers aquests dos microorganismes. La formació de co-cultius i el seu monitoreig mitjançant la

tècnica del FISH ens va permetre observar com la soca de *Legionella* passava d'un estat plactònic a un estat d'emdosimbiont a l'interior dels trofozoïts.

Analitzant la susceptibilitat de les diferents soques de *Legionella*, d'amebes de vida lliure, tan en estat de trofozoït com de cist, així com de *Legionella* com a endosimbiont d'*Acanthamoeba* per cadascun dels tractaments aplicats, es van proposar diferents models per descriure'n la cinètica d'inactivació. A partir d'aquí els resultats obtinguts es van comparar amb altres estudis publicats i se'n van extreure unes conclusions finals.

Els resultats mostraren que clor, temperatura i radiació UV tenen un efecte desinfectant diferent pel que fa a les diferents soques de *Legionella* i amebes de vida lliure. Les diferències observades entre els diferents tractaments poden ser atribuïbles a la concentració de desinfectant, el temps d'exposició i a les diferències intrínseques de cada soca per cada microorganisme utilitzat. Pel que fa a la susceptibilitat de les amebes, trofozoïts i cists es van comportar de maneres diferents, sent els trofozoïts més sensibles que els cists. Finalment, *L. pneumophila* va resultar ser més resistent als tractaments amb desinfectants aplicats associada a trofozoïts d'*Acanthamoeba* en comparació amb el bacteri en condicions axèniques. Per tant, a l'hora d'aplicar tractaments de desinfecció, cal tenir en compte la complexa ecologia de *Legionella* com a endosimbiont d'amebes perquè aquests siguin eficaços i evitar així processos de recolonització.

Summary of the thesis

Legionella infections are a serious problem which causes concern to health public services in our country. Despite all measures and controls realized, most sporadic cases and outbreaks have been related to drinking water systems that have been subjected to one or more disinfection processes. *Legionella* spp., not only survive these treatments but multiplied over the distribution system becoming a potential environmental hazard.

The main factors that promote *Legionella* survival and proliferation in water systems are the bacteria biology itself, since *Legionella* is able to survive under a wide range of environmental conditions, as well as the relationship that *Legionella* establishes with other microorganisms that live in the same habitat as protozoa. Protozoa, and specifically free-living amoebae of the genera *Acanthamoeba* and *Hartmannella* have been described as common inhabitants of drinking water distribution systems. These amoebae survive in front harsh environmental conditions by forming resistant structures called cysts. Amoebae feed mainly on bacteria which are engulfed by phagocytosis and digested intracellularly. However, some of these bacteria have developed some strategies to survive amoebae digestion and some of them, as *Legionella* are able to use host cellular resources to multiply within it. In addition, as an endosymbiont, *Legionella* remains protected from disinfectants which could lead to a rapid recolonization of water distribution systems once disinfection treatments have been applied.

Three of the most commonly used water disinfectants in Europe for drinking water treatment are chlorine, temperature and UV radiation. Although its use is regulated by many national guidelines, its efficacy relies mainly on bacterial inactivation without considering other microorganisms such as free living amoebae and its relationships with other microorganisms as *Legionella*. Therefore, the main objective of this work was to study the effectiveness of these three water disinfectants applying the same study conditions, on *Legionella* spp.; free-living amoebae considering its two life stages; and on the symbionts between *Legionella* and *Acanthamoeba*.

First of all, several strains of *Legionella* spp., and free-living amoebae from different origins (environmental and from culture collections) were obtained and culture protocols were optimized, especially for free-living amoebae. Second, test conditions were established for each of the disinfectants and a quantitative method was implemented in order to compare cell viability after every disinfection treatment. Finally, to see whether the association between *Legionella* and *Acanthamoeba* modifies the effectiveness of the three disinfectants towards

these two types of microorganisms, co-cultures of *Legionella* and *Acanthamoeba* were realized. Co-culture formation was monitored by using a FISH method, which led us observe how axenic *Legionella* changed to an intracellular state within *Acanthamoeba* trophozoites.

Analyzing the susceptibility of the *Legionella* spp. strains; free-living amoebae strains, either trophozoites and cysts stages; as well as *Legionella* as an *Acanthamoeba* endosymbiont, for each of the treatments applied, inactivation kinetics models were proposed. Results obtained were compared with studies published by other authors and final conclusions were considered.

Results showed that, chlorine, temperature and UV radiation have a disinfectant effect on the different *Legionella* strains used, as well as on free living amoebae. Differences on the disinfectant effect could be attributed to disinfectant concentration, exposure time and strain intrinsic characteristics. Regarding free living amoeba, trophozoites and cysts had a significantly different behaviour, being trophozoites more sensitive to disinfectants than cysts. Finally, *L. pneumophila* as and endosymbiont of amoeba strains showed a greater resistance to disinfectant compared with the axenic state. Because of that, when applying disinfections treatments, the complex ecology of *Legionella* as an amoeba endosymbiont should be considered in order to prevent a system recolonization.

Llista d'abreujaments:

AC	Abans de Crist
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AK	<i>Acanthamoeba queratitis</i>
ARB	<i>amoeba resisting bacteria</i>
ARN	Àcid ribonucleic
ATP	Trifosfat d'adenosina
BDOC	Carboni orgànic dissolt biodegradable
°C	Graus centígrads
Cl ⁻	Clorur
ClO ₂	Diòxid de clor
ClO ⁻	Hipoclorit
cm	Centímetre
COA	Carboni orgànic assimilable
COD	Carboni orgànic dissolt
CO ₂	Diòxid de carboni
COT	Carboni orgànic total
DC	Després de Crist
DBPs	<i>disinfection by-products</i>
<i>dot</i>	<i>deffective in organelle trafficking</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEUU	Estats Units d'Amèrica
EMB	Maduració endosomal bloquejada
EPOC	Enfermetat pulmonar obstructiva crònica
<i>et al.</i>	I col·laboradors
ETAP	Estació potabilitzadora d'aigua
etc.	Etcètera
ESGLI	<i>European Study Group for Legionella Infections</i>
eV	Electrovolts
EWGLI	<i>European Group for Legionella Infections</i>
Fe	Ferro
FLA	<i>Free-living amoeba</i>
GAC	<i>granular active carbon</i>
GAE	<i>granulomatous amebic encephalitis</i>
HAAs	Àcid holoacètic
HOCl	Àcid hipocloròs
HPC	<i>Heterotrophic plate counts</i>
<i>icm</i>	<i>intracellular multiplication</i>
J	Joule
kDa	Quilodaltons
L	Litre
Log	Logaritme
LP	<i>low pressure lamps</i>
LPS	Lipopolisacàrid
M	Molar, (mols/Litre)
MER	Microscopia electrònica de rastreig
MET	Microscopia electrònica de transmissió
m ²	Metre quadrat
m ³	Metres cúbics
µg	Microgram
µm	Micròmetre
µS	Microsiemen
mg	Miligram

min	Minuts
Mip	proteïna, <i>macrophage infectivity potentiator</i>
mL	Mililitre
MP	<i>medium pressure lamps</i>
NH ₄	Amoni
nm	Nanòmetres
NO ₂ ⁻	Nitrit
OMS	Organització Mundial de la Salut
PAM	<i>primary amebic meningoencephalitis</i>
pH	Potencial d'hidrogen
ppm	Parts per milió
RD	Real Decreto
RER	Reticle endoplasmàtic rugós
sg.	Serogrup
SO ₄ ⁻	Sulfat
Spp.	Espècies
THMs	Trihalometans
Ufc	Unitats formadores de colònia
UNE-EN	Una norma espanyola-European Norm
UNF	Unitats nefelomètriques
UV	Ultraviolada
UV-A	Radiació ultraviolada A
UV-B	Radiació ultraviolada B
UV-C	Radiació ultraviolada C
VBNC	Cèl·lula viable però no cultivable
W	Watts

ÍNDEX DE CONTINGUTS

AGRAÏMENTS / ACKNOWLEDGMENTS	7
Resum de la tesi doctoral	11
Summary of the thesis	13
Llista d'abreujaments	15
ÍNDEX DE CONTINGUTS	17
INTRODUCCIÓ	23
1. Aigua i societat	23
2. Antecedents històrics de l'aigua de consum	23
3. El cicle de l'aigua de consum	25
3.1 Abastament de l'aigua, de la natura a l'aixeta	26
3.1.1 Captació de l'aigua	26
3.1.2 Potabilització	26
3.1.3 Distribució de l'aigua potable	29
4. Microbiologia dels sistemes d'aigua potable	30
4.1 Risc microbiològic associat a l'aigua potable	32
5. <i>Legionella</i>	33
5.1 Ecologia de <i>Legionella</i>	34
5.1.1 Ecologia de <i>Legionella</i> com a endosimbiont d'amebes de vida lliure	37
5.2 Mecanismes de transmissió de <i>Legionella</i>	42
5.3 Infeccions causades per <i>Legionella</i> spp.	43
5.3.1 Malaltia del Legionari o pneumònia atípica	44
5.3.2 Febre de Pontiac	44
5.3.3 Síndrome extrapulmonar	45
5.4 Epidemiologia	45
5.5 Taxonomia	47
5.6 Morfologia i fisiologia	49
5.7 Mesures de control i prevenció de la legionel·losi	50
6. Amebes de vida lliure	52
6.1 Malalties associades a les amebes de vida lliure	54
6.2 El Gènere <i>Acanthamoeba</i>	55
6.3 El Gènere <i>Hartmannella</i> (<i>Vermamoeba</i>)	58
7. Tractaments de desinfecció de l'aigua	60
7.1 Mètode de desinfecció químic, la cloració	60
7.1.1 Efecte del clor sobre els microorganismes	63
7.1.2 Efecte del clor sobre <i>Legionella</i>	65
7.1.3 Efecte del clor sobre amebes de vida lliure	67
7.2 Desinfecció per tractament tèrmic	69
7.2.1 Efecte dels tractaments tèrmics sobre <i>Legionella</i>	70
7.2.2 Efecte dels tractaments tèrmics sobre FLA	73
7.3 Desinfecció per radiació ultraviolada	75
7.3.1 Efecte de la radiació UV sobre <i>Legionella</i>	83
7.3.2 Efecte de la radiació UV sobre les FLA	83
OBJECTIUS / OBJECTIVES	85

MATERIAL I MÈTODES MATERIAL AND METHODS	91
1. Microorganisms used in the study	93
1.1 <i>Legionella</i> spp. strains.....	93
1.2 Isolation of <i>Legionella</i> strains from the environment	93
1.3 Identification of <i>Legionella</i> strains.....	94
1.4 Other bacterial strains.....	96
1.5 Free-living amoebae (FLA) strains	96
1.6 Isolation of free-living amoebae strains from the environment	96
1.7 Identification of FLA strains	97
2. Preparation of test suspensions	98
2.1 Preparation of <i>Legionella</i> spp. suspensions.....	98
2.2 Preparation of FLA suspensions.....	98
2.2.1 Trophozoites suspensions.....	98
2.2.2 Cysts suspensions.....	99
3. Co-culture of <i>L. pneumophila</i> and <i>Acanthamoeba</i> strains.....	99
3.1 Release of <i>L. pneumophila</i> sg. 1 from the trofozoïtes of <i>Acanthamoeba</i>	100
4. Monitoring of co-cultures between <i>L. pneumophila</i> and <i>Acanthamoeba</i> trophozoites	100
4.1 Implementation of Fluorescent <i>in situ</i> hybridization.....	100
4.1.1 FISH of <i>L. pneumophila</i>	101
4.1.2 FISH of FLA	102
4.1.3 FISH used for <i>L. pneumophila</i> co-culture monitoring	102
5. Quantification of microorganisms	103
5.1 Quantification of <i>Legionella</i> spp.	103
5.1.1 By culture on BCYE agar plates	103
5.1.2 By molecular methods, real time PCR.....	103
5.2 Quantification of FLA by using the Most Probable Number method in agar plates.	104
5.3 Quantification of <i>L. pneumophila</i> associated with <i>Acanthamoeba</i> strains.....	104
6. Material and reagents used for disinfection treatments	104
6.1 Chlorine experiments	104
6.1.1 Matrix, material preparation and reagents used for chlorine exposure	104
6.1.2 Experimental protocol.....	105
6.1.3 Statistical data analysis	106
6.2 Thermal treatment	107
6.2.1 Matrix, material and reagents.....	107
6.2.2 Experimental protocol.....	107
6.2.3 Statistical analysis	108
6.3 UV irradiation experiments	108
6.3.1 Matrix and reagents.....	108
6.3.2 Description of the UV device.....	109
6.3.3 Experimental protocol.....	109
6.3.4 Statistical analysis	109
RESULTATS I DISCUSSIÓ / RESULTS AND DISCUSSION	111
CHAPTER 1, SETTING OF MATERIAL AND METHODS	113
1.1 Identification of <i>Legionella</i> strains.....	113
1.2 Identification of FLA strains	113
1.2.1 Identification of FLA species by morphology	113
1.2.2 FLA identification by sequencing.....	114
1.3 Co-cultures between <i>L. pneumophila</i> and <i>Acanthamoeba</i> trophozoites.....	114
1.3.1 Monitoring by culture	114
1.3.2 Monitoring by fluorescent <i>in situ</i> hybridization.....	115
1.3.2.1 FISH of <i>L. pneumophila</i>	115
1.3.2.2 FISH of FLA.....	116

1.3.2.3 FISH used for <i>L. pneumophila</i> association with <i>Acanthamoeba</i> trophozoites monitoring.....	117
1.4 Release of <i>L. pneumophila</i> from <i>Acanthamoeba</i> trophozoites.....	118
1.5 Quantification of microorganisms.....	120
1.5.1 Quantification of <i>Legionella</i> by qPCR.....	120
CHAPTER 2: RESULTS AND DISCUSSION CHLORINE TREATMENTS.....	125
2.1 RESULTS.....	125
2.1.1 Free chlorine effect on <i>L. pneumophila</i> sg. 1 strains	125
2.1.2 Inactivation kinetics of <i>L. pneumophila</i> sg. 1 strains in front free chlorine... ..	126
2.1.3 Free chlorine effect on <i>Acanthamoeba</i> spp.....	127
2.1.4 Inactivation kinetics of <i>Acanthamoeba</i> spp. by front sodium hypochlorite... ..	128
2.1.5 Free chlorine effect on <i>L. pneumophila</i> sg. 1 in association with <i>Acanthamoeba</i> spp.....	130
2.1.5.1 Effect on <i>L. pneumophila</i> sg. 1	130
2.1.5.2 Inactivation kinetics for <i>L. pneumophila</i> sg. 1 in association with <i>Acanthamoeba</i> spp.....	131
2.1.5.3 Effect on <i>Acanthamoeba</i> sp.....	133
2.1.5.4 Inactivation kinetics for <i>Acanthamoeba</i> sp.....	135
2.2 DISCUSSION	137
CHAPTER 3: RESULTS AND DISCUSSION THERMAL TREATMENTS.....	145
3.1 RESULTS.....	145
3.1.1 Thermal inactivation of <i>Legionella</i> spp. strains.....	145
3.1.2 Inactivation kinetics of <i>Legionella</i> spp. strains in front thermal treatments ..	147
3.1.3 Effect of thermal treatment on FLA strains	151
3.1.3.1 Effect of thermal treatment on trophozoites	151
3.1.3.2 Effect of thermal treatment on cysts.....	151
3.1.3.3 Inactivation kinetics of trophozoites in front thermal treatments	152
3.1.3.4 Inactivation kinetics of cysts in front thermal treatments.....	154
3.1.4 Effect of thermal treatment on <i>L. pneumophila</i> sg. 1 associated to <i>Acanthamoeba</i> strains	155
3.1.4.1 Effect of thermal treatment on <i>L. pneumophila</i> sg. 1	155
3.1.4.2 Inactivation kinetics of <i>L. pneumophila</i> sg. 1	156
3.1.4.3 Effect on <i>Acanthamoeba</i> sp associated to <i>L. pneumophila</i> sg. 1	159
3.2 DISCUSSION	161
CHAPTER 4: RESULTS AND DISCUSSION UV RADIATION TREATMENTS	171
4.1 RESULTS.....	171
4.1.1 UV inactivation of <i>Legionella</i> spp. strains.....	171
4.1.2 Inactivation kinetics of <i>Legionella</i> spp. strains in front UV irradiation.....	171
4.1.3 Effect of UV irradiation on FLA.....	173
4.1.3.1 Effect of UV irradiation on FLA strains in different life stages	173
4.1.3.2 UV inactivation of FLA strains	173
4.1.4 Inactivation kinetics of FLA strains in front UV irradiation.....	174
4.1.5 Effect of UV irradiation on <i>L. pneumophila</i> associated with <i>Acanthamoeba</i> strains	176
4.1.5.1 Effect of UV irradiation on <i>L. pneumophila</i>	176
4.1.5.2 Effect of UV irradiation on <i>Acanthamoeba</i> strains	177
4.2 DISCUSSION	179

CONCLUSIONS FINALS	187
FINAL CONCLUSIONS	190
REFERÈNCIES / REFERENCES	195
ANNEX, DETAILS OF REAGENTS AND MATERIAL USED	215

Aquesta tesi doctoral s'ha escrit seguint el format clàssic de tesi. Tot i això, algun dels resultats presentats aquí han estat sotmesos en revistes científiques del camp de la microbiologia ambiental per a la seva publicació, i està previst sotmetre'n més en un futur proper. D'acord amb els requisits exigits a la normativa per obtenir la menció europea, els idiomes escollits per realitzar aquesta memòria són el català i l'anglès. L'apartat de material i mètodes, els resultats i la discussió corresponent han estat redactats en anglès íntegrament mentre que la introducció, els objectius i les conclusions finals s'han escrit en ambdós idiomes.

This memory has been written following the classical memory model. However, some of the results presented here have been already submitted for publication to scientific journals of the environmental microbiology field, and is expected to submit more of these results soon. In accordance with the requirements for the Doctor European Mention, the chosen languages to write this memory are Catalan and English. Material and methods, results and the corresponding discussion have been written entirely in English while introduction, objectives and conclusions were written in both languages.

INTRODUCCIÓ

1. Aigua i societat

L'aigua és vida, aquesta expressió tot i que ha sigut utilitzada en els últims anys com a reclam publicitari de campanyes diverses és totalment certa, ja que totes les formes de vida del planeta en depenen d'alguna manera. En el cas de l'home, aquesta afirmació és encara més evident, ja que totes les civilitzacions conegudes fins ara s'han construït tenint en compte l'accessibilitat i l'ús de l'aigua.

Del 1900 al 2000 l'ús d'aigua dolça al món ha augmentat deu vegades. Des de la Organització Mundial de la salut (OMS) s'ha estimat que 20 litres d'aigua per càpita al dia representa la quantitat mínima d'aigua necessària per beure, cuinar i la higiene personal, mentre que 50 litres d'aigua per càpita i dia inclou a més una bugada i un bany (WHO 2006).

L'accessibilitat a l'aigua és important fins a tal punt que s'ha plantejat com un dels objectius del Mil·leni, abans de l'any 2015 s'hauria de reduir a la meitat el percentatge de gent al món que no té un accés sostenible a l'aigua potable.

Segons (Sobsey 2006), l'aigua potable exerceix una gran influència en la gent i les seves comunitats no només en termes de qualitat, quantitat, disponibilitat i accessibilitat de l'aigua sinó també en les seves creences socio-culturals, el comportament i la percepció del medi.

2. Antecedents històrics de l'aigua de consum

Des de l'inici dels temps l'accés a l'aigua i la qualitat d'aquesta ha anat lligada a l'evolució i el desenvolupament de les poblacions humanes al planeta. Ja, els primers assentaments humans creats al canviar de l'estil de vida caçador a la vida sedentària de recol·lectors s'establiren al voltant de fonts d'aigua, on garantir l'accés de l'assentament a l'aigua es convertia en un prerequisit per la prosperitat d'aquest (USEPA 2000). En aquells temps, les malalties transmeses a través dels recursos hídrics afectaven ocasionalment a aquestes poblacions que, sense saber-ne la causa real, evitaven el consum d'aigua estancada, de gust dolent i que feia pudor.

Milers d'anys més tard van aparèixer grans civilitzacions com la Grega (300AC-500DC) on la importància de l'aigua de beguda i els seus efectes sobre la salut va ser documentada pels filòsofs i metges de l'època. En aquests documents, es recollia també, una classificació de la qualitat de l'aigua examinada a través dels sentits: gust, olor, aparença i temperatura (Vuorinen *et al.* 2007).

Inventors del primer sistema integrat d'aigües, els Romans, van establir un sistema de canalitzacions al llarg del cicle de l'aigua des de la captació fins al rebuig, proporcionant una xarxa dual que portava l'aigua de fonts naturals per al seu consum i alhora descartava l'aigua residual i de pluja. Documents de l'època recullen que la qualitat de l'aigua procedent de brolladors naturals i pous era superior que l'obtinguda a partir d'aigües superficials, tot i que aquesta última si no s'utilitzava com a aigua de beguda es podia destinar a altres usos (Lofrano *et al.* 2010).

La creació de gran ciutats, tant gregues com romanes, va portar greus problemes de sanejament i tot i els avenços en infraestructures, documents de l'època afirmen que les malalties gastrointestinals eren una de les principals causes de mort. La qualitat de l'aigua era determinada organolèpticament i mètodes com la filtració a través de sorra o carbó, l'exposició a llum solar, l'ebullició o la decantació s'utilitzaven per millorar-ne les propietats.

Després de la caiguda de l'Imperi Romà, l'Edat Mitjana, va suposar un pas enrere en la gestió de l'aigua on la manca de sanejament va augmentar l'efecte de les epidèmies a les ciutats medievals europees. Durant el Renaixement, es van actualitzar molts dels coneixements adquirits durant èpoques passades envers l'aigua que conjuntament amb els canvis econòmics (capitalisme), socials (aparició de la burgesia) i tecnològics van promoure el salt de l'agricultura cap a la industrialització del món al segle XVIII.

Durant el 1700s i fins a mitjans dels 1800s la filtració de l'aigua es va establir com un mitjà efectiu per extreure'n les partícules en suspensió i millorar-ne la qualitat encara determinada organolèpticament (USEPA 2000).

No va ser fins l'any 1855 quan a arrel d'un brot de còlera a la ciutat de Londres, el Dr. John Snow va demostrar que l'origen del brot epidèmic era l'aigua d'una font pública contaminada amb aigua residual. Aquest descobriment juntament amb els estudis de científics com Louis Pasteur i Robert Koch on demostraven que els microorganismes eren els responsables de causar malalties van suposar un canvi de mentalitat en la percepció de les d'aquestes, relacionant de forma directa aigua i salut.

Des d'aleshores, es van produir grans canvis en les polítiques de qualitat de l'aigua on l'examen organolèptic de l'aigua es va complementar amb anàlisis microbiològics i químics per aconseguir una adequada qualitat de l'aigua. Al llarg del segle XIX, tota l'aigua subministrada a les ciutats europees i gran part de les americanes es passava per diferents processos de filtració, i a principis del segle XX es va instaurar la cloració sistemàtica de l'aigua com a mètode de desinfecció. Per exemple, l'any 1908, el clor es va utilitzar per primera vegada com un

desinfectant primari d'aigua potable a la ciutat de Jersey, New Jersey (EUA) (USEPA 2000). Tot i això, en alguns països com França també es van instaurar altres processos de desinfecció de l'aigua mitjançant gasos com l'ozó i la radiació ultraviolada (Lofrano *et al.* 2010).

3. El cicle de l'aigua de consum

Durant el segle XIX, la percepció social sobre la importància de disposar d'una aigua de qualitat va augmentar radicalment. Les noves polítiques de qualitat de l'aigua arreu del món han propulsat la redacció de recomanacions i normatives per millorar i garantir una aigua de consum segura, així com la creació de grans infraestructures que assegurin la potabilització i distribució d'aquesta a la població, sumat a una bona gestió ambiental de l'aigua residual.

Segons el Real Decreto 140/2003 espanyol per el que s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà, s'entén per aigua de consum humà (BOE 2003b):

- totes aquelles aigües, ja sigui en el seu estat original o després de ser tractades, utilitzades per beure, cuinar, preparar aliments, higiene personal i altres usos domèstics, sigui quin sigui el seu origen i independentment de que siguin subministrades al consumidor a través de xarxes de distribució públiques o privades, de cisternes, de dipòsits públics o privats.
- totes aquelles aigües utilitzades en la indústria alimentària per a la fabricació, tractament, conservació o comercialització de productes o substàncies destinades al consum humà, així com les utilitzades per la neteja de superfícies, objectes i materials que poden estar en contacte amb els aliments.
- totes aquelles aigües subministrades pel consum humà com a part d'una activitat comercial o pública, amb independència del volum mitjà diari d'aigua subministrat.

El cicle de l'aigua de consum humà consta de dues gran etapes ben diferenciades, l'abastament i el sanejament. L'abastament, inclou les primeres etapes del cicle de l'aigua i es basa en la utilització de mesures multidisciplinàries que inclouen la protecció de les fonts de captació d'aigua dolça de qualsevol contaminació, l'elecció i aplicació dels tractaments més adequats per millorar si s'escau la qualitat de l'aigua captada i la distribució de l'aigua tractada fins al consumidor mantenint-ne la qualitat (Anonymous 2003, WHO 2008, AMB).

El sanejament en canvi, inclou les últimes etapes del cicle de l'aigua després de que aquesta s'hagi utilitzat. Aquesta etapa es basa en la recollida, transport i depuració de les aigües residuals que permeten tornar l'aigua al medi sense provocar cap efecte nociu o bé reutilitzar-la per a altres usos com el reg agrícola o la neteja viària de les ciutats (AMB).

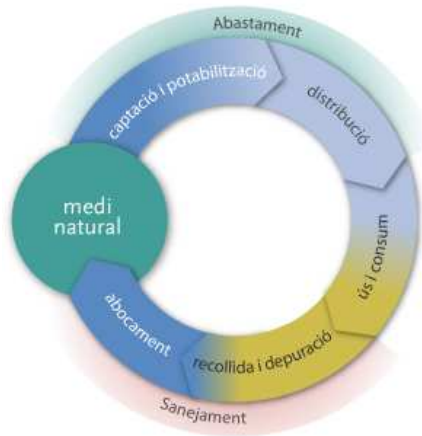


Figura 1.1. Cicle de l'aigua de consum al nostre país (AMB)

3.1 Abastament de l'aigua, de la natura a l'aixeta

Tal com hem dit abans, l'abastament inclou les primeres etapes del cicle de l'aigua, des de la captació fins al seu ús.

3.1.1 Captació de l'aigua

El primer pas de l'abastament és la captació de l'aigua. Les fonts principals d'aigua de consum poden ser d'origen superficial o bé d'origen subterrani. La captació de l'aigua de consum varia entre superficial i subterrània en funció de la quantitat d'aigua que cal subministrar. Generalment, els sistemes de subministrament d'aigua més grans capturen aigües superficials mentre que els més petits ho fan de subterrànies (USEPA 2009). En alguns casos on els recursos hídrics són limitats l'aigua també pot ser captada del mar i subministrada amb un pas previ de dessalinització (AMB).

3.1.2 Potabilització

Després de la captació, l'aigua és portada a plantes de tractament d'aigua o també anomenades estacions de tractament d'aigua potable (ETAPs). La finalitat bàsica de les ETAPs és tractar l'aigua captada per fer-la apta pel consum humà, és a dir proporcionar a l'aigua natural captada una qualitat química i microbiològica i a més prevenir que es produeixin transformacions no desitjades durant l'emmagatzemament i distribució (WHO 2008, Vaz-Moreira *et al.* 2013).

Entre els diferents processos i tractaments aplicats a les ETAPs destaquem els tractaments de desinfecció. La desinfecció és el procés pel qual els organismes patògens són eliminats o inactivats per protegir la salut pública (Lofrano *et al.* 2010). Així doncs, per triar i aplicar els tractaments de desinfecció més adequats per garantir la qualitat de l'aigua cal fer un anàlisi de

quins són els perills o riscos potencials que cal eliminar sense alterar-ne les propietats organolèptiques.

Generalment els processos de desinfecció de l'aigua es basen en la utilització d'elements químics altament oxidants com el clor (en forma d'hipoclorit sòdic, cloramines, diòxid de clor, etc), l'ozó i àcids o bases forts així com elements físics com la filtració o la radiació UV. Al aplicar-los, s'ha de tenir en compte que hi ha diversos factors que poden influir en la seva eficàcia. Entre aquests destaquen la concentració de desinfectant, la temperatura, el temps de contacte i el pH (WHO 2008).

Els tractaments amb desinfectants més utilitzats a les ETAPs són:

- Pre-tractaments d'oxidació

Els productes químics oxidants s'afegeixen just al principi dels tractaments.

- Desinfecció primària

Es tracta generalment d'un procés d'oxidació química, encara que la llum UV i els tractaments amb membranes també s'apliquen amb aquest propòsit.

D'entre els desinfectants químics trobem: el clor, monoclорamines, diòxid de clor, ozó, llum UV i una barreja de productes oxidants.

- Desinfecció secundària

Aquest tractament s'utilitza per mantenir la qualitat de l'aigua des de que surt de la planta de tractament a través de la xarxa de distribució fins que arriba a l'aixeta del consumidor.

Al final de la cadena de tractaments i just abans de que l'aigua surti de l'ETAP cap a la xarxa de distribució, és necessari realitzar una verificació de la qualitat de l'aigua, és a dir comprovar que en aquell moment l'aigua té una qualitat microbiològica i química apta per al seu consum humà. Els paràmetres a analitzar per realitzar aquesta verificació, són determinats per l'autoritat nacional competent i queden recollits en el cas de l'estat espanyol al Real Decreto 140/2003 i a la Normativa Europea (Consejo de la Unión Europea 1998):

Taula 1.1. Paràmetres indicadors de la qualitat de l'aigua de consum humà. Taula extreta del Real Decreto 140:2003 (BOE 2003b).

Paràmetre	Valor paramètric	Paràmetre	Valor paramètric
Bacteris coliforms	0 ufc/100 mL	Ferro (Fe)	200 µg/L
Bacteris heteròtrofs a 22°C	100 ufc/mL	Manganès (Mn)	50 µg/L
Alumini (Al)	200 µg/L	Olor	3-25°C índex de dilució
Amoni (NH ₄)	0.50 mg/L	Oxidabilitat * ¹	5.0 mg O ₂ /L
Carboni orgànic total (COT) * ¹	Sense canvis anòmals	pH * ^{5,6}	Mínim 6.5 Màxim 9.5
Clor combinat residual * ^{2,3,4}	2.0 mg/L	Gust	3-25°C índex de dilució
Clor lliure residual * ^{2,3}	1.0 mg/L	Sodi (Na)	200 mg/L
Clorur (Cl)	250 mg/L	Sulfat (SO ₄ ⁻)	250 mg/L
Color	15 mg/L Pt /Co	Terbolesa (sortida ETAP)	1 UNF
Conductivitat * ⁵	2500 µS/cm ⁻¹ a 20°C	Terbolesa (xarxa distribució)	5 UNF

*¹ Per subministraments majors de 10,000 m³ d'aigua distribuïda, sinó es considerarà la oxidabilitat.

*² Els valors paramètrics fan referència als nivells a la xarxa de distribució, la determinació d'aquests paràmetres es podrà realitzar també *in situ*.

*³ Es determinarà quan s'utilitzi el clor o els seus derivats en els processos de potabilització. Si el que s'utilitza és diòxid de clor (ClO₂) es farà una determinació dels clorits a la sortida de la ETAP.

*⁴ Es realitzarà quan s'utilitzin cloramines com a tractaments de desinfecció

*⁵ L'aigua en cap moment pot ser ni agressiva ni incrustant. El resultat de l'índex de Langelier ha d'estar comprès entre +/- 0.5.

*⁶ Per a la indústria alimentària aquest valor podrà ser reduït a 4.5 unitats de pH.

Apart dels paràmetres indicadors de qualitat mostrats a la Taula 1.1, l'aigua que surt de les ETAPs ha de complir altres paràmetres:

- Paràmetres químics, com la concentració màxima de diferents elements i compostos químics descrits a l'Annex I B del Real Decreto 140/2003 (BOE 2003b).
- Paràmetres microbiològics: recomptes d'*E. coli*, coliforms totals i coliforms termotolerants, bacteris heteròtrofs i bacteris aerobis formadors d'espores.

<i>Escherichia coli</i>	0 ufc/100 mL
Enterococs	0 ufc/100 mL
<i>Clostridium perfringens</i> (espores incloses)	0 ufc/100 mL

A més, quan la determinació de *C. perfringens* sigui positiva i la terbolesa sigui major de 5 UNF si l'autoritat ho considera necessari es determinaran a la sortida de la ETAP o dipòsit, *Cryptosporidium* i altres microorganismes o paràsits.

3.1.3 Distribució de l'aigua potable

La protecció del sistema de distribució de l'aigua és la última barrera, i una de les més importants a tenir en compte per la provisió d'aigua potable segura (LeChevallier *et al.* 2004). Es coneix com a xarxa de distribució a aquell conjunt de canonades dissenyades per a la distribució de l'aigua de consum humà des de les ETAPs o des de dipòsits fins a l'escomesa dels usuaris (BOE 2003b). El grau de complexitat de les xarxes de distribució depèn del nombre de consumidors de cada xarxa, que pot anar des de sistemes senzills fins a sistemes molt complexos en sistemes metropolitans amb centenars de milers de tubs que distribueixen aigua a milions de persones.

Així doncs, un cop tractada a les ETAPs l'aigua es distribueix per les xarxes corresponents. Per assegurar que l'aigua tractada arriba al punt d'ús mantenint les mateixes característiques amb les que va sortir de l'ETAP, moltes vegades és necessari aplicar algun tipus de desinfectant residual que mantingui la població microbiana de l'aigua estable (WHO and OECD 2003). Tot i això, el manteniment de la qualitat de l'aigua a la xarxa de distribució no només depèn de la seva biota sinó que inclou altres factors com el disseny i la operabilitat del sistema, i el manteniment i la inspecció d'aquest per prevenir possibles contaminacions i alhora prevenir i eliminar la formació de sediments o precipitats a l'interior de les canonades i dipòsits (WHO 2008).

Per mantenir la qualitat de l'aigua a les xarxes de distribució es poden adoptar diverses estratègies com la utilització d'un desinfectant químic secundari estable com ara el clor, la instal·lació de dispositius de prevenció de reflux, el manteniment d'una pressió positiva en tot el sistema i fer un manteniment de les instal·lacions eficaç. Alhora evitar que l'aigua quedi estancada dins del sistema durant períodes de temps llargs i evitar la formació de bucles i ramals sense sortida al sistema de canonades (WHO 2006, WHO 2008).

4. Microbiologia dels sistemes d'aigua potable

Tot i que els sistemes de subministrament d'aigua potable són un dels recursos més controlats i estrictament regulats a molts països arreu del món, avui en dia encara es produeixen brots de malalties infeccioses causats per patògens transmesos a través d'aigua contaminada com ara la legionel·losi. I és que malgrat l'estès ús dels procediments estàndard regulats per administracions nacionals i europees i recomanats per la OMS, les característiques finals de cada aigua de consum depenen de factors com la font d'aigua utilitzada, els tractaments aplicats a les ETAPs i la naturalesa i extensió dels dispositius d'emmagatzemament i distribució (Vaz-Moreira *et al.* 2013).

Existeixen molts estudis sobre la composició de la biota de l'aigua, però en els darrers anys i gràcies a l'evolució de les tècniques moleculars de tipatge gènic i seqüenciació massiva, s'han fet diversos estudis aplicant anàlisis de la metagenòmica, és a dir sobre les comunitats microbiològiques i la dinàmica d'aquestes al llarg dels sistemes de subministrament d'aigua potable, incloent les principals etapes des del punt de captació fins al consumidor (Eichler *et al.* 2006, Vaz-Moreira *et al.* 2013). Les espècies microbianes que conformen cada comunitat són tant variables com els punts de captació d'aigua, per tant cada sistema de distribució té una composició pròpia. Tot i això, s'han pogut establir certes tendències.

En termes generals, l'aigua dolça del punt de captació és la que presenta la major concentració i diversitat microbiològica. Els fil·lum bacterians més abundants en aquest punt del sistema són *Proteobacteris*, principalment *Alfa*, *Beta* i en menys proporció *Gamma* a més, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes* i *Bacteroidetes* (Eichler *et al.* 2006, Vaz-Moreira *et al.* 2013, Zeng *et al.* 2013). Pel que fa a altres tipus de microorganismes, també s'ha descrit la presència de protozous, en especial amebes de vida lliure (*free living amoeba*, FLA) en el 62% de les mostres d'aigua superficials i en el 71% de les mostres d'aigua subterrànies en diversos estudis recopilats per Loret *et al.* (2010).

Pel que fa als virus, aquests també poden trobar-se en grans quantitats a l'ambient aquàtic, sobretot en aigües contaminades per residus fecals ja siguin de procedència humana com animal (Costán-Longares *et al.* 2008, Calgua *et al.* 2013, Rusiñol *et al.* 2013). Els grups de virus humans més abundants són els Rotavirus (RV), els Norovirus juntament amb els Adenovirus humans i el Polioma JC (Calgua *et al.* 2013); i pel que fa als grups de virus animals més abundants destaquen els Adenovirus porcins i el Polioma boví i oví (Bofill-Mas *et al.* 2013, Rusiñol *et al.* 2013).

Els diferents tractaments aplicats a les ETAPs s'encarreguen de reduir tant la concentració com la diversitat microbiològica encara que no tots ho fan de la mateixa manera. Mentre que la influència dels processos de floculació i filtració amb filtres de sorra és relativament baixa pel que fa als bacteris i les amebes de vida lliure, la utilització de desinfectants com el clor, les cloramines i l'ozó en redueix significativament la concentració i la diversitat d'espècies (Eichler *et al.* 2006, Loret *et al.* 2010, Thomas *et al.* 2011, Vaz-Moreira *et al.* 2013, Zeng *et al.* 2013). Al final dels tractaments, l'aigua que abandona les ETAPs malgrat no ser estèril, fet que suposaria un augment significatiu del preu de producció, compleix una sèrie de requisits microbiològics relacionats amb la presència de possibles contaminants d'origen fecal a l'aigua. Per mantenir la qualitat de l'aigua que abandona les ETAPs al llarg de la xarxa de distribució s'apliquen tractaments de desinfecció secundària que mantenen el nivell de desinfectant residual exercint un efecte directe sobre els microorganismes aquàtics. Tot i això, la composició de la comunitat microbiològica pot arribar a alterar l'eficàcia d'aquests (Zeng *et al.* 2013). Per exemple, alguns autors com Regan *et al.* (2003) i Zhang *et al.* (2009) han descrit que certs processos metabòlics bacterians com la nitrificació, poden transformar les cloramines en compostos no efectius. En el cas de la cloració, es produeix un augment de carboni orgànic assimilable (COA) degut a la reacció entre el clor lliure amb el carboni orgànic dissolt (COD) present a l'aigua (Eichler *et al.* 2006). Aquest COA està format per una sèrie de compostos de baix pes molecular que fan de substrat pel creixement de bacteris heteròtrofs, originant un recreixement bacterià a les xarxes de distribució.

Estudis sobre el recreixement dels bacteris heteròtrofs a les xarxes de distribució, han permès identificar els principals factors que el promouen, aquests són (Niquette *et al.* 2001):

- la concentració de substrat orgànic a l'aigua tractada, utilitzable pels bacteris heteròtrofs. Aquest substrat s'anomena carboni orgànic dissolt biodegradable (BDOC);
- la concentració de clor lliure residual a la xarxa de distribució;
- el temps de residència de l'aigua tractada a la xarxa de distribució, des de que abandona la ETAP fins al consumidor;
- la temperatura de l'aigua;
- les característiques del material que recobreix l'interior dels tubs o canonades.

Tot i que la presència de bacteris heteròtrofs a l'aigua de consum no comporta directament un risc per la salut, la presència i sobretot la concentració són considerats factors indicadors de la qualitat de l'aigua. Si no s'apliquen mesures per evitar-ne els recreixements, els bacteris heteròtrofs i altres microorganismes presents a la xarxa de distribució s'acumulen en les canonades en forma de biofilms.

Dins d'aquestes comunitats s'estableixen diferents interrelacions que proporcionen als seus components mecanismes de resistència davant biocides. Ja sigui la protecció física de l'accés dels desinfectants a través de la matriu extracel·lular (Stewart *et al.* 2001) com a nivell de l'activitat fisiològica i l'expressió gènica individual de les cèl·lules que comporta una diferent susceptibilitat davant certs biocides (Cochran *et al.* 2000, Wimpenny *et al.* 2000, Molin *et al.* 2003, Schwartz *et al.* 2003, Thomas *et al.* 2004). Així doncs, és dins d'aquestes comunitats on alguns microorganismes patògens no tant ben adaptats al medi aquàtic que han sobreviscut a les etapes anteriors dels sistemes de distribució d'aigua troben la manera de sobreviure, multiplicar-se i si troben els seu hoste, causar infeccions.

En alguns dels darrers casos de brots epidèmics transmesos per l'aigua, aquesta complia amb les recomanacions de la OMS i la normativa del país corresponent pel que fa a la qualitat microbiològica de l'aigua. El fet que les normatives estatals només incloguin *E. coli*, enterococs i clostridis com a paràmetres microbiològics indicadors fa que s'estigui subestimant el risc biològic de l'aigua al no detectar la presència de determinats microorganismes patògens (Carter *et al.* 1987, Albinana-Gimenez *et al.* 2006, Costán-Longares *et al.* 2008, Agulló-Barceló *et al.* 2013). Però malgrat els esforços per reduir la quantitat de malalties transmeses a partir de l'aigua alguns patògens encara suposen un risc considerable per la salut i altres resten poc estudiats o ni tant sols reconeguts (Sobsey 2006).

4.1 Risc microbiològic associat a l'aigua potable

Les vies de transmissió d'infeccions a través de l'aigua potable poden tenir diversos orígens en funció de l'ús de l'aigua. A la Figura 1.2 es mostren alguns exemples de rutes i patògens transmesos a partir de l'aigua potable:

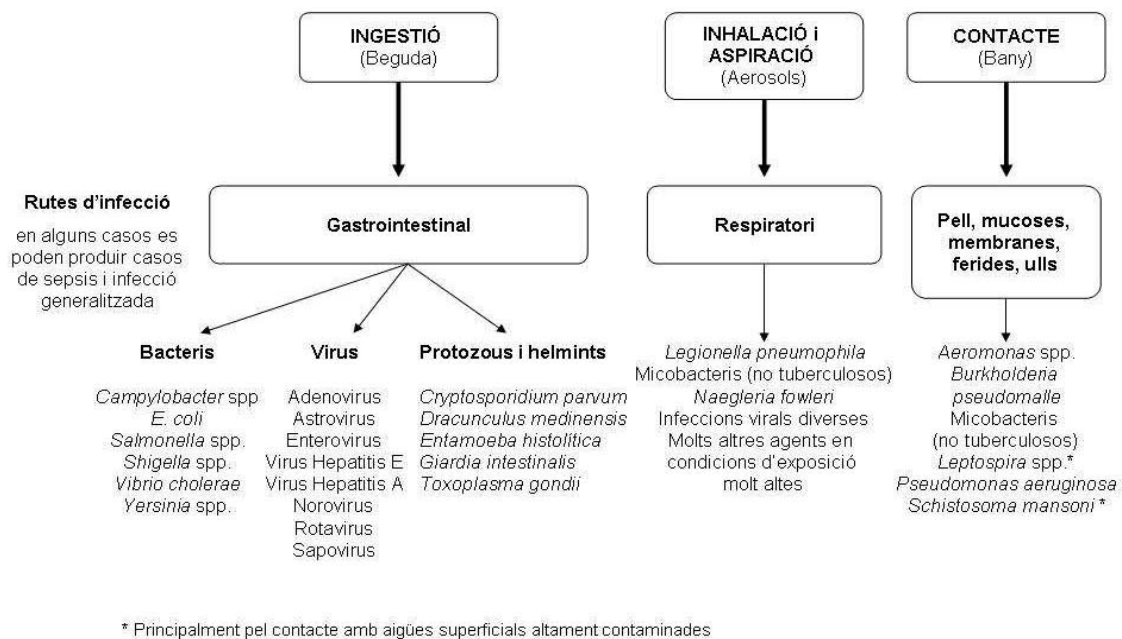


Figura 1.2. Extreta de WHO (2008). Rutes majoritàries i patògens transmesos a través de l'aigua potable

Molts d'aquests patògens s'introdueixen als sistemes d'aigua potable a través de la contaminació fecal de les fonts de captació d'aigua. Un cop al medi aquàtic, aquests patògens no són capaços de multiplicar-se fins que arriben al tracte gastrointestinal d'un nou hoste via ingestió d'aigua contaminada. No obstant, als sistemes d'aigua també es poden trobar alguns microorganismes ambientals capaços de multiplicar-se a l'aigua com ara *Legionella*, *Mycobacterium*, *Burkholderia pseudomallei*, *Naegleria fowleri* i *Acanthamoeba* sp.. Les rutes de transmissió d'aquests patògens són principalment la inhalació d'aerosols generats a partir d'aigua contaminada i el contacte directe amb la pell i mucoses que poden acabar originant infeccions a nivell del tracte respiratori o lesions tant a la pell com al cervell (WHO 2008).

Aquest treball està centrat en un dels patògens aquàtics, transmesos a través de l'aigua que provoca més infeccions al llarg de l'any a la majoria de països desenvolupats on l'aigua compleix amb les recomanacions i requeriments tant de la OMS com de les normatives estatals i/o europees per al seu consum, *Legionella*, i amb les amebes de vida lliure, uns dels microorganismes amb els que comparteix hàbitat.

5. *Legionella*

La transmissió de *Legionella* des de l'ambient fins als humans està estretament lligada al seu hàbitat natural o reservori, l'entorn aquàtic. S'ha detectat *Legionellae* en el 40% dels ambients aquàtics d'aigua continental mitjançant mètodes de cultiu i en el 80% mitjançant mètodes

moleculars, fet que demostra la capacitat del bacteri per sobreviure davant un ampli ventall de condicions ambientals extremes (Fields *et al.* 2002). Tot i això, les fonts principals de *Legionellae* a l'actualitat són els sistemes de distribució creats per l'home especialment els d'aigua calenta, fonts, piscines i spas; i les torres de refrigeració on es donen les condicions necessàries per la multiplicació d'aquests bacteris (Borella *et al.* 2005a, Serrano-Suárez *et al.* 2013).

En un estudi realitzat al sud-est d'Alemanya, es va aïllar *Legionella* en un 68% dels hospitals analitzats, en un 50% de les consultes externes, en un 58% de les consultes de dentistes, en un 85% dels edificis públics i en un 65% de residències privades en grans edificis. Tot i això, en la major part dels casos, la concentració de *Legionella* detectada va ser inferior a 100 ufc/mL (Lück *et al.* 1993, Atlas 1999).

Però no totes les espècies estan associades a l'hàbitat aquàtic, *L. longbeachae* s'ha detectat freqüentment en mostres de terra de jardineria (Steele *et al.* 1990, Fields *et al.* 2002, Velonakis *et al.* 2010).

5.1 Ecologia de *Legionella*

El gènere *Legionella* està format per bacteris adaptats a viure en ambients aquàtics que degut a la pressió de selecció per prosperar sota condicions variables i un baix contingut en nutrients, han desenvolupat mecanismes per sobreviure i multiplicar-se formant part de biofilms. No obstant això, en aquests ambients, *Legionella* es troba sotmesa a la depredació de protozous. Per contrarestar aquest fet el gènere *Legionella* ha evolucionat fins a establir una sèrie d'associacions endosimbiòtiques que assegurin la seva persistència al medi (Lau *et al.* 2009).

D'aquesta manera, *Legionella* podria trobar-se al medi expressant dos estats fisiològics diferents: com a cèl·lules planctòniques de vida lliure dins de biofilms, i com a endosimbionts establint una associació amb protozous (Barker *et al.* 1992, Steinert *et al.* 2002). En el primer estat fisiològic, *L. pneumophila* obté els nutrients que necessita pel seu creixement del biofilm tant directament d'altres microorganismes vius, algues i bacteris heteròtrofs, com a partir de matèria orgànica en descomposició (Declerck 2010). En el segon estat fisiològic, *Legionella* infecta protozous i es nodreix a partir de la degradació de pèptids i proteïnes de la cèl·lula hoste (Steinert *et al.* 2002, Declerck 2010).

Tot i que la majoria de la comunitat científica accepta el fet que *Legionella* tingui dos estats fisiològics diferenciats, planctònic i endosimbiont, hi ha encara una gran controvèrsia a l'hora

de definir sota quines condicions i en quin o quins estats fisiològics es produeix la multiplicació del bacteri (Harb *et al.* 2000, Declerck 2010). Mentre que una gran part de la comunitat recolza la idea que *Legionella* només es multiplica a nivell endosimbiont dins de protozous, altres autors apunten que aquest fet també es podria produir quan el bacteri es troba en estat planctònic.

Tenint en compte això i de forma simplificada, alguns autors han proposat diversos models on expliquen com es desenvolupa la colonització dels sistemes d'aigua per *Legionella* i algunes de les relacions simbiòtiques que s'hi produeixen (Lau *et al.* 2009).

- 1 Diferents espècies de *Legionella* tant patògenes com no patògenes arriben al sistema de distribució juntament amb amebes de vida lliure i altres bacteris heteròtrofs.
- 2 Els microorganismes queden absorbits als biofilms.
- 3 *Legionella* colonitza el biofilm i pot ser ingerida per un protozou. En aquest moment es poden produir diverses coses:
 - a. *Legionella* no és capaç d'aturar la via d'endocitosi amebiana i és digerida pel protozou (Lau *et al.* 2009).
 - b. *Legionella* atura la via endocítica i la digestió amebiana, de manera que es queda dins del protozou en uns vacúols denominats fagosomes. Quan als fagosomes es donen les condicions favorables per la replicació, el bacteri es multiplica a nivell intracel·lular. Quan la concentració de nutrients dins del vacúol comença a ser limitant, la progènie es diferencia cap a la fase de transmissió, reprimint la multiplicació i expressant els trets necessaris per escapar de la cèl·lula hoste, sobreviure com a cèl·lula planctònica lliure i restablir el nínxol replicatiu dins d'un nou fagocit (Greub *et al.* 2003, Molofsky *et al.* 2004).
4. Si les condicions del medi canvien i no són favorables pels protozous aquests es poden enquistar retenint al seu interior les cèl·lules de *Legionella* fagocitades (Declerck *et al.* 2010). *Legionella* s'allibera del biofilm i torna de nou al sistema de distribució d'aigua :
 - a. Les cèl·lules de *Legionella* que havien colonitzat i proliferat dins el biofilm es desenganxen de les canonades juntament amb aquest per canvis en el cabal.
 - b. Les cèl·lules de *Legionella* que es trobaven com a endosimbionts tant de trofozoïts com de cists de protozous són alliberades juntament amb les cèl·lules hoste.
 - c. Les legionelles que s'han expulsat de les cèl·lules hoste a través de vesícules de secreció també són alliberades al medi.

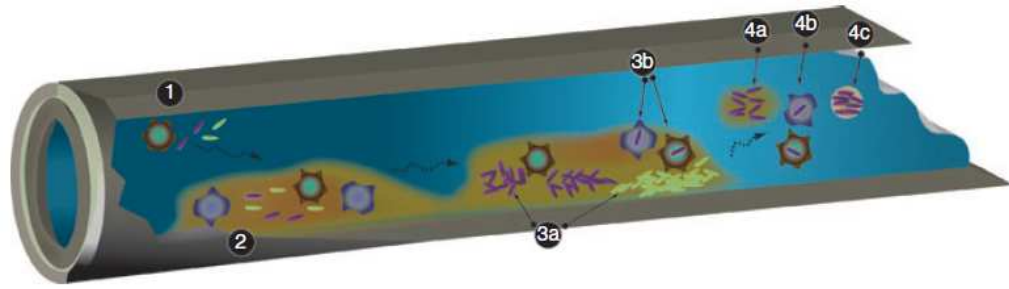


Figura 1.3. A la figura es mostra la evolució de la colonització dels sistemes de distribució d'aigua per part de *Legionella* i amebes de vida lliure (Lau *et al.* 2009).

Així doncs, tal com va resumir Borella *et al.* (2005a) l'associació amb les amebes de vida lliure contribueix al l'ecologia de *Legionella* a diferents nivells:

- Primer, diversos estudis han demostrat que els protozous, proveeixen d'un hàbitat adequat per la supervivència ambiental de les diferents espècies de *Legionella* (Barker *et al.* 1994).
- En segon lloc, quan espècies com *L. pneumophila* es troben a nivell intracel·lular dins d'amebes, eviten el contacte directe amb químics desinfectants i altres biocides utilitzats per tractar l'aigua. D'aquesta manera, especialment si les amebes es troben encistades, actuen d'escut protector de condicions extracel·lulars adverses com la dessecació, les altes temperatures, la osmolaritat, el pH, la cloració i altres compostos desinfectants (Barker *et al.* 1992, Greub *et al.* 2004). Cal destacar també el fet que les amebes protegeixen els bacteris endosimbionts de les primeres línies de defensa del cos humà, actuant com a cavall de Troia.
- En tercer lloc, l'adaptació de *Legionella* a sobreviure dins les amebes, podria contribuir a la seva virulència preparant als bacteris patògens per infectar cèl·lules humanes.
- Finalment, s'ha demostrat que *L. pneumophila* quan es troba en estat de cèl·lula viable però no cultivable pot ser ressuscitada mitjançant un co-cultiu amb protozous (Dey *et al.* 2009).

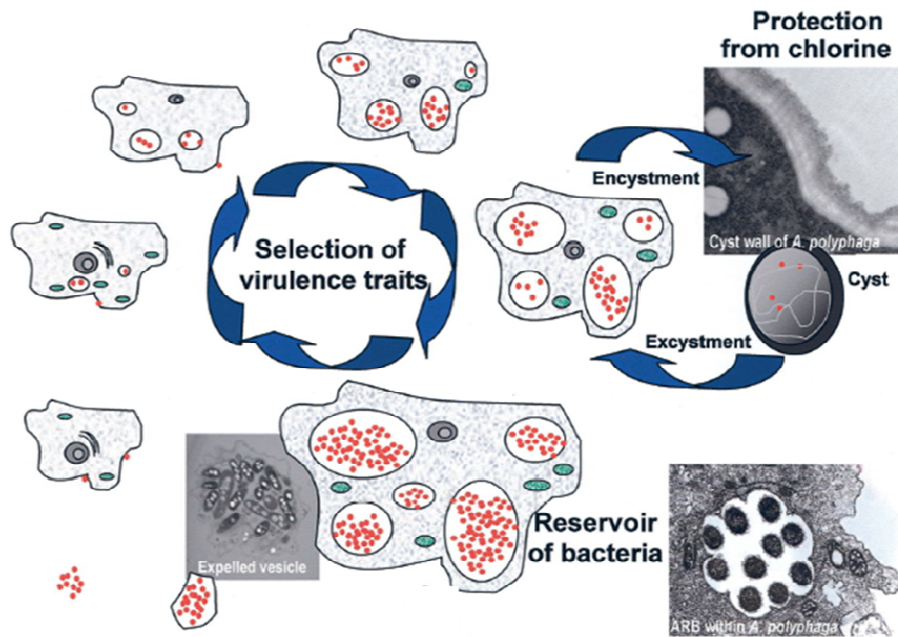


Figura 1.4. A la figura extreta de la revisió de Greub *et al.* (2004) es mostra el cicle de vida de *Legionella* des de que és per les amebes de vida lliure, fins que torna al medi altra vegada. Alhora es mostra, el paper que juguen les amebes en l'ecologia del bacteri seleccionant trets de virulència i proporcionant una protecció davant desinfectants de l'aigua com el clor. En resum, com les amebes poden ser un reservori de bacteris patògens.

5.1.1 Ecologia de *Legionella* com a endosimbiont d'amebes de vida lliure

Des de que Rowbotham l'any 1980 va descriure per primer cop el creixement de *Legionella* dins de dues amebes del gènere *Acanthamoeba* i *Naegleria*, molts altres autors han descrit i estudiat les associacions que s'estableixen entre aquests dos tipus de microorganismes. Actualment es coneixen 20 espècies d'amebes, 2 espècies de ciliats i una de fongs del fang amb les que *Legionella* ha establert algun tipus d'associació endosimbiòtica (Fields *et al.* 2002, Steinert *et al.* 2002). La Taula 1.2. recull tots aquests microorganismes:

Taula 1.2. Protozous descrits com a hostes de *L. pneumophila* (Lau *et al.* 2009).

AMEBES		CILIATS	FONGS
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	<i>Naegleria fowleri</i>		
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	<i>Naegleria gruberi</i>		
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	<i>Naegleria jadini</i>		
<i>Acanthamoeba royreba</i>	<i>Naegleria lovaniensis</i>		
<i>Amoeba proteus</i> soca xD	<i>Paratetramitus jugosis</i>		
<i>Camandonia operculata</i>	<i>Vahlkampfia</i> spp.		
<i>Echinamoeba exudans</i>	<i>Vahlkampfia jugosa</i>		
<i>Filamoeba nolandi</i>	<i>Vahlkampfia ustiana</i>		
<i>Hartmannella</i> spp.			

Però tot i la varietat d'espècies de protozous conegudes que poden fer d'hoste de *Legionella*, els factors que determinen l'especificitat de les diferents espècies de *Legionella* pel seus hostes (Dey *et al.* 2009) i els requisits de creixement dins d'aquests resten encara desconeguts (Steinert *et al.* 2002). A més, en funció de cada hoste, el cicle d'infecció de *Legionella* spp. varia suggerint diferències en la expressió dels trets de virulència d'aquests bacteris patògens. D'altra banda, alguns autors com Patrizia *et al.* (2013) han descrit també l'expressió de trets de virulència diferents entre serogrupos de *L. pneumophila* (Patrizia *et al.* 2013), o inclús entre soques d'una mateixa espècie (D'Auria *et al.* 2010). Aquest fet, podria estar relacionat amb la distribució i supervivència de les diferents espècies de *Legionella* a l'ambient, amb la virulència d'aquestes i per tant, amb els casos de legionel·losi.

L. pneumophila presenta una gran plasticitat fenotípica, on apart de l'estat de cèl·lula VBNC s'hi afegeixen dos fenotips diferents que *L. pneumophila* expressa durant el cicle d'infecció de la cèl·lula hoste que corresponen al creixement seqüencial del bacteri (Steinert *et al.* 2002). Abu Kwaik *et al.* (1998) van recollir en un dels seus treballs, una revisió sobre el procés d'infecció de protozous per *L. pneumophila* que hem resumit a continuació i on s'expliquen els diferents fenotips expressats pel bacteri:

En general els primer passos de interaccions entre els intracel·lulars i els hostes ja sigui protozous o cèl·lules humanes es produeixen a través de l'acoblament d'un lligand bacterià, com el pilus, a un receptor a la superfície de la cèl·lula hoste. A continuació, l'endocitosi del bacteri es produeix de forma convencional i en forma d'espiral o "coiling" on el bacteri és envoltat per una multicapa d'estructures disposades en espiral.

Un cop el *Legionella* entra per exemple, dins del protozou, és embolcallada per un vacúol endocític anomenat fagosoma que és envoltat per mitocondris i altres vesícules de la cèl·lula hoste durant els primers 60 min. Aquesta població de petites vesícules podrien originar-se a partir de l'eliminació selectiva de proteïnes de l'hoste crítiques pel reconeixement o activació de la maquinària de fusió endocítica, evitant d'aquesta manera la maduració del fagolisosoma (Abu Kwaik *et al.* 1998, Swanson *et al.* 2000).

A continuació, *L. pneumophila* dins del fagosoma inhibeix la fusió dels lisosomes de l'hoste i per tant evita l'acidificació d'aquest. Alguns autors com Lifshitz *et al.* (2013) suggereixen que aquest procés requereix d'un complex proteïc de tipus 4B (*icm/dot*) mitjançant el qual el bacteri transloca un repertori de fins a 300 efectors (*effector proteins*) dins la cèl·lula hoste. Al cap d'unes 4 h post-infecció el fagosoma és envoltat per una membrana disposada en multicapes que deriva del reticle endoplasmàtic rugós (RER), i passa a anomenar-se fagosoma de maduració endosomal bloquejada (EMB). De forma alternativa, en altres espècies de *Legionella*, com *L. micdadei*, els bacteris a nivell intracel·lular es localitzen en fagosomes lliures no embolcallats pel RER (Gao *et al.* 1999). Durant les 4h post-infecció, *L. pneumophila* podria reclutar orgànuls de la cèl·lula hoste necessaris per iniciar la replicació bacteriana que comença un cop format l'EMB o de forma simultània, aquestes 4h d'espera podrien formar part d'una fase de latència metabòlica adaptativa al nou nínxol ambiental dins del fagosoma (Abu Kwaik *et al.* 1998, Harb *et al.* 2000).

Un cop comença a replicar, *L. pneumophila* passa de la fase post-exponencial en la que es trobava al medi, flagel·lada, molt mòbil i virulenta a la fase replicativa dins del fagosoma on perd la flagel·lació (Albert-Weissenberger *et al.* 2007). Després de diversos cicle replicatius, la quantitat de nutrients dins del fagosoma disminueix i *Legionella* torna a expressar els trets de virulència propis de la fase post-exponencial que promouen la lisi de la cèl·lula hoste i l'alliberació del bacteri altre cop al medi (Albert-Weissenberger *et al.* 2007).

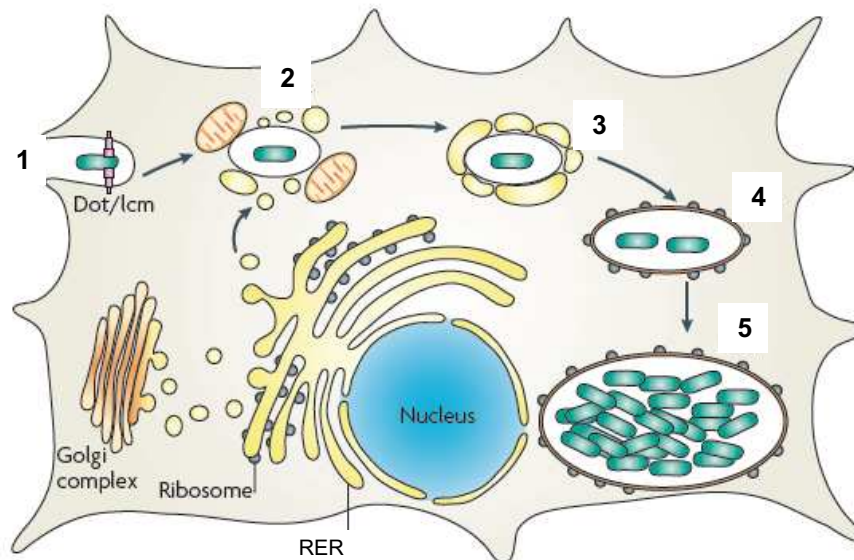


Figura 1.5. Imatge obtinguda de Isberg *et al.* (2009). Via de fagocitosis de *Legionella* per part dels protozoous. **(1)** Detecció del bacteri i formació de l'espiral fagocítica, **(2)** Formació del fagosoma envoltat de mitocondris, **(3)** Reclutament d'orgànuls per iniciar la replicació, **(4)** Inici de la replicació, **(5)** Expressió dels trets de virulència per alliberar-se de l'hoste.

Així doncs, els fenotips expressats per *L. pneumophila* al llarg del cicle d'infecció són (Swanson *et al.* 2000, Steinert *et al.* 2002):

Taula 1.3. Taula resum dels fenotips expressats per *L. pneumophila* durant el cicle d'infecció.

Fase replicativa	Fase infecciosa
Bacteri replicatiu	Fase de creixement estacionària
Bacils llargs i filamentosos	Bacils curts i gruixuts
No flagel·lada	Flagel·lada i mòbil
Resistent al sodi	Sensible al sodi
Baixa citotoxicitat	Citotòxica
Baixa resistència a condicions d'estrès	Resistent a condicions d'estrès

Finalment, els mecanismes mitjançant els quals *Legionella* lisa l'hoste protozoou, resten encara desconeguts. En una revisió escrita per Harb *et al.* (2000), apuntaven que *L. pneumophila* lisa *Acanthamoeba polyphaga* a través d'una inducció temporal de la necrosi mitjançant una activitat formadora de porus del bacteri patogen. D'altra banda, alguns autors com Atlas (1999) suggereixen a més, que durant el procés d'alliberament de *Legionella* es lisen membranes i que aquest fet allibera macromolècules incloent un polipèptid de 15kDa (major constituent de les membranes amebianes) que queda adherit a la superfície del bacteri. Alguns autors apunten que precisament, l'adhesió d'aquestes macromolècules de la cèl·lula hoste a la superfície de

Legionella podrien ser les responsables de l'augment de la virulència del bacteri (Barker *et al.* 1993).

El cicle de vida de *L. pneumophila* dins d'amebes és molt semblant al que segueix el bacteri patogen a l'hora d'infectar els macròfags alveolars. En ambdós casos, la fagocitació del bacteri és en espiral, els fagosomes no s'arriben mai a acidificar per la fusió dels lisosomes (Swanson *et al.* 2000), el fagosoma s'associa amb el RER, la replicació dels bacteris es dona a nivell intrafagosomal i els bacteris s'alliberen de les cèl·lules hoste lisant-les (Greub *et al.* 2004). Tot i això, alguns autors han suggerit algunes diferències en els cicles de vida (Harb *et al.* 2000).

Però apart dels mecanismes d'invasió, sembla que les majors diferències entre els cicles infectius de *Legionella* a protozous i a cèl·lules de mamífers es troben especialment pel que fa la lisi de l'hoste. En el cas de les cèl·lules de mamífers, el procés d'alliberament de *L. pneumophila* es produeix en dues fases (Gao *et al.* 1999). A la primera fase, el bacteri indueix la via d'apoptosi (via de regulació de suïcidi cel·lular programat) de la mateixa cèl·lula infectada (Müller *et al.* 1996), ja siguin macròfags, monòcits o cèl·lules de l'epiteli alveolar durant les primeres fases de la infecció. La primera fase és totalment independent de la fase de creixement. La segona fase, es produeix a través d'una ràpida inducció de la necrosi provocada pel pas de *L. pneumophila* a la fase post-exponencial on resulta citotòxica (Abu Kwaik *et al.* 1998, Harb *et al.* 2000). En comparació, el mecanisme de *L. pneumophila* per alliberar-se dels hostes protozous com *Acanthamoeba castellanii* no es fa mitjançant la inducció de cap procés d'apoptosi., sinó que ho fa a través d'induir la necrosi cel·lular amb una activitat formadora de porus (Gao *et al.* 1999, Harb *et al.* 2000).

A més de la descripció fenotípica i dels canvis fisiològics, així com la implicació dels reguladors de l'expressió gènica, nombrosos autors han estudiat els factors de virulència que permeten la multiplicació intracel·lular de *Legionella* ja sigui dins de protozous o de macròfags a les diferents etapes del procés d'infecció, des de la endocitosi, la vacuolització, la multiplicació i finalment l'alliberació de les cèl·lules de nou al medi.

Aquests factors de virulència varien en funció de l'espècie de *Legionella* (Patrizia *et al.* 2013) així com entre soques d'una mateixa espècie (D'Auria *et al.* 2010) o fins hi tot, hi ha diferències entre els factors de virulència expressats en funció microorganisme infectat, entre macròfags i protozous (Abu Kwaik *et al.* 1998). A continuació s'han resumit alguns dels factors de virulència descrits fins al moment (Harb *et al.* 2000, Swanson *et al.* 2000, Steinert *et al.* 2002, Albert-Weissenberger *et al.* 2007):

- Factors de superfície:

- Un lipopolisacàrid (LPS), especialment hidròfob
- La proteïna MOMP que està codificada pel gen *ompS* que s'uneix als factors C3 i C3bi del complement i modula la captació de *L. pneumophila* a través dels receptors de CR1 i CR3 dels macròfags.
- La proteïna Mip (“*macrophage infectivity potentiator*”) de *L. pneumophila* està exposada a la superfície cel·lular dels bacteris crescuts a nivell extracel·lular. En cèl·lules d'*Acanthamoeba* infectades amb *Legionella*, s'ha detectat la presència de la proteïna Mip a la membrana de l'hoste amb una estructura multilaminar. A més, la proteïna Mip, contribueix a la disseminació bacteriana de *L. pneumophila* dins del teixit pulmonar d'hostes mamífers i permet a través de la unió a la matriu extracel·lular i proteïnes del col·lagen es desplaça cap a la melsa (Albert-Weissenberger *et al.* 2007).
- Altres factors d'unió com el pilus tipus IV que pot intervenir en un sistema d'adhesió de *Legionella* independent del complement a les cèl·lules de l'hoste ja sigui mamífer o amebes; així com la proteïna Hsp60.
- La presència de flagell

- Factors de secreció:

Legionella, secreta nombrosos enzims, pigments i components tòxics.

Diversos autors, apunten a que per establir un nínxol a nivell intracel·lular, *L. pneumophila* requereix un aparell de secreció unit a la membrana similar als sistemes de transferència de tipus IV de conjugació. Aquest aparell, està codificat per una combinació dels gens *dot* (*defective in organelle trafficking*) i *icm* (*intracellular multiplication*), promou la secreció de factors de virulència que inhibeixen la fusió del fagosoma amb els lisosomes i reprogramen el comportament de *Legionella* dins el vacuol. Una vegada el vacuol reuneix les condicions necessàries perquè els bacteris creixin, els gens funcionals de la família *dot/icm* es converteixen en prescindibles (Harb *et al.* 2000, Swanson *et al.* 2000, Steinert *et al.* 2002, Albert-Weissenberger *et al.* 2007).

5.2 Mecanismes de transmissió de *Legionella*

En general la infecció de *Legionella* es transmet per via aèria a través de la inhalació d'aerosols d'aigua contaminada per *Legionella* planctònica, *Legionella* dins de protozous i vesícules de secreció amb *Legionella*, entre 1-5µm de grandària. Aquests aerosols, inclús poden viatjar grans distàncies (Nguyen *et al.* 2006) i a més, afavorir la transmissió de les soques més virulentes (Dennis *et al.* 1988). Alguns dels sistemes hídrics productors d'aerosols que s'han relacionat amb la transmissió de la malaltia inclouen torres de refrigeració, aparells utilitzats per teràpies

respiratòries i banyeres d'hidromassatge (Stout *et al.* 1997). És important remarcar, que no s'ha descrit cap cas de transmissió persona-persona (Fields *et al.* 2002).

El tracte respiratori és la via primària d'entrada del microorganisme patogen, que al arribar als alvèols pulmonar queda retingut i comença a infectar l'organisme. Aquesta infecció comença un cop *Legionella* és fagocitada pels macròfags alveolars dintre dels quals és capaç de sobreviure a la digestió intracel·lular i multiplicar-se mitjançant estratègies que s'explicaran en apartats posteriors (Abu Kwaik *et al.* 1998, Swanson *et al.* 2000, Bartram *et al.* 2007). Tot i això, estudis epidemiològics de la legionel·losis indiquen que una resposta immune robusta, sol ser suficient per evitar que les infeccions provocades per *L. pneumophila* causin una pneumònia severa (Stout *et al.* 1997). Per tant, les deficiències en el sistema immunitari són un dels factors que poden augmentar el risc d'adquisició de legionel·losis així com tenir una d'edat avançada, sexe masculí, fumadors actius o antics fumadors, estar afectat per emfisema pulmonar o qualsevol altra malaltia pulmonar crònica (EPOC). També insuficiència renal, alcoholisme, diabetis, transplantaments i estar seguint teràpies citotòxiques s'han relacionat amb una major predisposició a patir legionel·losi (Stout *et al.* 1997, Swanson *et al.* 2000, Generalitat de Catalunya 2001, Albert-Weissenberger *et al.* 2007, Buse *et al.* 2012).

És important remarcar que *L. pneumophila* és un bacteri no adaptat per a un hoste humà, i que no s'ha descrit mai fins a dia d'avui una transmissió de *Legionella* de persona a persona. Per tant, davant l'absència de transmissió a un nou hoste humà, les variants genètiques que sobreviuen a la forta pressió selectiva exercida pels macròfags alveolars no persistiran al genoma de l'espècie ja que seran eliminades. En canvi, la capacitat de *L. pneumophila* per establir una infecció dins del pulmó sí que pot ser considerada una conseqüència de la pressió selectiva aplicada per una classe diferent de fagòcits, les amebes de vida lliure (Swanson *et al.* 2000).

Així doncs, la capacitat d'aquest patogen per causar una malaltia depèn de la seva habilitat per envair i multiplicar-se dins de les cèl·lules fagocítiques de l'hoste, és a dir de la virulència de la soca (Abu Kwaik *et al.* 1998), de l'estat immunitari en que es trobi aquest hoste i de condicions ambientals que afavoreixen la multiplicació del bacteri als sistemes hídrics i la capacitat productora d'aerosols d'aquests sistemes (Bartram *et al.* 2007).

5.3 Infeccions causades per *Legionella* spp.

El terme legionel·losi és un nom genèric utilitzat des del primer brot de pneumònia atípica l'any 1976 per descriure aquells processos bacterians infecciosos que inclouen des de processos

febrils moderats, coneguts com a Febres de Pontiac; una ràpida i potencialment mortal pneumònia amb afectació multisistèmica, la Malaltia del Legionari; i el síndrome extrapulmonar. Tot i això, mitjançant estudis de seroprevalència també s'han detectat alguns casos de persones asimptomàtiques per aquesta malaltia (Harrison *et al.* 1988a).

5.3.1 Malaltia del Legionari o pneumònia atípica

Es caracteritza per ser l'afectació més greu de legionel·losi amb un període d'incubació que oscil·la entre 2 i 10 dies, encara que aquest període podria ser excepcionalment més llarg. Les primeres manifestacions clíniques solen ser agudes com febre alta, malestar general, debilitat, miàlgies, mal de cap i tos inicialment no productiva. Apart, també es poden donar manifestacions extrapulmonars com diarrees i dolor pleural. En els casos més greus pot arribar a causar confusió mental i fracàs respiratori i renal. Els efectes de la malaltia poden durar d'una a dues setmanes depenent de la rapidesa del diagnòstic, l'estat immunològic inicial del pacient i del tractament aplicat (Harrison *et al.* 1988a, Bartram *et al.* 2007).

Els malalts de pneumònia requereixen generalment d'hospitalització i després d'un tractament amb antibiòtics la recuperació sol ser total, encara que els afectats poden sentir-se dèbils durant alguns mesos (Fields *et al.* 2002, García-Fulgueiras *et al.* 2003). La letalitat en aquests casos, se situa entre el 10 i el 20% i en són determinants d'inòcul, la virulència de la soca, els factors individuals dels afectats i el tractament administrat en iniciar-se el procés (Generalitat de Catalunya 2001).

5.3.2 Febre de Pontiac

La Febre de Pontiac es presenta com un síndrome febril agut sense evidència radiològica de canvis al pulmó i autolimitant, generalment dura entre 2 i 5 dies. El temps d'incubació és curt, d'entre 36-48 hores (Harrison *et al.* 1988b).

Els símptomes inclouen febres, miàlgies, tos i un síndrome similar a una grip. El seu diagnòstic normalment és retrospectiu i el tractament simptomàtic, per això la seva incidència està poc documentada (García-Fulgueiras *et al.* 2003).

Generalment, els casos documentats de Febre de Pontiac corresponen a brots amb una afectació més o menys gran, mentre que els casos aïllats solen passar desapercebuts per les autoritats sanitàries degut a que la simptomatologia és molt semblant a altres processos gripals (Swanson *et al.* 2000).

El fet que l'exposició a un mateix bacteri ocasioni dues malalties clínica i epidemiològicament diferents és encara desconegut, d'aquí que la patologia de les Febres de Pontiac sigui encara una incògnita. Alguns autors apunten que algunes de les causes d'aquesta malaltia podrien ser una endotoxina bacteriana o bé una hipersensibilitat a algun component cel·lular tant de *Legionellae* com de algun dels seus hostes protozous (Swanson *et al.* 2000, Fields *et al.* 2001).

5.3.3 Síndrome extrapulmonar

Es produeix quan una infecció bacteriana produïda per *Legionella* ocasiona manifestacions extrapulmonars. Aquestes solen ser generalment molt greus ja que l'òrgan afectat de forma més comú és el cor, en forma de miocarditis, pericarditis o endocarditis (Stout *et al.* 1997). Tot i això, també s'han descrit altres manifestacions extrapulmonars que afecten altres àrees del cos com sinusitis, cel·lulitis, pancreatitis, peritonitis i pielonefritis en pacients immunocompromesos (Bartram *et al.* 2007).

5.4 Epidemiologia

La legionel·losi és una malaltia de distribució mundial, ara bé degut a que la seva incidència està relacionada directament amb sistemes d'aigua construïts per l'home, ja siguin xarxes de subministrament com sistemes de condicionament d'aire i refrigeració (torres de refrigeració, spas, fonts ornamentals, màquines de gel, humidificadors de vegetals, etc); el nombre de casos es concentra en països desenvolupats constituint un greu problema de salut pública. Sobretot, perquè l'aparició d'aquests casos o brots, es produeix a cases particulars, oficines, hotels, hospitals i creuers entre d'altres localitzacions (Atlas 1999, Bartram *et al.* 2007, Mouchtouri *et al.* 2007). Els majors brots de legionel·losi però, han estat associats a petites torres de refrigeració, que després d'un període de no activitat s'han tornat a posar en funcionament (Bentham *et al.* 1993, Atlas 1999).

La incidència de legionel·losi arreu del món és una dada difícil de calcular degut a diversos factors, com són la metodologia aplicada per obtenir el diagnòstic en cada cas o la col·laboració internacional a l'hora de proporcionar les dades a les organitzacions pertinents. L'interès de la comunitat científica en aconseguir una vigilància internacional de la malaltia, així com la millora del coneixement i la informació sobre els aspectes epidemiològics i microbiològics (clínic i ambientals) i l'evolució dels mètodes de diagnòstic, manipulació i tractament va concloure l'any 1986 en la creació del grup *European Group for Legionella Infections* (EWGLI). Recentment, aquest grup s'ha inclòs dins la xarxa de vigilància epidemiològica

europea coordinada per l'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) i se l'ha reanomenat *European Study Group for Legionella Infections* (ESGLI).

Durant l'any 2010, a Europa es van produir entre confirmats i probables, 6.299 nous casos de legionel·losi. Aquestes dades recollides per l'EWGLI van ser proporcionades per 29 països diferents, d'entre ells França, Itàlia i Espanya acumularen un 62% dels casos descrits. La taxa de casos confirmats l'any 2010 es va estimar en 1.16 per 100.000 habitants (ECDC 2013).

Generalment, apart de tipus d'afectació clínica, la legionel·losi també es pot classificar en funció de la forma d'adquisició, d'aquesta manera trobem (Bartram *et al.* 2007):

- Adquisició a nivell domèstic i casos esporàdics

Aquests casos, aproximadament un 2% del total, s'associen a l'aigua potable domèstica i a interrupcions en els sistemes de canonades per on es distribueix l'aigua potable (Straus *et al.* 1996).

- Adquisició com a malaltia nosocomial en hospitals o altres institucions de salut.

Representa el 8% dels casos de legionel·losi l'any 2010 (ECDC 2013). Es considera que una persona ha adquirit legionel·losi de manera nosocomial, si va ingressar en un centre sanitari un mínim de 10 dies abans de l'aparició dels símptomes. Els factors de risc per contraure legionel·losi nosocomial inclouen una cirurgia recent, intubació o us de ventilació mecànica, aspiració i la utilització d'equipament per fer teràpia respiratòria (Bartram *et al.* 2007). L'augment del nombre de casos adquirits de forma nosocomial està relacionat amb el desenvolupament de tècniques de diagnòstic de ràpida aplicació i a la presència de *Legionella* al sistema de distribució d'aigua dels hospitals (Straus *et al.* 1996, Sabria *et al.* 2002). La taxa de mortalitat de legionel·losi nosocomial sol ser superior als altres tipus arribant 50% dels casos depenent de l'estat immunològic dels pacients (Swanson *et al.* 2000).

- Adquisició associada a viatges

Representa el 20% de les legionel·losi comunicades l'any 2010 i va ser un dels motius principals per la creació de l'EWGLI. Generalment, aquests casos es detecten al país de residència dels viatgers un cop han tornat de la seva estada a l'estranger. Engloba aquells casos on la simptomatologia es produeix entre 2 i 10 dies després de que la persona afectada hagi passat un mínim de una nit en un hotel o qualsevol altre tipus d'allotjament públic (Joseph *et al.* 2010).

- Adquisició de forma comunitària

Són tots aquells casos no adquirits en els casos descrits anteriorment. Representen la forma més comú d'adquisició, l'any 2010 el 71% dels casos van ser adquirits d'aquesta manera (ECDC 2013) i representa entre el 2-15% de les hospitalitzacions (Stout *et al.* 1997).

A Catalunya, els casos de legionel·losi, tant els esporàdics com els brots comunitaris es distribueixen al llarg de l'any, tot i que la majoria de processos epidèmics on hi ha implicat un volum més gran de persones afectades es produeixen a finals de l'estiu i a la tardor. Això és degut al fet de que els microorganismes proliferen millor en ambients aquàtics durant els mesos de calor, degut al augment generalitzat de la temperatura. En el cas dels brots nosocomials produïts en hospitals amb subministrament d'aigua potable escalfada, els casos no presenten una estacionalitat ja que es distribueixen al llarg de tot l'any (Generalitat de Catalunya 2001).

5.5 Taxonomia

La Família *Legionellaceae* està formada per un sol Gènere, *Legionella*, descrit com un subgrup monofilètic dins la subdivisió 2 dels γ -Proteobacteris (Fry *et al.* 1991). Tot i que alguns autors van proposar en un principi dividir la Família *Legionellaceae* en tres gèneres diferents *Legionella*, *Fluoribacter* i *Tatlockia* estudis a nivell molecular del 16S rRNA van confirmar que el *Legionella* era l'únic gènere de la família (Fields *et al.* 2002). Filogenèticament, el grup més proper a la família *Legionellaceae* és *Coxiella burnetii* agent etiològic de la febre Q (Swanson *et al.* 2000, Fields *et al.* 2002). Ambdós grups es caracteritzen per tenir un estat intracel·lular al llarg del seu cicle de vida i podrien tenir en comú gens associats al procés d'infecció dels seus hostes (Fields *et al.* 2002).

Legionella pneumophila va ser la primera espècie descrita del gènere *Legionella* i n'és considerada l'espècie tipus. *L. pneumophila* és responsable de més del 90% dels casos clínics de pneumònia atípica, de quals el 92% són causats per *L. pneumophila* serogrup 1. Cal tenir en compte però, que aquesta xifra podria estar esbiaixada degut a que les proves de diagnòstic disponibles són han estat dissenyades per a la detecció de *L. pneumophila* en detriment de les altres espècies (Fields *et al.* 2002).

Actualment es coneixen 50 espècies diferents de *Legionella* dividides en 70 serogrupos. Tot i que algunes d'aquestes espècies s'han descobert a partir de casos clínics de legionel·losi, moltes d'elles no han estat mai associades a malalties causades en humans.

Malgrat que actualment hi ha descrites 70 espècies del gènere *Legionella*, hi ha un grup de bacteris que tot i provocar malalties que cursen una simptomatologia com la legionel·losi no

s'han pogut cultivar en el medi de cultiu clàssic pel creixement de *Legionella*. Aquests bacteris, aïllats i mantinguts mitjançant co-cultius amb amebes, es denominen *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAPs).

L'anàlisi fil·logenètic de les seqüències del gen 16S rRNA obtingudes d'aquests LLAPs confirmen que apart de causar simptomatologies molt semblants, aquests bacteris també mostren una relació evolutiva molt propera al gènere *Legionella* (Birtles *et al.* 1996).

Taula 1.3. es mostren les 50 espècies que conformen el gènere *Legionella* fins a l'actualitat, els seus serogrups i aquelles espècies relacionades amb malalties humanes (Fields *et al.* 2002, Bartram *et al.* 2007).

Espècies	Serogrups	Associació amb casos clínics	Espècies	Serogrups	Associació amb casos clínics
<i>L. adalaidensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. lansingensis</i>	1	Sí
<i>L. anisa</i>	1	Sí	<i>L. londiniensis</i>	2	Desconeguda
<i>L. beliardensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. longbeachae</i>	2	Sí
<i>L. birminghamensis</i>	1	Sí	<i>L. lytica</i>	1	Desconeguda
<i>L. bozemanii</i>	2	Sí	<i>L. maceachernii</i>	1	Sí
<i>L. brunensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. micdadei</i>	1	Sí
<i>L. busanensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. moravica</i>	1	Desconeguda
<i>L. cherrii</i>	1	Desconeguda	<i>L. nautarum</i>	1	Desconeguda
<i>L. cincinnatiensis</i>	1	Sí	<i>L. oakridgensis</i>	1	Sí
<i>L. drozanskii</i>	1	Desconeguda	<i>L. parisiensis</i>	1	Sí
<i>L. dumoffii</i>	1	Sí	<i>L. pneumophila</i>	16	Sí
<i>L. drancourtii</i>	1	Desconeguda	<i>L. quateirensis</i>	1	Desconeguda
<i>L. erythra</i>	2	Sí	<i>L. quinlivanii</i>	2	Desconeguda
<i>L. fairfieldensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. rowbothamii</i>	1	Desconeguda
<i>L. fallonii</i>	1	Desconeguda	<i>L. rubrilucens</i>	1	Desconeguda
<i>L. feeleii</i>	2	Sí	<i>L. sainthelensi</i>	2	Sí
<i>L. geestiana</i>	1	Desconeguda	<i>L. santicrucis</i>	1	Desconeguda
<i>L. genomospecies 1</i>	1	Desconeguda	<i>L. shakespearei</i>	1	Desconeguda
<i>L. gormanii</i>	1	Sí	<i>L. spiritensis</i>	2	Desconeguda
<i>L. gratiana</i>	1	Desconeguda	<i>L. steigerwaltii</i>	1	Desconeguda
<i>L. gresilensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. taurinensis</i>	1	Desconeguda
<i>L. hackeliae</i>	2	Sí	<i>L. tusconensis</i>	1	Sí
<i>L. israelensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. wadsworthii</i>	1	Sí
<i>L. jamestowniensis</i>	1	Desconeguda	<i>L. waltersii</i>	1	Desconeguda
<i>L. jordanis</i>	1	Sí	<i>L. worsleiensis</i>	1	Desconeguda

5.6 Morfologia i fisiologia

El gènere *Legionella* està format per bacils Gram negatius, no encapsulats, mòbils gràcies a un flagell en disposició polar o lateral i no formadors d'espores. La seva mida oscil·la entre 0.3-1µm d'amplada i entre 1.5-5µm de llarg (Harrison *et al.* 1988a, Fields *et al.* 2002).

La membrana microbiana de *Legionella*, molt característica d'aquest gènere i diferent de la resta de bacteris Gram negatius, en la seva part més externa està formada per cadenes ramificades d'àcids grassos i una gran quantitat de ubiquinones amb més de deu unitats d'isoprenoïds a les cadenes laterals (Harrison *et al.* 1988a). La quantitat i disposició de les cadenes d'àcids grassos juntament amb els patrons de proteïnes, la serologia i les seqüències d'àcids nucleics són els criteris utilitzats per classificar les espècies que conformen el gènere *Legionella* (Fields *et al.* 2002).

La principal font de carboni del gènere *Legionella* són els aminoàcids. Tot i això, perquè aquests bacteris creixin en medis de cultiu artificials és imprescindible que aquests continguin L-cisteïna i ferro en forma de pirofosfat fèrric (Harrison *et al.* 1988a). Les proves bioquímiques per identificar el gènere *Legionella* són ureasa negativa, reducció de nitrats negativa, catalasa positiva i poden donar resultats variables a la prova de la oxidasa (Benson *et al.* 1998). Es tracta de bacteris amb metabolisme aerobi, tot i que les seves condicions òptimes de creixement es donen en estats de microaerofília amb un 2,5% de CO₂.

Legionella és un gènere conegut per sobreviure a condicions ambientals força extremes comparat amb altres bacteris. La seva temperatura òptima de creixement es troba entre 35°C i 37°C, tot i que s'ha aïllat de sistemes hídrics amb un ampli rang de temperatures que oscil·len entre 20°C i 63°C (Lück *et al.* 1993, García-Fulgueiras *et al.* 2003, Borella *et al.* 2005b, Buse *et al.* 2012, Serrano-Suárez *et al.* 2013). La taxa de multiplicació de *Legionella* disminueix a mesura que ho fa la temperatura per sota dels 37°C, a temperatures inferiors als 20°C ja no s'observa creixement (Bartram *et al.* 2007).

Aquest gènere bacterià, és àcid tolerant, capaç de resistir a pH 2 durant un període curt de temps. El pH òptim dels medis de cultiu al laboratori varia entre 6.6-6.9, tot i això, s'ha aïllat *Legionella* de fonts ambientals amb un rang de pH entre 5.5-8.3 (Anand *et al.* 1983).

Alguns estudis atribueixen la supervivència de *Legionella* al sistema de distribució a mecanismes de resistència tal com una membrana cel·lular complexa, la formació de biofilms i la interacció d'aquests amb els protozous (Liu *et al.* 2012).

5.7 Mesures de control i prevenció de la legionel·losi

Tal com hem explicat amb anterioritat, *Legionella* és un bacteri de distribució mundial present en tot tipus d'ambients aquàtics capaç de sobreviure en condicions extremes. Tot i això, els nombrosos casos de Legionel·losi produïts al llarg dels anys no es relacionen amb aigües ambientals sinó amb sistemes artificials de distribució d'aigua creats per l'home. *Legionella* troba en aquests ambients, especialment els que utilitzen aigua calenta, l'hàbitat per multiplicar-se i disseminar-se (Declerck *et al.* 2009).

Per tant, donat que la legionel·losi és una malaltia associada a ambients creats per l'home, hauria de ser possible aplicar una sèrie de mesures per fer-ne una prevenció.

En general, la OMS recomana dins la guia pel manteniment de la qualitat de l'aigua potable que es prenguin en consideració especial els grans edificis i algunes instal·lacions relacionades com les torres de refrigeració i els condensadors evaporatius. Hospitals, geriàtrics i altres instal·lacions relacionades amb la salut, escoles, hotels, complexos esportius i altres gran edificis que degut a la seva gran complexitat de xarxes d'aigua i a la sensibilitat dels seus usuaris són el principal focus d'actuació (Bartram *et al.* 2007, Mouchtouri *et al.* 2007).

Les mesures de prevenció de la legionel·losi comencen, a nivell arquitectònic i de disseny dels edificis i xarxes de distribució, juntament amb altres estratègies dissenyades per minimitzar el creixement de biofilms i un control de la temperatura poden minimitzar el risc potencial de *Legionella* spp. referent a la temperatura, la OMS recomana mantenir-la fora del rang entre 25-50°C quan sigui possible (WHO 2008). Als sistemes d'aigua calenta però, recomana que la temperatura d'emmagatzemament sigui superior als 55°C i que aquesta es mantingui similar al llarg de tot el sistema de canonades controlant el risc d'escaldament dels usuaris. Pels sistemes on la temperatura no es pot mantenir fora del rang indicat, el control de *Legionella* i la formació de biofilms es pot realitzar a través de l'ús de desinfectants.

En paral·lel a les recomanacions de la OMS, en els darrers anys, nombrosos països han seguit recomanacions, redactat lleis i aplicat normatives més o menys restrictives pel control de *Legionella* i la prevenció de la legionel·losi.

A nivell europeu, per exemple, els països amb legislació sobre *Legionella* són: Alemanya, Anglaterra (i Gal·les), Àustria, Bèlgica, Bulgària, Croàcia, Eslovènia, Espanya, Finlàndia, França, Hongria, Irlanda, Itàlia, Letònia, Lituània, Malta, Països Baixos, Polònia, Portugal, Suècia i Turquia (Bartram *et al.* 2007).

A l'Estat Espanyol, l'any 2003 es redactà el Real Decreto 865/2003: “*por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis*” (BOE 2003a). L'objectiu del qual consisteix en la prevenció i control de la legionel·losi mitjançant l'adopció de mesures higièniques i sanitàries en aquelles instal·lacions en que *Legionella* és capaç de proliferar i disseminar-se.

Les mesures descrites al RD s'apliquen en funció del risc associat a cada tipus d'instal·lació, així com el manteniment i la responsabilitat dels titulars de les instal·lacions, les actuacions a realitzar davant la detecció de casos de legionel·losi tant a nivell humà com a nivell d'instal·lacions, i les mesures correctives aplicables si no es compleix la normativa .

Les mesures per la prevenció de la legionel·losi descrites al RD 865/2003 pel que fa a l'aigua de consum a l'interior dels edificis són (BOE 2003a):

- a) Garantir una total estancitat i una correcte circulació de l'aigua evitant-ne l'estancament, així com disposar de suficients punts de purga per buidar completament la instal·lació i permetre l'eliminació completa dels sediments.
- b) Disposar a l'escomesa de sistemes de filtració segons la norma UNE-EN 13443-1.
- c) Facilitar l'accessibilitat als equips per la seva inspecció, neteja, desinfecció i presa de mostres.
- d) Utilitzar materials, en contacte amb l'aigua de consum humà, capaços de resistir una desinfecció mitjançant elevades concentracions de clor o d'altres desinfectants, així com altes temperatures, evitant aquells que afavoreixin el creixement microbià i la formació de biofilms a l'interior de les canonades.
- e) Mantenir la temperatura al circuit d'aigua freda, allà on les condicions climatològiques ho permetin per sota dels 20°C. Les canonades estaran suficientment aïllades de l'aigua calenta on el seu defecte, aïllades tèrmicament.
- f) Garantir que, si la instal·lació interior d'aigua freda de consum disposa de dipòsits, aquests estiguin tapats amb una coberta impermeable que ajusti perfectament i que permeti l'accés a l'interior. Si es troben situats a l'aire lliure, estaran tèrmicament aïllats i en cas que s'usi el clor com a desinfectant, s'afegirà si és necessari, al dipòsit mitjançant dosificadors automàtics.
- g) Assegurar que tota l'aigua emmagatzemada als acumuladors d'aigua calenta finals, és a dir, immediatament anteriors al consum, una temperatura homogènia i evitar el refredament en zones interiors que propiciïn la formació i proliferació de flora bacteriana.
- h) Disposar d'un sistema de vàlvules de retenció segons la norma UNE-EN 1717, que evitin el retorn de l'aigua per pèrdua de pressió o disminució del caudal subministrat i

en especial, per evitar mescles d'aigua de diferents circuits, qualitats i usos quan sigui necessari.

- i) Mantenir la temperatura de l'aigua en el circuit d'aigua calenta per sobre dels 50°C al punt més allunyat del circuit o a la canonada de retorn a l'acumulador. La instal·lació permetrà que l'aigua arribi als 70°C.
- j) Quan s'utilitzi un sistema d'aprofitament tèrmic en el que hi hagi un acumulador que conté aigua que serà consumida i en el que no es pugui assegurar de forma contínua una temperatura propera als 60°C, es garantirà posteriorment, que aquesta aigua arribi a 60°C en un altre acumulador final abans de la distribució cap al consum.

Però malgrat els esforços per evitar l'aparició de nous casos i brots de legionel·losi, aquest es continuen produint. I és que el control de *Legionella*, presenta força complicacions com el fet que tot i que molts autors han realitzat estudis per intentar trobar els factors tant físico-químics com microbiològics que influencien la colonització dels sistemes hídrics per part de *Legionella* (Codony *et al.* 2002, Borella *et al.* 2005a, Mouchtouri *et al.* 2007, Bargellini *et al.* 2011, Serrano-Suárez *et al.* 2013) les correlacions indiquen que no es deu a un factor determinat sinó que es deu a una combinació de múltiples factors; així com el fet que els tractaments de desinfecció s'apliquen contra múltiples dianes: *Legionella* planctònica, tots els bacteris presents, bacteris dins de biofilms, protozous, etc. Alguns autors apunten a que aquesta resistència a l'interior de protozous als tractaments de desinfecció podria ser la principal causa de recolonització dels sistemes per part de *Legionella* (Thomas *et al.* 2004).

6. Amebes de vida lliure

Els protozous, són un grup molt divers d'eucariotes unicel·lulars. Les relacions que estableixen amb altres microorganismes com els bacteris són conegudes des de fa molts anys. Tot i això, en aquest treball ens hem volgut centrar en un grup determinat de protozous que ha anat guanyant importància ens els darrers anys per restablir relacions endosimbiòtiques amb bacteris patògens com *Legionella*, es tracta de les amebes de vida lliure.

Les amebes de vida lliure o en anglès anomenades “free-living amoeba” (FLA) són un grup heterogeni de microorganismes eucariotes unicel·lulars que comparteixen característiques morfològiques i de comportament i que habiten sota un ampli rang de condicions ambientals. Les FLA viuen a les diferents interfases: aigua-sòl, aigua-animal, aigua-planta, aigua-aire, etc (Rodríguez-Zaragoza 1994). Al sòl, les FLA són més abundants a la interfase planta-terra on cohabituen amb altres paràsits bacterians i fúngics de les arrels de la planta dels qual s'alimenten.

A l'aigua, mentre algunes espècies de FLA disposen d'una forma flagel·lada, altres s'adhereixen a partícules de matèria orgànica en suspensió que els fan de nutrients (Greub *et al.* 2004).

En l'actualitat s'han identificat 11,300 espècies amebianes (Maciver) (<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/amoebae.htm>). La seva distribució als ecosistemes tant a nivell d'espècie com de concentració cel·lular, depèn de les capacitats de cada ameba per sobreviure als diferents ambients biòtics com abiòtics. Un dels factors que més a influenciat la seva distribució i supervivència als diferents ambients és la formació d'unes estructures de resistència anomenades cists.

La majoria d'amebes de vida lliure alternen entre dues formes de vida, els trofozoïts, la forma vegetativa on l'ameba s'alimenta i es multiplica per fissió binària, i els cists la forma de resistència. Algunes espècies com *Naegleria* tenen a més, una forma flagel·lada addicional, i altres com *Mayorella* i *Amoeba* són es amebes no formadores de cists (Greub *et al.* 2004).

Els cists, solen ser estructures de doble paret, formades per l'ectocist o capa més externa i l'endocist, la més interna. Entre les dues anteriors hi ha el mesocist que només és present a determinades espècies. La morfologia de les parets cístiques, és diferent a cada gènere i espècie, d'aquí que s'hagi utilitzat com a criteri taxonòmic (Fouque *et al.* 2012). El pas d'una forma de vida a l'altre ve determinada per un canvi en les condicions ambientals, quan aquestes no són favorables ja sigui per canvis en el pH, pressió osmòtica, temperatura o dèficit de nutrients aquestes s'encisten. El desencistament es produeix quan les condicions ambientals tornen a ser favorables (Greub *et al.* 2004).

La nutrició de les FLA és variable, doncs s'alimenten de bacteris, fongs, algues i d'altres protozoous, fins i tot d'altres amebes via fagocitosi (Rodríguez-Zaragoza 1994, Loret *et al.* 2010). Un cop fagocitats els bacteris es digereixen en vacúols denominats fagosomes. Alguns d'aquests bacteris però, han evolucionat desenvolupant diferents estratègies per evitar la depredació per part de les amebes, o bé evitant ser fagocitats o bé sent resistents a la digestió amebiana. Alguns fins i tot són capaços d'aprofitar les estructures amebianes per multiplicar-se al seu interior i tornar a ser alliberats de nou al medi (Rowbotham 1980, Rodríguez-Zaragoza 1994, Thomas *et al.* 2004, Loret *et al.* 2010).

Els bacteris resistents a la digestió amebiana es denominen bacteris resistents d'amebes "amoeba resisting bacteria" (ARB), d'entre ells el més conegut és *Legionella*, però també n'hi ha d'altres: *Pseudomonaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Mycobacteriaceae*, etc. Els bacteris però, no són els únics que han desenvolupat estratègies de resistència vers les amebes, Mimivirus i Enterovirus també s'han detectat a l'interior d'aquestes. L'any 2004, Greub i Raoult (Greub *et*

al. 2004) van publicar una revisió extensa sobre aquest fenomen i els diferents microorganismes que hi participen.

La denominació d'amebes de vida lliure serveix per diferenciar-les de l'altre grup d'amebes, les amebes paràsites. La distinció entre unes i altres es basa en el fet que les segones no poden sobreviure sense un hoste que les mantingui mentre que les primeres tot i que poden adoptar relacions de parasitisme amb determinats hostes, no el necessiten per sobreviure (Schuster *et al.* 2004). Les amebes paràsites són per definició les més estudiades ja que han utilitzat als humans com a hostes i per tant, tenen un risc elevat pel que fa a la salut humana. Tot i això, algunes amebes de vida lliure s'han identificat com a patògens accidentals humans al compartir hàbitat, a aquestes amebes també se les anomena amfizoïques (Visvesvara *et al.* 2007).

La taxonomia de les FLA s'han anat revisant diverses vegades al llarg dels anys, incorporant les noves dades obtingudes mitjançant estudis de seqüenciació genòmica. Des de la International Society of Protozoologists l'any 2005 van proposar una nova manera de classificar-les tenint en compte la morfologia, la bioquímica i les dades moleculars disponibles per cada espècie. Segons això, les FLA es divideixen en dos Supergrups (Trabelsi *et al.* 2012):

- Supergrup Amebozoa que inclou gèneres com *Acanthamoeba*, *Balamuthia* i *Sappinia*
- Supergrup Excavata que inclou el gènere *Naegleria* i *Vahlkampfia* entre d'altres.

6.1 Malalties associades a les amebes de vida lliure

Naegleria fowleri, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* i *Sappinia diploidea* són quatre de les amebes de vida lliure associades amb malalties severes en humans (Schuster *et al.* 2004, Qvarnstrom *et al.* 2006, Qvarnstrom *et al.* 2009).

D'entre elles *N. fowleri* és la més virulenta i l'agent etiològic de l'anomenada Meningoencefalitis primària amebiana (en anglès, “*primary amebic meningoencephalitis*”, PAM). La PAM és una infecció fulminant que afecta el sistema nerviós i que generalment acaba amb la mort del pacient al cap d'una o dues setmanes de l'aparició dels primers símptomes (Martinez *et al.* 1997, Marciano-Cabral 2003).

La infecció es produeix mitjançant l'entrada de *N. fowleri* a través de la mucosa de la via nasal quan els humans entren en contacte amb aigua contaminada. El risc de contraure PAM, depèn principalment de la concentració de *N. fowleri* a l'aigua (Behets *et al.* 2007). Fins a l'any 2002, s'havien reportat més de 200 casos de PAM a nivell mundial afectant principalment nens i adults joves. El ràpid diagnòstic d'aquesta malaltia ha resultat clau per la recuperació d'alguns casos mitjançant l'administració d'amfotericina B (Qvarnstrom *et al.* 2006).

Una de les últimes espècies de FLAM en incorporar-se a la llista d'amebes amb una forma de vida amfizoica és *Sappinia* spp. descrita com a possible causant d'encefalitis amebiana en humans l'any 2001 (Gelman *et al.* 2001). L'existència d'aquest cas podria ajudar a identificar els agents etiològics d'altres encefalitis fins ara d'origen desconegut (Walochnik *et al.* 2010).

D'altra banda *Acanthamoeba* spp. i *Balamuthia*, són dues amebes de reconeguda patogenicitat relacionades filogenèticament i de morfologia similar. Ambdues infecten primàriament individus immunocompromesos a través de la inhalació o en contacte amb ferides de la pell. A través d'infeccions localitzades originades al punt d'entrada, poden arribar al sistema nerviós central per una disseminació vascular i causar lesions al cervell. El resultat és una malaltia denominada Encefalitis granulomatosa amebiana (en anglès “*granulomatous amebic encephalitis*”, GAE), que a diferència de la PAM abans descrita, és una malaltia sub-aguda o crònica (Trabelsi *et al.* 2012).

Els símptomes de la GAE són confusió, mareig, somnolència, epilèpsia, mal de cap i una reducció del nivell de consciència. Fins a l'any 2002, hi havia reportats més de 240 casos de GAE, la majoria d'ells letals (Qvarnstrom *et al.* 2006).

Però apart de la GAE, les espècies del Gènere *Acanthamoeba* s'associen també amb queratitis oculars a persones que porten lents de contacte o persones que hagin sofert un trauma als ulls. El nombre de persones diagnosticades amb queratitis causada per *Acanthamoeba* ha incrementat dramàticament durant els últims vint anys. S'estima que als EEUU, s'han produït més de 3.000 casos durant aquest període de temps (Qvarnstrom *et al.* 2006).

6.2 El Gènere *Acanthamoeba*

AMEBOZOA Lühe, 1913, corregit. Cavalier-Smith 1998 [Eumycetozoa Zopf 1884, corregit Olive 1975]

- Discosea, Cavalier-Smith i col., 2004
 - Longamoebia Cavalier-Smith & Smirnov a Smirnov i col., 2011
 - Centramoebida Rogerson & Patterson 2002, corregit per Cavalier-Smith 2004

Classificació estreta de (Adl *et al.* 2012).

Acanthamoeba és una de les amebes més comuns al medi, o fins i tot el protozou més comú al sòl i l'aigua (Page 1988). La seva distribució és cosmopolita i s'ha aïllat d'ambients tant diversos com aigua salobre i aigua de mar, sorra de platja, aigua residual i sòls tant variables com d'ambients tropicals amb temperatures superiors a 37°C i de regions àrtiques (Trabelsi *et al.* 2012). La seva àmplia distribució permet que comparteixi hàbitat amb els humans, però tot i els

Introducció

múltiples encontres amb aquests, la acanthamoebiasis es produeix rarament i excepte la queratitis ocular, es limita a persones immunocompromeses.

El trofozoït d'*Acanthamoeba* d'entre 8-40µm de mida es caracteritza per tenir uns pseudopodis en forma de dit, altrament anomenats acantopodis que es projecten de l'exterior de la superfície cel·lular. La funcionalitat d'aquests està relacionada amb el moviment i locomoció de l'ameba així com amb la nutrició. El nucli és vesicular i conté un gran nuclèol a la zona central (Lorenzo-Morales *et al.* 2013).

El cist de mida entre 8-29µm, està compost per una estructura de doble paret l'ectocist i l'endocist. La composició exacta d'aquestes dues capes és encara desconeguda però se sap que com a mínim contenen proteïnes insolubles als àcids i cel·lulosa (Fouque *et al.* 2012, Lorenzo-Morales *et al.* 2013). Al llarg de la doble membrana, hi ha una sèrie de porus anomenats ostíols que són utilitzats per l'ameba per emergir i reprendre el creixement tròfic.

Diversos estudis han trobat una correlació entre l'encistament, pas de trofozoït a cist on l'ameba augmenta la quantitat de residus insolubles alcalins com la cel·lulosa i l'adquisició de resistències a diferents biocides (Turner *et al.* 2000, Coulon *et al.* 2010).

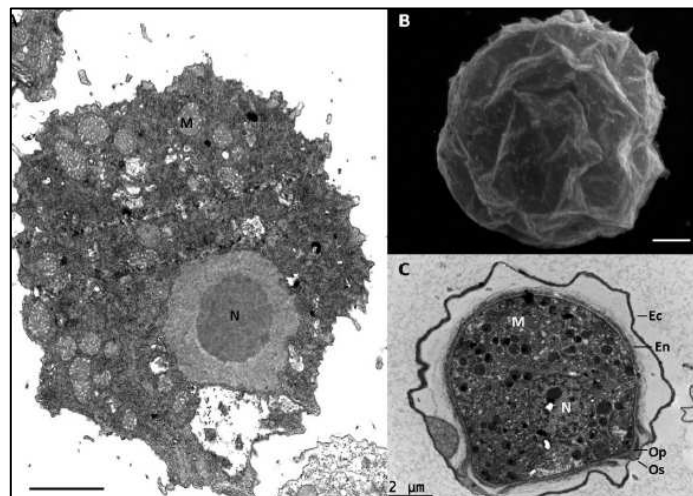


Figura 1.6. Figura extreta de Fouque *et al.* (2012). **(A)** Trofozoït d'*Acanthamoeba* sp. Imatge obtinguda per Microscopia Electrònica de transmissió (MET). **(B)** Imatge d'un cist d'*Acanthamoeba* sp. Obtinguda per Microscopia electrònica de rastreig. **(C)** Imatge d'un cist d'*Acanthamoeba* sp. Obtinguda per MET.

Ec, ectocist; **En**, endocist; **M**, mitocondris; **N**, nucli; **Op**, opercle; **Os**, ostíol. Escala 2 µm.

Actualment es coneixen unes 24 espècies d'*Acanthamoeba*, el criteri taxonòmic més utilitzat per diferenciar-les és la morfologia dels cists (Pussard 1977). Segons aquesta classificació podem diferenciar el gènere *Acanthamoeba* en tres grups (Visvesvara *et al.* 2007, Trabelsi *et al.* 2012):

- Grup I: format per 4 espècies, *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* i *A. tubiashi*. Aquestes amebes es caracteritzen per tenir trofozoïts i cists grans (de 18 a 26 µm) amb endocists de forma estrellada àmpliament separat de l'ectocist que pot ser llis o arrugat.
- Grup II: format per 11 espècies, *A. mauritanensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. triangularis*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhysodes*, *A. paradiuionensis* i *A. hatchetti*. Aquestes amebes es caracteritzen per tenir cists petits, de mida inferior a 18 µm amb endocists de forma polièdrica, globular, ovoide o estrellada i un ectocist tant prim com gruixut ondulat.
- Grup III: format per 5 espècies, *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* i *A. pustulosa*. Aquestes amebes tenen cists més petits de 19 µm amb endocists globulars o ovoides i d'ectocists llis o ondulat.

Les amebes del Grup II són les més abundants a la natura i inclou la majoria de les espècies aïllades més habitualment i potencialment patogèniques com *A. castellanii* i *A. polyphaga* (Stothard *et al.* 1998).

Tot i això aquesta classificació es va desestimar amb l'aparició d'estudis que indiquen que la morfologia dels cists depèn de les condicions de cultiu amb les que es facin créixerà (Trabelsi *et al.* 2012). En l'actualitat el sistema de classificació més acceptat per la comunitat científica és a partir de la seqüenciació dels gens de la regió 18S rRNA. Basant-se en la variació de seqüències, s'ha dividit el Gènere *Acanthamoeba* en 17 genotips diferents (T1-T17) els qual tenen una divergència d'un 5% o més entre ells. Malgrat això, la patogenicitat d'*Acanthamoeba* es pot limitar a certs genotips i la majoria de genotips aïllats responsables de causar infeccions en humans s'associen amb el genotip T4 (Trabelsi *et al.* 2012).

Entre les infeccions causades per *Acanthamoeba*, tot i la gravetat de les que afecten al sistema nerviós central com la GAE, la queratitis per *Acanthamoeba* (AK) ha anat prenent més importància degut a la greu amenaça que representa per a la vista i el nombre de casos produïts per tot el món. Encara que l'ús de lents de contacte és el principal factor de risc per patir AK, hi ha un gran nombre de pacients que no en porten.

El diagnòstic de l'AK és encara un repte ja que i els tractaments disponibles són llargs i no totalment eficaços contra totes les soques d'*Acanthamoeba*.

La patogènesi d'*Acanthamoeba* és encara un factor a estudiar, sobretot la identificació dels factors clau que intervenen en aquest procés que permetria el desenvolupament de tractaments molt més efectius (Lorenzo-Morales *et al.* 2013). Ja que malgrat els avenços en la quimioteràpia, el tractament de les malalties causades per *Acanthamoeba* tenen resultats difícils i els agents terapèutics aplicats són sovint decebedors, a causa de, entre d'altres coses, l'alta resistència de la

amebes als medicaments antimicrobians i antiparasitaris així com el desenvolupament de resistències als medicaments i l'alta toxicitat deguda a les altes concentracions de fàrmac per als éssers humans (Chomicz *et al.* 2010).

Però apart de la patogenicitat intrínseca de l'ameba, *Acanthamoeba* sp. ha despertat d'interès de la comunitat científica des de que es va descobrir la seva implicació com a hoste i vector de bacteris patògens com *Legionella*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium avium*, *Burkholderia* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori*, *Afipia felis* i *Escherichia coli* serotip O157 (Greub *et al.* 2004, Visvesvara *et al.* 2007). Una prova de la importància de les relacions endosimbiòtiques que s'estableixen entre bacteris i amebes de vida lliure com *Acanthamoeba* tant als sistemes hídrics com als sòls és que aproximadament entre un 20-24% dels aïllats clínics i ambientals d'aquest gènere analitzats per Fritsche *et al.* (2000) contenien bacteris intracel·lulars.

Per tant, les amebes del gènere *Acanthamoeba* ja siguin elles mateixes patògenes o com a vectors de bacteris patògens poden representar una amenaça significativa per a la salut pública. No obstant això, un control de les FLA en sistemes d'aigua artificials hauria de permetre reduir el nombre de casos de queratitis així com un millor control entre les associacions establertes entre *Acanthamoeba* i patògens emergents (Loret *et al.* 2010).

6.3 El Gènere *Hartmannella* (*Vermamoeba*)

AMEBOZOA Lühe, 1913, corregit. Cavalier-Smith 1998 [Eumycetozoa Zopf 1884, corregit Olive 1975]

Amebes de la família *Hartmannellidae* definida per Volkonsky, l'any 1931 actualment ocupen quatre posicions molt diferents a l'arbre filogenètic, per tant es tracta clarament d'una família parafilètica. El cas més notable és *Hartmannella vermiformis*, que en totes les publicacions sobre fil·logènia d'amebes s'agrupa amb *Echinamoeba* diferent dels altres hartmannellids.

I és que *H. vermiformis* es diferencia significativament de totes les altres espècies d'*Hartmannella* spp. per tenir forma de cuc en lloc de claviforme, amb una relació longitud/amplada general de més de 6. Degut a aquesta àmplia divergència, es va establir un nou Gènere, *Vermamoeba* i Família *Vermamoebidae* dins del nou ordre *Echinamoebida* per classificar-la (Smirnov *et al.* 2011).

Hartmannella vermiformis és una espècie d'ameba de vida lliure molt estesa a la natura que s'ha aïllat del sòl, aigua dolça, aire i una gran varietat de sistemes hídrics. Com moltes amebes de

vida lliure te dues formes de vida, la forma activa que s'alimenta i es multiplica per fissió binària, el trofozoït i la forma de resistència, el cist.

A diferència d'altres amebes, hi ha pocs estudis sobre la composició de les parets que conformen els cists d'*H. vermiformis* com el de Upadhyay *et al.* (1984). En aquest estudi s'apunta que els majors components de les parets són proteïnes amb un polímer de glucosa present en poca quantitat. Així doncs, al igual que passa amb *Naegleria*, els cists d'*Hartmannella* no es poden tenir amb colorants específics de cel·lulosa, fet que suggereix que aquest no està present a les parets dels cists (Fouque *et al.* 2012). Sobre la morfologia dels cists, Smirnov *et al.* (1999) va publicar un estudi on descriuen que els cists *H. vermiformis* estaven formats per un endocist de 50 nm de gruix i un ectocist d'entre 110-140 nm de gruix format per una multicapa de material filamentós.

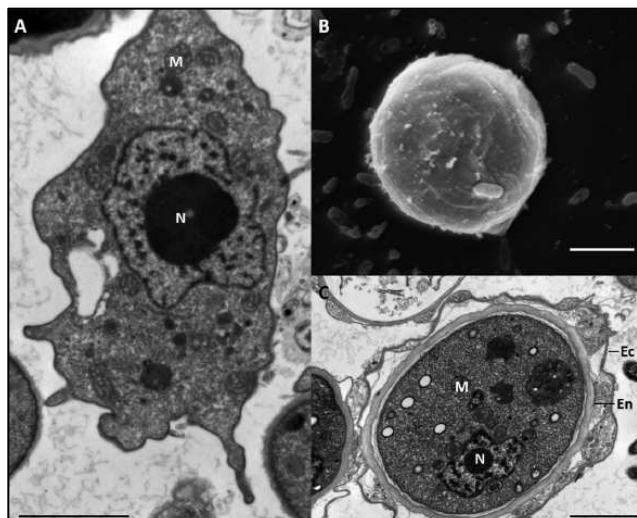


Figura 1.7. Imatge obtinguda de Fouque *et al.* (2012). **(A)** Imatge d'un trofozoït d'*Hartmannella* sp. obtinguda mitjançant MET; **(B)** Imatge d'un cist d'*Hartmannella* sp., obtinguda mitjançant MER, **(C)** Imatge d'un cist d'*Hartmannella* sp. obtinguda mitjançant MET. **Ec**, ectocist; **En**, endocist; **M**, mitocondri; **N**, nucli. Barres d'escala de 2µm.

Tot i que històricament *H. vermiformis* no s'havia relacionat amb patogènia, darrerament aquesta ameba ha estat aïllada de líquid cerebroespinal d'un pacient amb meningoencefalitis i broncopneumònia (Behets *et al.* 2007). A més, alguns autors apunten a que aquesta ameba podria ser també la responsable d'alguns casos de queratitis ocular, encara que hi ha certa controvèrsia respecte a aquest fet (Kuiper *et al.* 2006).

El Gènere *Hartmannella* és un dels gèneres més abundants i habitualment aïllats als sistemes de distribució d'aigua potable i a l'aigua de les torres de refrigeració. Aquest fet accentua la

importància del rol que juguen les amebes en el manteniment de poblacions de bacteris patògens als sistemes hídrics (Buse *et al.* 2013).

7. Tractaments de desinfecció de l'aigua

Un dels mètodes de desinfecció de l'aigua de consum més àmpliament utilitzat al nostre país és la cloració. Tot i això, altres tractaments com el tèrmic també s'utilitzen quan el sistema a tractar són aigües calentes. Pel que fa a altres països europeus i donada l'alta qualitat de l'aigua provinent de les fonts de captació, l'aigua és tractada mitjançant radiació UV.

Generalment aquests tres desinfectants, són més eficaços reduint la concentració bacteriana, en comparació amb el protozous que es veuen generalment menys afectats degut a la composició química de les seves membranes, el fet de tenir dos formes de vida, els mecanismes de transport cel·lular, etc (Taylor *et al.* 2009). La supervivència dels protozous afecta directament a la supervivència de *Legionella*, ja que tal i com hem mencionat anteriorment actuen com a escut protector del bacteri patogen i podrien donar lloc a recolonitzacions del sistema de distribució (Kuiper *et al.* 2004, Storey *et al.* 2004a).

7.1 Mètode de desinfecció química, la cloració

Al segle XIX, molts científics de l'època tenien la creença que la olor era responsable de causar i transmetre malalties, així doncs, productes químics com el clor eren utilitzats com a desodorants (Lofrano *et al.* 2010). No va ser fins a finals dels anys 1880 quan es va demostrar que en realitat la transmissió de malalties es produïa mitjançant microorganismes a través del medi aquàtic. A partir d'aleshores països com Alemanya, Anglaterra o els EEUU van començar a utilitzar el clor com a biocida (USEPA 2000, Lofrano *et al.* 2010). Des d'aleshores, el clor s'ha utilitzat al llarg dels anys entre altres coses per controlar el gust i la olor de l'aigua, així com pel control del creixement microbiològic als sistemes de distribució d'aigua (Szewzyk *et al.* 2000).

Al llarg dels sistemes de distribució d'aigua potable el clor s'utilitza habitualment en un o dos punts dels processos de tractament de l'aigua: com a desinfectant primari en els pre-tractaments al principi dels processos de tractament de l'aigua a les ETAPs i/o com a desinfectant secundari per mantenir un nivell de desinfectant residual al sistema de distribució (Deborde *et al.* 2008). Però apart de la seva aplicació com a desinfectant, el clor també s'ha usat a les ETAPs com a oxidant químic, capaç de transformar nombrosos microcontaminants orgànics i inorgànics presents a l'aigua.

Així doncs, d'acord amb les característiques oxidants del clor, la cloració es pot aplicar mitjançant diferents tècniques (WHO 2008):

- Cloració al punt de ruptura, aquest mètode consisteix en aplicar una dosi de clor suficient per oxidar ràpidament tot el nitrogen d'amoni de l'aigua i deixar una quantitat de clor lliure residual disponible per protegir l'aigua en contra d'una re-infecció des del punt de cloració al punt d'ús.
- Supercloració/decloració, consisteix en l'addició d'una dosi de clor prou gran per produir un efecte desinfectant ràpid i alhora reaccionar químicament amb els compostos que hi hagi a l'aigua, seguit d'una reducció de l'excés de clor lliure residual. La retirada de l'excés de clor lliure és important per prevenir problemes de gust. Aquests sistema s'utilitza quan la càrrega microbiana és variable o en el cas de que el temps de retenció de l'aigua a les cisternes sigui breu.
- Cloració marginal, s'utilitza en llocs on el subministrament d'aigua és d'alta qualitat i una simple dosi de clor produeix els nivells desitjats de clor lliure residual. La demanda de clor en aquests subministraments sol ser molt baixa i pot ser que no es produeixi el punt de ruptura.

Per qualsevol d'aquestes tres tècniques, una mesura i control de la dosi de desinfectant i del temps de contacte (així com del pH i la turbidesa) és imperatiu. Aquestes mesures juntament amb la quantitat de clor residual són les dades bàsiques que proporcionen un nivell mínim del control de la qualitat de l'aigua tractada (WHO and OECD 2003).

Però, malgrat que la cloració és un procés que ha demostrat la seva eficàcia per la millora de la qualitat microbiològica de l'aigua, presenta certes desavantatges (Deborde *et al.* 2008):

- Degut a que la química del clor a l'aigua és una reacció depenent de pH, això fa que en funció d'aquest es produeixin diferents espècies de clor (HOCl, ClO, Cl₂, etc.) que presenten reactivitats pròpies amb els microorganismes i amb els microcontaminants.
- El clor interacciona amb la matèria orgànica natural dissolta a l'aigua generant nombrosos productes intermedis també anomenats *disinfection by-products* (DBPs). Entre els productes intermedis del clor, els trihalometans (THMs) i els àcids haloacètics (HAAs) van ser els primers en descobrir-se. Actualment alguns països com els EEUU han inclòs els THMs en les seves legislacions (Richardson *et al.* 2005).
- Degut a que els microcontaminants orgànics es troben generalment no mineralitzats, es poden produir nombroses transformacions com a resultat de la oxidació dels components orgànics durant els processos de cloració de l'aigua.

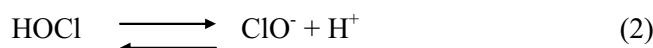
Introducció

En aigües amb cert contingut de brom, la cloració promou la formació de l'àcid hipobromós. Aquest és generalment més reactiu que el clor, especialment amb els compostos fenòlics (Deborde *et al.* 2008).

Centrant-nos altra vegada en els beneficis de la cloració, com a desinfectant de l'aigua, el clor es pot aplicar en diferents formes i estats, com a clor elemental en forma de clor gas, en solució com a hipoclorit sòdic (lleixiu) o en sòlid en forma de hipoclorit càlcic. En general, els clor gas Cl_2 o l'hipoclorit sòdic són les dues formes més utilitzades pel tractaments de l'aigua. Un cop a l'aigua, el clor gas s'hidrolitza seguint la següent reacció:



L'àcid hipoclorós (HOCl) resultant de la reacció 1 és un àcid feble que en solucions aquoses es dissocia en forma de:



En les condicions típiques de tractament de l'aigua amb un pH que oscil·la entre 6 i 9, l'àcid hipoclorós (HOCl) i l'hipoclorit (ClO^-) són les espècies de clor principals, aquestes dues espècies són també conegudes com a clor lliure. A pHs baixos (alta acidesa), l'àcid hipoclorós és el dominant mentre que a pHs alts el dominant és l'ió hipoclorit. Per tant, la rapidesa i l'eficàcia de la desinfecció amb clor són factors que es veuen modificats pel pH de l'aigua a tractar.

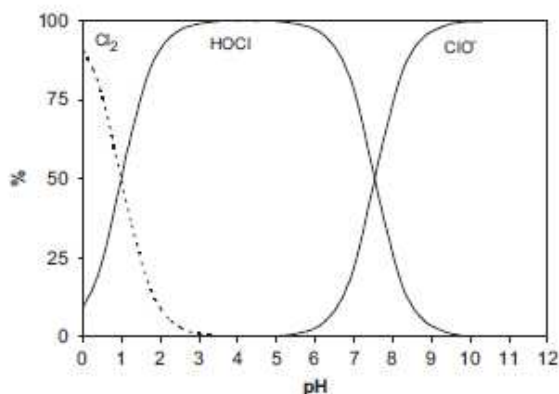


Figura 1.8. Distribució relativa de les principals espècies del clor en solució amb l'aigua en funció del pH a 25°C per una concentració de clorit de 5×10^{-3} M (177.5 mg/L) (Deborde *et al.* 2008).

El clor lliure format per les dues espècies químiques, HClO i ClO^- , és extremament reactiu amb nombrosos components de la cèl·lula bacteriana. Especialment, l'HClO és responsable de processos d'oxidació, hidròlisi i desaminacions amb una gran varietat de substrats químics i produeix lesions fisiològiques que poden afectar diferents processos cel·lulars (LeChevallier *et al.* 2004). S'ha demostrat que l'HClO té com a diana principal la coberta cel·lular, que a més

inhibeix molècules com l'ATP, afecta al transport de metabolits i electrons a través de la membrana provocant la permeabilització d'aquesta i finalment també provoca una inhibició de la síntesi d'ADN (Mogoa *et al.* 2010). A més, altres components cel·lulars com els citocroms, les proteïnes ferro-sulfuroses i els nucleòtids són altament vulnerables a la degradació oxidativa de l'HClO. Per tant, els tractaments de cloració inactiven els microorganismes mitjançant els efectes oxidants de l'HClO que crea una disrupció del metabolisme i la síntesi de proteïnes, o modificant les bases púriques i pirimidíniques fet que comporta defectes genètics (LeChevallier *et al.* 2004).

En la seva aplicació a l'aigua, l'efecte del clor com a biocida microbià és representat habitualment per corbes d'inactivació. Malgrat això, com a desinfectant químic, la seva eficàcia, és generalment expressada en termes de $C(t)$, un concepte que ajuda a entendre les dinàmiques de desinfecció i la seva aplicació pràctica. Els valors de $C(t)$, es calculen integrant la concentració de desinfectant residual (C , concentració de clor en mg/L o en ppm) multiplicat pel temps de contacte (t , en minuts) que el desinfectant residual estarà amb l'aigua (USEPA 1989, WHO and OECD 2003).

La taxa de caiguda del clor a l'aigua, es descriu mitjançant una taxa inicial, que és relativament ràpida, i una taxa a llarg plaç més lenta. La taxa inicial, és atribuïble a la reacció del clor amb les substàncies pròpies de l'aigua a tractar que reaccionen de forma ràpida amb el clor, i que es coneix com a demanda de clor. Un cop aquesta demanda s'ha assolit, s'estableix una concentració de clor residual amb una taxa de decreixement més lenta (USEPA 1989).

Per tant, els paràmetres principals que afecten l'eficàcia de la cloració apart de la concentració del desinfectant, són paràmetres operacionals com la temperatura, el pH i els paràmetres relacionats amb la matriu aquosa com ara la matèria orgànica pròpia o els sòlids en suspensió (USEPA 2007, Pereira *et al.* 2013).

7.1.1 Efecte del clor sobre els microorganismes

El poder biocida del clor, s'ha utilitzat per tot el món en ambients aquàtics molt diversos. Malgrat això, l'eficàcia d'aquests tractaments de cloració pot ser modificada per diferents factors com la temperatura, l'edat dels tancs d'emmagatzemament i altres factors associats als sistemes de canonades per la distribució de l'aigua com els materials de construcció dels tubs, la hidrodinàmica dels sistemes, els constituents químics de la mateixa matriu aquosa i la diversitat de la biota microbiana (Loret *et al.* 2005). A més apart dels factors ambientals, també hi ha certs factors microbians intrínsecs que influeixen en la sensibilitat dels microorganismes pel clor com

ara l'adherència a superfícies de materials, l'encapsulament, l'agregació i les condicions de creixement en ambients de baixa concentració de nutrients (WHO and OECD 2003).

En el monògrafic de la OMS (WHO 2008) on es recullen les recomanacions per obtenir una aigua de consum de qualitat així com en el treball sobre els tractaments de l'aigua i el control de patògens, es va resumir l'eficàcia del clor per a la inactivació de bacteris, virus i protozoos:

- Bacteris: $C(t)_{99}$ (reducció de 2 logs) 0.08 ppm x min a 1-2°C, pH 7; 3.3 ppm x min a 1-2°C, pH 8.5.
- Virus: $C(t)_{99}$ 12 ppm x min a 0-5°C, 8 ppm x min a 10°C, ambdós a pH 7-7.5.
- Protozoos: *Giardia* $C(t)_{99}$ 230 ppm x min a 0-5°C, 100 ppm x min a 10°C, 41 ppm x min a 25°C tots a pH 7-7.5. *Cryptosporidium* no hi ha pràcticament inactivació.

Les reduccions microbianes s'agruparen en grups o categories àmplies de microorganismes perquè generalment l'eficàcia dels tractaments amb clor és diferent a cadascun d'aquests grups degut a les seves característiques inherents com la mida, les parets, les propietats fisicoquímiques de les superfícies, etc.. Les dades publicades estimen de forma conservativa les reduccions microbianes basades en els membres més resistents, persistents o patògens de cada grup (WHO 2008).

En general, els bacteris heteròtrofs que creixen a l'aigua de consum humà són més resistents a la desinfecció en comparació amb les soques bacterianes de laboratori com *E. coli*. Apart d'això, certs bacteris, mostren una alta resistència al clor lliure. *Bacillus* i *Clostridium* per exemple, són gèneres bacterians altament resistent al clor especialment quan es troben disseminats en forma d'espores així com *Mycobacterium* i *Nocardia* (Norton *et al.* 2004). Apart d'aquests, un estudi mostrà que quasi tots els bacteris Gram positius, eren més resistents a l'efecte del clor que els Gram negatius degut a la composició de la paret cel·lular (LeChevallier *et al.* 2004).

Pel que fa als virus, els entèrics són generalment més resistents al clor que els bacteris entèrics, i els virus associats amb el debris cel·lular o a partícules orgàniques poden requerir alts nivells de desinfecció degut a la protecció natural d'aquestes. El procés de cloració és considerat especialment efectiu per la inactivació dels virus si la turbolesa de l'aigua és ≤ 1 UTN (unitats de mesura nefelomètrica) i s'aplica una concentració de clor residual superior a 1 ppm durant com a mínim 30 min a pH <8.

Els cists de protozoos com *Entamoeba histolytica* i *Giardia lamblia* també són altament resistents a la desinfecció mitjançant clor i poden necessitar temps de contacte més prolongats a dosis de clor residual més elevades per ser inactivats (LeChevallier *et al.* 2004, WHO 2008).

Cal destacar que els desinfectants basats en clor resulten generalment ineficaços contra *Cryptosporidium*. Hi ha una mancança d'informació a la bibliografia, pel que fa a altres protozous i altres patògens emergents (LeChevallier *et al.* 2004, WHO 2008).

Incloent totes les dades obtingudes als diferents estudis realitzats sobre l'efecte del clor lliure en front els microorganismes present als sistemes de distribució d'aigua potable, la OMS recomanen que la mínima concentració de clor al punt d'ús hauria de ser de 0,2 ppm en circumstàncies normals i de 0,5 ppm en circumstàncies d'alt risc (WHO 2008). Pel que fa a la normativa d'aigua potable espanyola, la quantitat màxima de clor lliure que hi pot haver a la xarxa de distribució és de 1 ppm, i de 2 ppm si és clor combinat (BOE 2003b).

Tot i això, els microorganismes no són només l'únic paràmetre a controlar a l'hora de realitzar una distribució d'aigua de qualitat als consumidors, el gust i la olor també juguen un paper important. La majoria dels individus són capaços d'olorar i notar el gust de clor a l'aigua potable a concentracions per sobre dels 0.5 ppm o inclús alguns, a nivells més baixos com 0,3 ppm. La OMS estima que amb una concentració residual de clor lliure entre 0,6 i 1 ppm, hi ha una possibilitat creixent de que alguns consumidors mostrin alguna objecció pel gust convertint el llinard del gust en un valor inferior a les recomanacions relacionades amb la salut (WHO 2008).

7.1.2 Efecte del clor sobre *Legionella*

Certs estudis han demostrat que *Legionella* és un bacteri més resistent al clor comparat amb *E. coli* i altres bacteris coliforms que s'han utilitzat generalment com a microorganismes indicadors per monitoritzar la qualitat de l'aigua potable, aquest fet suggereix la possibilitat de que petites quantitats de *Legionella* puguin sobreviure en aigües que s'han classificat com a microbiològicament acceptables (Kuchta *et al.* 1993, Kim *et al.* 2002).

Aquestes diferències en la susceptibilitat al clor, tendeixen a incrementar-se quan les condicions esdevenen menys òptimes, és a dir en condicions de pHs baixos, baixes temperatures i a baixes concentracions de clor. Segons l'estudi realitzat per Kuchta *et al.* (1993) sota condicions estàndard a pH 7.6, a una temperatura de 21°C i a una concentració de clor residual de 0,1 ppm, la inactivació del 99% de *Legionellae* es produeix al cap d'entre 30 i 60 min de temps de contacte amb el clor (Kuchta *et al.* 1993). Segons Yabuchi *et al.* (1995), una concentració de clor lliure de 0,4 ppm inactiva *Legionella* en suspensió en 15 minuts (Yabuchi *et al.* 1995, Lin *et al.* 1998). Incrementant la concentració de clor fins a 0,5 ppm, la mateixa inactivació es produeix al cap de 5 min de l'entrada en contacte del desinfectant (Kuchta *et al.* 1993). A més,

alguns autors com Muraca *et al.* (1987) i Storey *et al.* (2004), van demostrar amb els seus estudis que tot i que la concentració de clor disminueix més ràpidament a altes temperatures, l'eficàcia del clor envers *L. pneumophila* també és més gran a 43°C en comptes de a 25°C (Muraca *et al.* 1987, Storey *et al.* 2004a).

Malgrat això, altres autors han demostrat que *L. pneumophila* adherida a la superfície de les canonades és encara més resistent a la cloració que la seva forma lliure, d'aquí que concentracions entre 2-6 ppm han sigut necessàries per realitzar un control continu del bacteri en sistemes de canonades reals (Lin *et al.* 1998, Kim *et al.* 2002). Aquestes concentracions són molt més altes que les recomanades per la OMS.

Tot i així, hi ha hagut casos on el manteniment d'una concentració de clor residual als sistemes de distribució d'aigua ha resultat insuficient per disminuir o eliminar la concentració de *Legionella* del sistema, degut a això s'han hagut d'emprendre mesures més dràstiques. En aquests casos, el clor s'aplica en excés en un procés anomenat hipercloració, que implica afegir una dosi addicional de clor a l'aigua encara que ja n'hi hagi de residual. D'aquesta manera la hipercloració es pot realitzar de dues maneres:

- Hipercloració per xoc, consisteix en una cloració periòdica a una concentració elevada de dosi de clor, entre 20-50 ppm. Aquesta s'aplica per fer un rentat del sistema seguida d'un reemplaçament de l'aigua del circuit al cap d'una o dues hores amb aigua neta i mantenint una concentració de clor a l'aigua d'1 ppm (Lin *et al.* 1998, Kim *et al.* 2002).
- Hipercloració en continu, consisteix en una injecció contínua de clor addicional que es pot afegir en forma d'hipoclorit càlcic, hipoclorit sòdic o clor gas (Lin *et al.* 1998).

La hipercloració de l'aigua potable és un dels sistemes habitualment recomanats pel tractament de l'aigua als centres de distribució exteriors i especialment als situats a l'interior de grans edificis. Aquesta estratègia és indicada pel tractament i la eliminació de les poblacions planctòniques de *L. pneumophila*, però resta poc efectiva per les poblacions sèssils del bacteri dins dels biofilms (Loret *et al.* 2005, Cooper *et al.* 2010). De fet, diversos autors han publicat estudis sobre la resistència d'aquestes poblacions en grans edificis que utilitzaven la cloració i processos d'hipercloració com a mètode de desinfecció (Costa *et al.* 2010, Hsu *et al.* 2011, Marchesi *et al.* 2011). En aquests estudis s'explica la supervivència i recolonització dels sistemes per part de *Legionella* degut a dos grans factors: (a) la presència de biofilms i (b) la presència de protozoous

- a) Tal i com hem explicat en apartats anteriors, dins d'aquestes comunitats microbianes complexes hi ha múltiples mecanismes de resistència que prevenen als bacteris de l'accés dels desinfectants com ara una matriu d'exopolisacàrids

que apart de protecció els serveix per quedar adherits a les superfícies de les canonades (Green 1993, Thomas *et al.* 2004, Cooper *et al.* 2010).

- b) Protozous, són generalment més resistents als desinfectants tal i com hem explicat anteriorment degut a diferències a nivell de membrana, el fet de tenir formes de vida diferents, als mecanismes de transport cel·lular, etc.. La desinfecció amb clor, diòxid de clor, ozó, monocloramines i la ionització amb coure-plata resulten menys efectives en protozous comparat amb bacteris (Thomas *et al.* 2004, Dupuy *et al.* 2013). Aquest fet permet als protozous persistir als biofilms i actuar com a escuts ambientals i reservoris per *Legionella* (Kuiper *et al.* 2004, Storey *et al.* 2004, Taylor *et al.* 2009).

7.1.3 Efecte del clor sobre amebes de vida lliure

Tot i l'augment de la preocupació respecte l'efecte dels protozous sobre la salut, i especialment l'impacte que poden tenir les amebes de vida lliure sobre aquesta, encara hi ha una mancança d'informació referent a la resistència que presenten aquests microorganismes en vers certs biocides i desinfectants. Mentre que els trofozoïts de FLA són considerats relativament sensibles a la majoria de productes químics, els cists han demostrat ser-ne especialment resistent. S'ha descrit en diversos estudis que els cists de FLA presenten certa resistència a productes químics com les biguanides, compostos d'amoní quaternari, clor, diòxid de clor i peròxid d'hidrogen (Thomas *et al.* 2010).

Referent a la cloració s'han realitzat diversos estudis en els últims anys. Siddiqui *et al.* (2008) va publicar que ni trofozoïts ni cists de *Balamuthia mandrillaris* es van veure afectats per una exposició a 0,05, 0,5, 1, 1,25, 2,5, 5, 10 i 25 ppm de clor. Chang (1978) va publicar que una breu supercloració de 10 ppm podria ser un mètode de desinfecció efectiu per inactivar cists de *Naegleria* de piscines i subministraments d'aigua domèstics. Apart d'aquests estudis, durant els últims anys també s'han realitzat estudis amb FLA habitualment presents als sistemes de distribució d'aigua potable a la majoria en països com el nostre com *Acanthamoeba* sp i *Hartmannella vermiformis* (Kuchta *et al.* 1993, Dupuy *et al.* 2011, Mogoia *et al.* 2011).

Mogoia *et al.* (2011) van estudiar els efectes a nivell cel·lular de tres desinfectants el clor, el diòxid de clor i les monocloramines en trofozoïts d'*A. castellanii*. Per cada desinfectant, van calcular els valors C(t) necessaris per reduir 3 logs (Mogoia *et al.* 2011).

Un any abans, el mateix autor va publicar un altre estudi més en profunditat sobre els canvis a nivell cel·lular provocats pel clor vers *A. castellanii*. Els resultats mostraren que el clor va resultar ser més eficient inhibint la cultivabilitat dels trofozoïts que permeabilitzant-ne les membranes cel·lulars. Per exemple, una exposició a una concentració de clor de 5 ppm va reduir el 99,9% (3 logs) la cultivabilitat de les cèl·lules mentre que només el 90% (1 log) va mostrar una permeabilització de la membrana. Aquest fet suggereix que algunes cèl·lules no cultivables romanien encara viables ja que mantenien les membranes intactes. A més, mitjançant un anàlisi amb citometria de fluxe van poder observar una reducció de la mida dels trofozoïts així com una augment de la seva granularitat. Usant tècniques de microscopia electrònica també van observar que després de ser exposades a altes concentracions de clor, entre 3-5 ppm la majoria de trofozoïts tenien una aparença fantasmal, tenien els mitocondris deformats i el nucli va deixar de ser visible. Paral·lelament mitjançant microscopia electrònica de rastreig també van observar que l'exposició al clor va suposar una pèrdua dels pseudopodis, i l'aparença cel·lular es va tornar llisa suggerint que el citoesquelet podria ser una de les dianes principals dels tractaments de cloració (Mogoa *et al.* 2010).

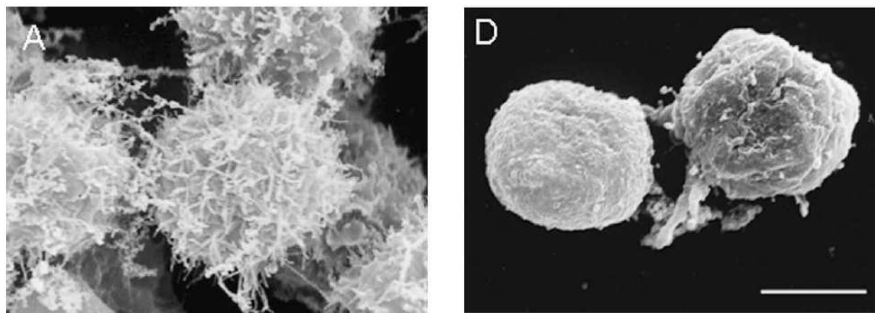


Figura 1.9. Extreta de Mogoa *et al.* (2010). Imatges obtingudes mitjançant microscopia electrònica de rastreig de trofozoïts d'*A. castellanii* abans i després de l'exposició amb clor. (A) Control, (D) cèl·lules després d'una exposició a 5 ppm de clor. Bar=10µm.

Però apart de realitzar estudis sobre la desinfecció d'amebes de vida lliure, en els últims anys alguns autors han publicat estudis on demostren que la concentració de clor necessària per inactivar *Legionella* quan aquesta es troba associada a protozous és superior en comparació amb la necessària per inactivar el bacteri en estat lliure. Per exemple, Kuchta *et al.* (1993), va utilitzar una dosi >4 ppm de clor per inactivar *Legionella* quan aquesta es trobava dins d'*H. vermiformis* o Storey *et al.* (2004) va aplicar dosis de > 50 ppm quan *Legionella* es trobava a l'interior de cists d'*A. polyphaga* (Storey *et al.* 2004, Cooper *et al.* 2010).

7.2 Desinfecció per tractament tèrmic

De la informació obtinguda a partir de les excavacions arqueològiques i els primers documents escrits, sabem que bullir aigua era un mètode de desinfecció utilitzat per Grecs i Romans. Aquest mètode, àmpliament recomanat pel metges de l'època va ajudar a disminuir el risc associat a l'aigua de mala qualitat i a les malalties transmeses a partir d'aquesta a les civilitzacions esmentades (Vuorinen *et al.* 2007).

Però no va ser fins als estudis de L. Pasteur que l'ebullició de l'aigua es va començar a utilitzar conscientment com a mètode de desinfecció, especialment pel tractament d'aigua contaminada amb patògens d'origen entèric, és a dir aigües amb contaminació fecal. Des d'aleshores, la desinfecció tèrmica dels líquids, ja sigui aigua, llet, etc.; s'anomena "pasteurització". De fet, els processos de pasteurització avui en dia s'apliquen de diverses maneres i no tenen perquè arribar a la temperatura d'ebullició del líquid a desinfectar, sinó que la desinfecció pot tenir lloc a temperatures inferiors augmentant el temps d'exposició del líquid. La relació que s'estableix entre temperatura i temps doncs, és inversament proporcional, les temperatures més baixes requeriran més temps de tractament que les temperatures més altes (Burch *et al.* 1998).

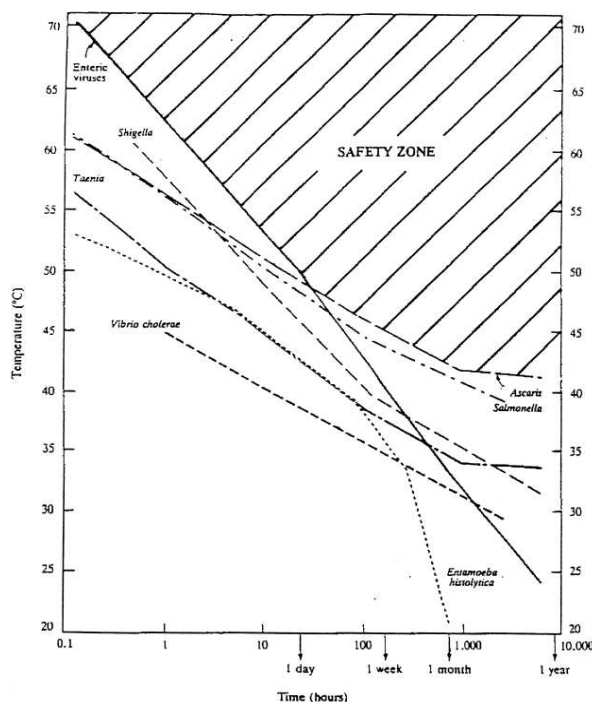


Figura 1.10. Obtinguda de Feachem *et al.* 1983). Relacions temperatura-temps necessàries per una pasteurització segura. La temperatura (°C) està representada a l'eix vertical, i el temps (h) a l'eix logarítmic horitzontal. L'àrea ratllada de la part superior dreta representa la "zona segura" per la majoria de patògens comuns, mentre que les demés línies representen les "zones segures" per patògens més específics (Burch *et al.* 1998).

A la Figura 1.10 s'observa com per sobre dels 50°C, per cada 10°C d'augment de la temperatura, els temps de pasteurització disminueix aproximadament amb un factor de 10. Entre els microorganismes representats, els virus són els més difícils d'inactivar. Per això, s'utilitza les seves dades d'inactivació per delimitar les zones segures de cada relació temperatura-temps. El

procés de pasteurització habitualment més utilitzat és mantenir el líquid a tractar a 75°C durant 10 min (Feachem *et al.* 1983, Burch *et al.* 1998).

7.2.1 Efecte dels tractaments tèrmics sobre *Legionella*

La seguretat de l'aigua de consum però, no només té en compte la contaminació fecal, sinó que altres microorganismes com *Legionella* també són habitants típics dels sistemes de distribució d'aigua, on a més s'hi poden multiplicar tal i com hem explicat en seccions anteriors (WHO 2008). Per tant, donada l'eficàcia dels mètodes de desinfecció a través de tractaments tèrmics de l'aigua, aquest procediment es va extrapolar als sistemes de distribució d'aigua potable amb l'objectiu de mantenir les poblacions microbianes sota control i evitar la formació de biofilms.

Legionella és un bacteri ubico al medi ambient capaç de proliferar dins del rang d'altres temperatures que es produeixen en els sistemes artificials de distribució d'aigua de consum, especialment als sistemes de distribució d'aigua calenta (WHO 2008). En un estudi realitzat per Dennis *et al.* (1984) es va aïllar *Legionella* de sistemes de distribució d'aigua calenta que arribaven fins a 66°C. Tot i això anys més tard Kusnetsov *et al.* (1996) van determinar que soques ambientals de *Legionella* començaven a disminuir el seu creixement a temperatures superiors a 44-45°C, convertint la temperatura en un factor totalment limitant de creixement entre 48,4°C i 50°C (Bartram *et al.* 2007, Serrano-Suarez *et al.* 2013).

Els estudis Wadowsky *et al.* (1982) van demostrar que al medi ambient *L. pneumophila* és capaç de sobreviure i multiplicar-se dins d'un ampli rang de temperatures que oscil·len entre 25 i 45°C, amb una temperatura òptima de creixement entre 32-42°C. A temperatures per sota dels 37°C, la taxa de multiplicació del bacteri cau fins als 20°C on la replicació ja no es produeix o ho molt poc (Bartram *et al.* 2007). Per tant, sistemes complexos com els sistemes de canonades d'aigua calenta, aires acondicionats i piscines termals o spas, utilitzen l'aigua dins d'un rang de temperatures que promou el creixement de *Legionella* davant altres bacteris (Bartram *et al.* 2007).

Per això, un manteniment de la temperatura fora del rang ideal de replicació de *Legionellae* hauria de ser una mesura de control efectiva tant en circuits d'aigua freda com d'aigua calenta. D'aquí que fent un balanç de la demanda de seguretat i els costos energètics derivats de l'escalfament de l'aigua, la OMS recomana que els circuits d'aigua adoptin les mesures següents (Bartram *et al.* 2007):

- evitar que la temperatura de l'aigua estigui a temperatures entre 25-45°C per prevenir la colonització de *Legionella*

- mantenir els circuits d'aigua freda per sota dels 20°C
- mantenir els circuits d'aigua calenta per sobre dels 50°C.

En molts sistemes com ara torres de refrigeració i alguns sistemes d'aigua freda i calenta, el manteniment d'aquestes temperatures no és possible degut a la pròpia naturalesa del sistema per això es recomana, que en aquests casos s'utilitzi a més algun altre tipus de sistema de desinfecció. D'altra banda, en sistemes d'aigua domèstics i d'edificis públics, les mesures de control per reduir la proliferació de *Legionella* no poden superar el risc d'escaldament, especialment pel que fa a nens, gent gran o gent amb discapacitats.

A Espanya, la normativa nacional descriu al Real Decreto 865/2003 (BOE 2003a): *por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis* la temperatura com un dels factors a controlar per prevenir la colonització dels sistemes per part de *Legionella*. Breument:

- a) Mantenir la temperatura de l'aigua del circuit d'aigua freda el més baixa possible procurant, on les condicions climatològiques ho permetin, una temperatura inferior a 20°C, pel que les canonades estaran suficientment allunyades de l'aigua calenta o en el seu defecte aïllades tèrmicament.
- b) Garantitzar que si la instal·lació interior d'aigua de consum humà disposa de dipòsits, aquests estiguin tapats amb una coberta impermeable que s'ajusti perfectament i que permeti el seu accés a l'interior. En cas de trobar-se situats a l'aire lliure, aquests estaran tèrmicament aïllats, i en cas d'utilitzar clor com a desinfectant, s'afegirà, si és necessari, al dipòsit mitjançant dosificadors automàtics.
- c) Assegurar, que tota l'aigua emmagatzemada als acumuladors d'aigua calenta finals, és a dir, immediatament anteriors al consum, una temperatura homogènia i evitar el refredament de zones interiors que propiciïn la formació i proliferació de la biota bacteriana.
- d) Disposar d'un sistema de vàlvules de retenció segons la norma UNE-EN 1717, que evitin els retorns d'aigua per pèrdua de pressió o disminució del cabal subministrat i, en especial, quan sigui necessari per evitar mescles d'aigua de diferents circuits, qualitats o usos.
- e) Mantenir la temperatura de l'aigua en el circuit d'aigua calenta, per sobre dels 50°C en el punt més allunyat del circuit o a la canonada de retorn a l'acumulador. La instal·lació permetrà que l'aigua arribi a una temperatura de 70°C. Quan s'utilitzi un sistema d'aprofitament tèrmic en el que es disposi d'un acumulador que conté aigua que serà consumida, i en el que no s'assegura de forma continua una temperatura propera als

60°C, es garantirà posteriorment que s'hi arribi en un altre acumulador final abans de la seva distribució cap al consum.

Però, tot i els esforços per mantenir *Legionella* sota control seguint les normatives i recomanacions nacionals i internacionals, mantenint els sistemes fora del rang de temperatures que propiciïn la multiplicació de *Legionella*, cada any encara es produeixen casos i brots nous de legionel·losi.

Per exemple, Hrubá (2009) va realitzar una inspecció mostrejant 18 sistemes d'aigua calenta sota les normatives estatals de la República Txeca. Els resultats obtinguts mostraren que la temperatura de la majoria de mostres (71%) oscil·lava entre 45-60°C. Tot i això, els nivells més alts de colonització de *Legionella* es produïren en aigües amb temperatures entre 30-35°C i per temperatures superiors a 50°C la quantitat del nombre positiu de mostres va disminuir significativament. Tot i això, *L. pneumophila* es va trobar a diverses mostres entre 55-60°C. Aquests resultats indiquen que la legislació requerida de mantenir els sistemes d'aigua calenta per sobre dels 50°C a la República Txeca, va resultar ser una mesura insuficient.

Aquests resultats coincideixen amb el treball de Wadowsky *et al.* (1982) que també van publicar que el rang de temperatures en que més s'aïllava *Legionellae* oscil·lava entre 37°C i 42°C en diferents edificis dels EEUU o l'estudi de Lasheras *et al.* (2006) en sistemes de distribució d'aigua a França.

Aquests estudis mostren que la desinfecció tèrmica no és una mesura totalment efectiva per eradicar *Legionella* dels sistemes de distribució, tal i com van publicar altres autors com Miuetzner *et al.* (1997), Stout *et al.* (1998), Mouchtouri *et al.* (2007) i Marchesi *et al.* (2011). En el cas de l'estudi de Miuetzner *et al.* (1997), la fallada dels tractament tèrmics aplicats (elevant les temperatures de l'aigua als circuits d'aigua calenta fins a 70°C i fent córrer l'aigua de cada aixeta com a mínim 10 min amb l'aigua a temperatures superiors a 60°C) va acabar provocant una recolonització del sistema per part de *Legionella* al cap de cert temps (Figura 1.11).

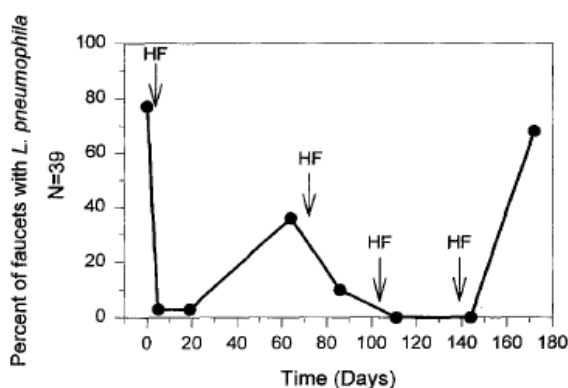


Figure 1.11. Obtinguda de Miuetzner *et al.* (1997) mostra l'efecte de l'escalfament i deixar córrer l'aigua sobre la colonització de *L. pneumophila* als llocs distals del circuit d'aigua calenta. El temps requerit està en relació amb la línia basal de mostreig el dia 0. (HF) Tractament de calor i pas de l'aigua.

Alguns autors atribueixen aquestes fallades dels tractaments tèrmics a l'hora d'eliminar *Legionella* dels sistemes d'aigua calenta a diverses raons. (Miuetzner *et al.* 1997, Stout *et al.* 1998, Mouchtouri *et al.* 2007, Marchesi *et al.* 2011) remarquen que un ús intermitent del sistema de desinfecció que consisteix en escalfar i deixar córrer l'aigua, no és lògicament rentable per gran edificis, i que en aquests la temperatura de l'aigua moltes vegades no arriba als nivells que necessita a tots els punts del sistema.

Apart d'això, Mouchtouri *et al.* (2007) també va afegir que vàlvules i aixetes podrien també ser un possible origen de la recolonització dels sistemes d'aigua calenta degut a que en aixetes i dutxes, la temperatura de l'aigua baixa degut a l'estancament d'aquesta permetent la supervivència i creixement de *Legionella* spp. A més, als punts distals de la instal·lació la formació de sediments i biofilms pot eventualment protegir *Legionella* de les altes temperatures, i promoure la recolonització del sistema just després dels tractaments de desinfecció, especialment si no s'ha utilitzat cap altre tipus de mesures o desinfectants residuals.

Al mateix estudi, apart dels problemes estructurals relacionats amb el disseny dels edificis Mouchtouri *et al.* (2007) va suggerir que existien altres mecanismes protectors que podien afectar a la desinfecció de *Legionella*. Aquests mecanismes protectors, podrien estar proporcionats per la renovació del biofilm que facilita un intercanvi de nutrients i de gasos i que alhora protegeix als microorganismes no només dels biocides, sinó d'increments periòdics de la temperatura, especialment en àrees on hi ha incrustacions o corrosió a les superfícies de les canonades (Bartram *et al.* 2007, Mouchtouri *et al.* 2007). A més, facilitant el creixement de les amebes, aquests biofilms regulen la població de protozous potencialment contaminats per *L. pneumophila* (Thomas *et al.* 2004), generant així una altra opció per la supervivència d'aquest bacteri patògen (Kim *et al.* 2002, Saby *et al.* 2005).

7.2.2 Efecte dels tractaments tèrmics sobre FLA

Tal i com hem mencionat abans, les amebes de vida lliure, són protozous de distribució mundial i habitants clàssics dels ambients terrestres i especialment de les fonts d'aigua dolça (Rodríguez-Zaragoza 1994). Aquestes fonts d'aigua dolça inclouen sistemes ambientals (Thomas *et al.* 2011) i artificials construïts per l'home com ara sistemes de subministrament d'aigua, xarxes de canonades d'hospitals, torres de refrigeració, piscines i banys d'hidroteràpia (Schmitz-Esser *et al.* 2008, Thomas *et al.* 2008). La distribució de les espècies d'amebes recau en la capacitat d'aquestes per sobreviure dins d'un ampli ventall de condicions ambientals, proporcionada pels cists capaços de tolerar canvis en la salinitat, dessecació i pressió osmòtica, així com l'exposició a diferents productes químics i situacions de manca de nutrients (Rodríguez-Zaragoza 1994,

Greub *et al.* 2004). A més, aquestes estructures, també els confereixen una resistència superior en comparació amb els bacteris a molts dels biocides utilitzats als sistemes de subministrament (Taylor *et al.* 2009).

Les FLA generalment creixen a temperatures entre 10°C i 30°C. Per sota de 4°C, només les soques resistents al fred són capaces de sobreviure, com ara *Acanthamoeba polyphaga* (Rodríguez-Zaragoza 1994). Tot i això, algunes espècies amebianes també són capaces de créixer a temperatures al voltant de 40°C o inclús superiors, com ara *Naegleria fowleri* (De Jonckheere 2006). Rohr *et al.* (1998) van aïllar algunes espècies d'*Hartmannella* i *Saccamoeba* en circuits d'aigua calenta d'hospitals capaces de créixer a 53°C, i altres autors com Serrano-Suarez *et al.* (2013) també han descrit la seva presència en circuits d'aigua calenta de diversos hospitals i residències de gent gran. Ramaley *et al.* (2001) van aïllar espècies patògenes d'amebes al Parc Nacional de Yellowstone als EEUU (Ramaley *et al.* 2001, Baumgartner *et al.* 2003). Aquestes amebes capaces de créixer a altes temperatures se les denomina termotolerants (Storey *et al.* 2004).

Tot i que les relacions entre FLA i bacteris són freqüents en els medi ambient, aquestes causen certa preocupació quan es produeixen en sistemes d'aigua potable o d'aigua sanitària calenta. Aquests tipus d'aigua, es troba generalment sotmès a normatives de qualitat de l'aigua i a processos de desinfecció per mantenir les poblacions microbianes sota control utilitzant diversos biocides, malgrat això, aquestes normatives basen el seu efecte en els bacteris sense cap control pel que fa a altres microorganismes que poden estar presents en el mateix sistema d'aigua.

De fet, estudis recents, han descrit la presència de FLA en sistemes d'aigua potable sotmesos a processos de desinfecció. Per exemple, Rohr *et al.* (1998), va trobar que un 50% de 56 mostres, eren positives per la presència d'amebes; o Thomas *et al.* (2006) va recuperar amebes d'un 11,5% de 26 mostres d'aigua agafades i un 5,7% de 174 mostres agafades amb hisops d'aixetes i dutxes. A més, a l'estudi de Rohr *et al.* (1998) es detallà la freqüència d'aïllament d'amebes en funció dels diferents rangs de temperatures, el 73% de les mostres positives es va prendre per temperatures entre 40 i 44.9°C, el 43% entre 45 i 49.9°C, el 57% entre 50 i 54.9°C i el 57% entre 55 i 59.9°C. Fins i tot, a temperatures entre 55-60°C, 4 de 7 mostres també van ser positives per amebes.

Així doncs, en general, s'ha descrit una prevalència significativament inferior d'amebes en sistemes d'aigua calenta comparat amb els d'aigua freda, aquestes diferències es produeixen especialment en sistemes que superen els 60°C (Kilvington *et al.* 1994, Thomas *et al.* 2006b). Pel que fa la diversitat d'espècies de FLA, les amebes recuperades dels sistemes d'aigua

domèstics són similars a les amebes recuperades dels sistemes de distribució d'aigua, entre els gèneres amebians més detectats destaquen *Hartmannella*, *Vannella*, *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Echinamoeba* i *Saccamoeba* (Loret *et al.* 2010).

Conseqüentment, tot i que els tractaments mitjançant altes temperatures són generalment considerats trofocides i cisticides, és important determinar l'efecte d'aquests tractaments vers les FLA (Griffin 1972, Storey *et al.* 2004b, Coulon *et al.* 2010, Pumidonming *et al.* 2010). Degut a que la supervivència de les FLA pot promoure una ràpida recolonització dels sistemes d'aigua podria ser una causa probable de l'aparició de nous patògens oportunistes emergents com *Legionella* (Swanson *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2004, Thomas *et al.* 2008, Loret *et al.* 2010).

7.3 Desinfecció per radiació ultraviolada

Les propietats bactericides de la radiació ultraviolada (UV) es coneixen des de fa 150 anys, des de que se sap que la radiació UV (com a component de la llum solar) és un dels bactericides més importants a l'ambient (Coohill *et al.* 2008).

Degut a l'alta qualitat proporcionada per les plantes de desinfecció d'aigua potable que utilitzen la radiació UV per inactivar microorganismes patògens, durant els últims 20 anys l'interès per aquest mètode de desinfecció ha anat creixent entre els sistemes de subministrament públic d'aigua potable (USEPA 2006, Sommer *et al.* 2008).

Històricament, l'aplicació de la desinfecció amb radiació UV es veia obstaculitzada pels seus alts costos, una pobre fiabilitat dels equipaments, i problemes de manteniment. Aquests factors van actuar en detriment de la cloració, un sistema més barat, més fiable i amb una mesura de la quantitat de desinfectant residual a temps real. Tot i això, l'augment d'informació sobre la producció de metabolits intermedis perillosos derivats dels processos d'oxidació del clor i l'ozó, va fer que la radiació UV anés guanyant posicions (Hijnen *et al.* 2006).

No obstant això, tot i que la radiació UV és un mètode de desinfecció estès també té certs desavantatges, com un eficàcia dependent de la turbidesa de l'aigua, una baixa efectivitat sobre els biofilms i que la seva eficàcia es restringeix al punt d'aplicació sense tenir un efecte residual més endavant (Bartram *et al.* 2007). Apart d'això, cap a l'any 2000, més de 400 instal·lacions arreu del món tractaven aigua potable mitjançant radiació UV (USEPA 2000).

La radiació UV es defineix com a la regió de l'espectre electromagnètic situada entre la radiació X i la llum visible. L'espectre de llum UV es divideix en quatre regions (Meulemans 1986):

- Vapor UV de 100 a 200 nm
- UV-C de 200 a 280 nm

Introducció

- UV-B de 280-315 nm
- UV-A de 315- 400 nm

La desinfecció mitjançant radiació UV es produeix principalment degut a l'acció germicida de la radiació UV-B i UV-C sobre els microorganismes. L'acció germicida de la radiació UV-A és petita comparada amb les altres dues, per això en cas d'utilitzar-la els temps d'exposició són necessàriament superiors per obtenir el mateix efecte desinfectant. Tot i que el vapor UV també es pot utilitzar per a la desinfecció de microorganismes (Munakata *et al.* 1991), és poc pràctic per a la seva aplicació en aigua perquè aquest tipus de radiació és dissipada ràpidament a distàncies curtes (USEPA 2006).

A l'ambient, la radiació UV solar que arriba a la superfície de la terra conté longituds d'ona entre 290 i 380 nm, on un 8% és radiació UV-A (Rastogi *et al.* 2010). Un dels processos de reparació cel·lular com la fotoreparació, es produeix precisament sota radiació UV-A. La radiació UV-B només constitueix unes desenes del total de radiació de la llum solar, tot i això, la majoria de les cèl·lules que s'inactiven per llum solar ho fan en aquesta longitud d'ona (Coohill *et al.* 2008).

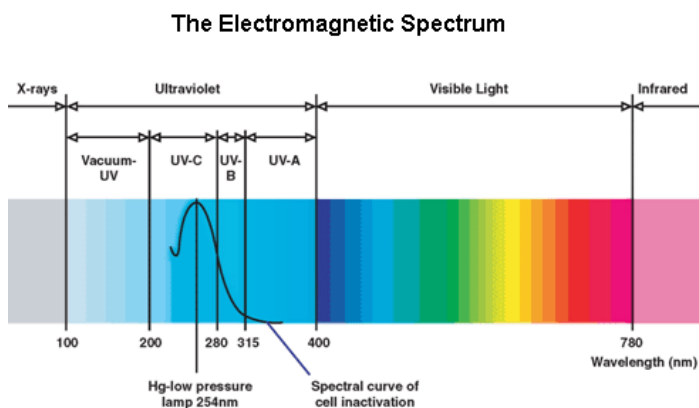


Figura 1.12. Imatge extreta (Aquafine Corporation 2011). Espectre electromagnètic de longituds d'ona de llum. La radiació UV oscil·la entre 400 nm i 10 nm, corresponents a les energies del fotó de 3 eV a 124 eV. Al gràfic, les longitud d'ones de les làmpades de baixa pressió i la corba de l'espectre d'inactivació de les cèl·lules també s'ha representat.

Malgrat que la radiació UV-C no es troba a la llum solar, la gran majoria de dades sobre la inactivació dels microorganismes mitjançant radiació UV s'han obtingut exposant les cèl·lules a una longitud d'ona de 253.7 nm dins l'espectre de la UV-C, per tres raons (Coohill *et al.* 2008):

- La disponibilitat de les làmpades de mercuri de baix cost, també anomenades làmpades germicides que emeten el 86% (quantitat variable segon els fabricant) de la seva energia a 254 nm;

- Aquesta longitud d'ona és propera al pic d'absorció de l'ADN
- Els bacteris són suficientment sensibles a aquesta longitud d'ona per portar a terme els experiments de desinfecció dins d'un temps de duració raonable de l'experiment (Coohill *et al.* 2008).

L'efecte de la radiació UV a les cèl·lules recau en els àcids nucleics, molècules responsables de definir les funcions metabòliques i la reproducció de totes les formes de vida. Les dues formes més comunes d'àcids nucleics són l'àcid desoxiribonucleic (ADN) i el ribonucleic (RNA).

Principalment, la radiació UV danya l'ADN mitjançant (Rastogi *et al.* 2010):

- a) una pèrdua d'incorporació de bases nitrogenades durant la replicació cel·lular;
- b) un dany hidrolític, que resulta en processos de desaminacions, depurinacions i depirimidinacions de les bases nitrogenades (Lindahl 1993). Totes les purines i pirimidines absorbeixen fortament la radiació UV, però la taxa de dany induït pels UV és més forta en les pirimidines (USEPA 2006);
- c) un dany oxidatiu, causat directament per la interacció de les radiacions ionitzants (RI) amb les molècules d'ADN, així com els radicals lliures o les espècies reactives de l'oxigen induïdes per la radiació UV (Valko *et al.* 2006, Halliwell 2007);
- d) amb agents alcalinitzants que poden produir modificacions a les bases nitrogenades (Dizdaroglu 1992, Lindahl 1993).

Entre els danys de l'ADN causats per la radiació UV, els tres esdeveniments que contribueixen significativament a la desinfecció mitjançant UV són (USEPA 2006) :

- (i) La formació de dímers de pirimidines quan els enllaços covalents es troben entre pirimidines adjacents a la mateixa cadena d'ADN o d'ARN.
- (ii) La formació de fotoproductes pirimidina-pirimidona (6-4), semblants als dímers de pirimidines i que es formen als mateixos llocs que les anteriors.
- (iii) La formació d'enllaços proteïna-ADN, es tracta d'enllaços covalents entre proteïnes i la cadena d'ADN.

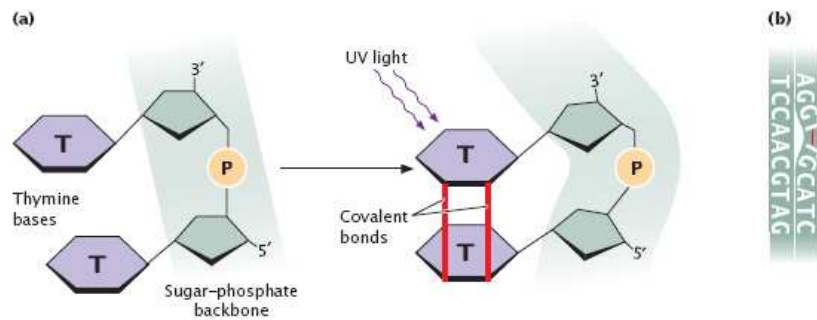


Figura 1.13 Imatge extreta de Pierce (2005). Dímers de pirimidines com a resultat de l'efecte de la radiació UV: (a) formació de dímers de timines; (b) ADN distorsionat.

Així doncs, l'efecte de la radiació UV als microorganismes és àmpliament diferent dels efectes dels desinfectants químics que els inactiven mitjançant la destrucció o el dany de les estructures cel·lulars, interferint en el metabolisme, la biosíntesi i el creixement (Snowball *et al.* 1988). La llum UV inactiva als microorganismes danyant els seus àcids nucleics i per tant inhibint la seva replicació. Així doncs, els assaigs que no mesuren la resposta a la reproducció poden resultar en una subestimació de la inactivació dels microorganismes utilitzant llum UV (USEPA 2006).

En el cas dels bacteris, els mètodes més adequats serien la mesura de la capacitat d'aquests per formar colònies i en el cas de virus i protozoos mitjançant la capacitat d'aquests per infectar cèl·lules hoste o un teixit cel·lular (USEPA 2006).

Quan les primeres formes de vida van aparèixer sobre la terra, aquestes ja es trobaren sota l'efecte de la llum solar, així doncs els organismes han evolucionat desenvolupant diferents mecanismes de reparació per evitar els danys a l'ADN induïts per la radiació UV (Goosen *et al.* 2008). Aquests mecanismes es divideixen en fotorreparació i en mecanismes de reparació en condicions de foscor (Knudson 1985).

La fotorreparació és un mecanisme de reparació de l'ADN dependent de llum, que permet als microorganismes inactivats reempendre la seva activitat mitjançant la fotorreparació dels dímers de pirimidines utilitzant energia de la llum UV més propera a l'espectre visible (310-480 nm) i a l'enzim fotoliasa (Oguma *et al.* 2004). La fotoliasa reverteix directament la unió covalent de les dues pirimidines adjacents donant lloc a la pirimidina monomèrica inicial (Goosen *et al.* 2008). Per tant, la fotorreparació és una reacció a tenir en compte a l'hora de dissenyar estratègies de desinfecció ja que pot exercir una gran influència en el resultat d'aquestes un cop acabats els tractaments (Oguma *et al.* 2004).

L'habilitat dels microorganismes per reparar els danys causats per la radiació UV és diferent en funció de l'espècie i les soques (Harm 1980, Goosen *et al.* 2008), fet que suggereix que la reparació per part "d'espècies clau" com són els microorganismes indicadors i els patògens, s'hauria d'estudiar de manera individual. A més, la determinació quantitativa de la fotorreparació, és essencial per calcular dels fluxos de llum UV necessària per compensar el potencial reparador d'aquests per avançat (Oguma *et al.* 2004).

La reparació en condicions de foscor es defineix com qualsevol procés de reparació que no requereix de la presència de llum per portar-se a terme (USEPA 2006). Aquesta inclou els mecanismes de reparació per escissió i les respostes SOS.

La reparació per escissió utilitza una sèrie d'enzims cel·lulars per tallar el dímer afectat i canviar la posició oberta de la cadena d'ADN per una timina no dimeritzada. Aquest mecanisme també s'anomena, mecanisme de retalla i enganxa (*cut and patch mechanism*). D'altra banda, les respostes SOS, són anomenades així perquè consisteix en rescatar cèl·lules amb un dany sever a l'ADN permetent la polimerització al seu voltant i sintetitzant de nou un ADN normal (Coohill *et al.* 2008).

La utilització dels mecanismes de reparació en condicions de foscor varia en funció de cada microorganisme. En bacteris i protozois, els enzims de reparació en aquestes condicions comencen a actuar ràpidament després de la exposició a la radiació UV, per això, és important tenir en compte que les dades sobre respostes a la radiació UV porten implícits aquests mecanismes de reparació (USEPA 2006).

Per obtenir el grau de desinfecció desitjat mitjançant radiació UV cal definir unes unitats de mesura per poder extrapolar la seva aplicació. Aquestes són:

- Intensitat de la llum UV, és una propietat fonamental de la llum UV i es mesura en watts per metre quadrat (W/m^2). La intensitat de la llum UV té una definició formal derivada de les equacions de Maxwell's que defineixen les propietats d'ona de la llum. La intensitat total de la llum UV en un punt de l'espai, és la suma de la intensitat de llum UV que prové de totes direccions (USEPA 2006).
- La dosi de radiació UV, prové d'integrar la intensitat de la llum durant un període d'exposició. Si la radiació UV es manté constant al llarg d'un període de temps, la dosi de llum UV es defineix com el producte de la intensitat pel període de temps. La unitats utilitzades més habitualment són els joules per metre quadrat J/m^2 , els mJ/cm^2 i els mWs/cm^2 ($1 J/m^2 = 0.1 mJ/cm^2 = 0.1 mWs/cm^2$) (USEPA 2006).

En matrius típiques de laboratori, la dosi de llum UV que reben els microorganismes, és igual a la intensitat pel volum mitjà de la matriu. Un exemple d'experiment al laboratori són els estudis

“*collimated beam*” on una placa de Petri que conté una suspensió microbiana en agitació és irradiada amb un flux de llum UV concentrat. En aquest cas, la mitjana de la intensitat de llum UV es calcula a partir de mesurar la intensitat de llum UV incident a la superfície de la suspensió microbiana, la profunditat de la suspensió i l'absorbància de l'aigua (USEPA 2006).

Principalment, els poder desinfectant de la radiació UV s'aplica de dues formes diferents, utilitzant làmpades de baixa pressió (*low pressure lamps*, LP), unes làmpades monocromàtiques que emeten a 253.7 nm, i les làmpades de pressió mitjana (*medium pressure lamps*, MP) amb una emissió policromàtica. En ambdós casos, el flux de llum UV no es pot mesurar directament, sinó que s'ha d'inferir a partir de monitorejar la irradiància de la llum UV amb un sensor multiplicar pel temps que els microorganismes es troben exposats (Hijnen *et al.* 2006). A les làmpades MP, el càlcul del flux de llum UV és encara molt més complex ja que les longituds d'ones al ser policromàtiques actuen de manera diferent sobre els microorganismes (Sommer *et al.* 2008).

Tot i això, a l'hora de dissenyar experiments utilitzant radiació UV, hi ha altres factors apart del tipus de làmpada utilitzada que poden interferir en els resultats com la variabilitat que existeix entre determinades espècies o soques de microorganismes, el medi de cultiu utilitzat, la fase del cultiu, influències del medi utilitzat per quantificar els resultats, els mecanismes de reparació cel·lulars i l'agregació (Chang *et al.* 1985).

Degut a això, a l'hora de publicar els resultats dels experiments realitzats amb radiació UV, caldria incloure un mínim de dades necessàries que per poder compara els resultats obtinguts, aquestes són: (1) una descripció detallada del microorganisme utilitzat i l'origen d'aquest (pacient, menjar, sòl, etc.); (2) detalls sobre les condicions de creixement i els medis i tampons utilitzats; (3) la fase del creixement bacterià del cultiu (exponencial, estacionària, etc.); (4) el mètode de purificació d'espores i el control de qualitat de l'espora per assegurar que les mostres contenen una alta població d'espores quiescents; (5) la font de llum UV i el dosímetre; (6) el mètode d'exposició; (7) el grau d'agregació; (8) si hi ha o no condicions perquè es produeixi la fotorreparació (Coohill *et al.* 2008, Sommer *et al.* 2008).

Apart d'això, i degut a l'ampli ús de la tecnologia associada amb la desinfecció de l'aigua mitjançant radiació UV en les últimes dècades, s'han investigat les resistències a la llum UV de molts microorganismes indicadors i patògens amb important significat per la qualitat de l'aigua i la salut pública. Alguns d'aquests microorganismes s'han resumit a la taula següent:

Taula 1.4. Extreta de LeChevallier *et al.* (2004). Dosis de llum UV necessàries per a la reduir 4 logs els microorganismes seleccionats. (n^o) nombre de fonts.

Organismes		Rang de dosi per a la inactivació de 4 log (J/m ²)	Fonts d'aigua
Bacteris	<i>Bacillus subtilis</i> espores	310	Aigua de laboratori
	<i>Escherichia coli</i>	200	Aigua de laboratori
	<i>Salmonella typhi</i>	300	Aigua de laboratori
	<i>Vibrio cholera</i>	6.5	Aigua de laboratori
Virus	MS-2	500 / 640-930 / 1000	Aigua subterrània (1), Aigua subterrània (50), Aigua de laboratori
	Coxsackie AZ	300	Aigua de laboratori
	Hepatitis A	60-150 / 160	Aigua subterrània (3), Aigua de laboratori
	Poliovirus	230-290 / 300	Aigua subterrània (8), Aigua de laboratori
	Rotavirus-Wa	500	Aigua de laboratori
	Rotavirus SA11	400	Aigua potable
	Adenovirus	1860	Aigua de laboratori (4)

La Taula 1.4 demostra que la radiació UV és un desinfectant eficaç per inactivar bacteris i virus (LeChevallier *et al.* 2004, USEPA 2006). Els bacteris (cèl·lules vegetatives) són més susceptibles a la radiació UV que els virus, i per això menys extensament estudiats (Hijnen *et al.* 2006). Les espores de *Bacillus subtilis* i de *Clostridium perfringens*, són clarament menys sensibles a radiació UV que les cèl·lules vegetatives bacterianes (Hijnen *et al.* 2006, Sommer *et al.* 2008). A més, les espores de *Bacillus subtilis* s'han usat habitualment com a biodosímetre degut a la seva resistència a la radiació UV ja que requereixen un flux de 310 J/m² per reduir 4 logs la seva concentració (Qualls *et al.* 1983, Sommer *et al.* 2008). A nivell viral, l'MS-2 és un virus monocatenari d'ARN F-específic d'uns 20 nm de diàmetre que també pot ser utilitzat com a biodosímetre (Braunstein *et al.* 1996). D'altra banda, alguns virus com l'Adenovirus, un tipus de virus bicatenari són molt resistents a la inactivació mitjançant radiació UV tal com indica la taula anterior (LeChevallier *et al.* 2004).

Pel que fa als protozous, alguns autors han publicat alguns estudis sobre les dosis necessàries per inactivar *Cryptosporidium* i *Giardia*, aquestes dosis són inferiors als virus:

Taula 1.5. Extreta de USEPA (2006). Taula de dosis de llum UV per la inactivació de protozous i virus.

Patògens diana	Inactivació logarítmica (J/m ²)							
	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
<i>Cryptosporidium</i>	15	25	39	58	85	120	150	220
<i>Giardia</i>	15	21	30	52	77	110	150	220
Adenovirus	390	580	790	1000	1210	1430	1630	1860

De fet, l'interès per la radiació UV com a mètode de desinfecció per l'aigua va augmentar després dels estudis de Clancy et al., 1989 (Clancy *et al.* 2004) on mostraven que aquest mètode era especialment eficaç per reduir la infectivitat d'ocists de *Cryptosporidium parvum* (Hijnen *et al.* 2006).

Així doncs, considerant l'objectiu principal de la desinfecció de l'aigua potable que consisteix en una reducció d'entre 3 i 4 logaritmes dels paràsits patògens i virus, l'aplicació d'un flux de llum UV a 253.7 nm de 400 J/m² cobriria aquests mínims. Precisament, aquests són els mínims requerits per les normatives de la DVGW, l'Agència d'aigua i gas alemanya i la ÖNORM l'Institut d'Estandardització Austríac (ÖNORM 2001, ÖNORM 2003, DVGW 2006). Alguns estudis, han demostrat que aquests fluxos de llum UV també cobreixen la fotorreparació dels bacteris mitjançant l'enzim fotoliasa (Sommer *et al.* 2000, Sommer *et al.* 2008) i proporcionen 4 logaritmes d'inactivació de la majoria de virus rellevants com ara l'Hepatitis A virus, Rotavirus, Poliovirus i Calicivirus (Sommer *et al.* 1989, De Roda Husman *et al.* 2004). Tot i això, aquesta dosi no seria efectiva per la eliminació dels Adenovirus (LeChevallier *et al.* 2004).

És important tenir en compte que països com Àustria i Alemanya la desinfecció mitjançant UV moltes vegades és l'únic pas o tractament abans de que l'aigua arribi al consumidor, per això, els requeriments de les normatives abans esmentades són més elevades (ÖNORM 2001, ÖNORM 2003, Sommer *et al.* 2008) que en altres països. Als EEUU en canvi, la desinfecció mitjançant radiació UV s'utilitza per la eliminació de paràsits i acostuma a combinar-se amb altres tractament com la cloració. D'aquí que els fluxos requerits a la normativa de la USEPA siguin menors. Breument, la USEPA considera que es produeix una reducció de 3 logaritmes de *Cryptosporidium* i *Giardia* entre 110-120 J/m², i que la reducció dels virus es produeix per fluxos al voltant dels 1860 J/m² (Sommer *et al.* 2008).

7.3.1 Efecte de la radiació UV sobre *Legionella*

Pel que fa a les espècies de *Legionella*, diferents autors han realitzat estudis *in vitro* al laboratori, i han establert el seu efecte bactericida envers aquest bacteri patogen a 253.7 nm. El primer estudi, realitzat per Antopol *et al.* (1979) va aportar les primeres dades sobre la dosi necessària de llum UV per reduir 1, 2 i 3 logaritmes la concentració de *Legionella*, 9.2, 18.4 i 27.8 J/m² respectivament. En el mateix estudi, es va comparar la inactivació d'aquest bacteri patogen amb la d'altres bacteris com *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa*, que van requerir dosis de 21.1, 21.4, 22, and 55 J/m² per reduir 1 log la seva concentració.

Un cop descrita l'alta sensibilitat de *Legionella* vers la llum UV, es va començar a implementar aquest mètode per a la desinfecció dels sistemes de distribució de gran edificis. Tot i això, donat que la radiació UV no té un efecte residual, el recreixement de *Legionella* a les diferents capes dels biofilms generats a les incrustacions de les canonades o a les restes acumulades no tindria capacitat per evitar la recolonització de les canonades i les aixetes (Liu *et al.* 1995, Franzin *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2009). Oguma *et al.* (2004) va remarcar a més, que la capacitat de fotorreactivació de *Legionella* spp. s'hauria de considerar a l'hora de realitzar valoracions de risc a l'aplicar la radiació UV com a mètode de desinfecció.

7.3.2 Efecte de la radiació UV sobre les FLA

Sobre els protozoos, tal com hem mencionat abans, la majoria d'estudis realitzats sobre l'efecte de la radiació UV s'han realitzat amb microorganismes com *Cryptosporidium* i *Giardia* degut a seva demostrada l'eficàcia (Oguma *et al.* 2004). Pel que fa a les FLA, se n'han realitzat molts pocs (Chang *et al.* 1985, Aksozek *et al.* 2002, Maya *et al.* 2003, Siddiqui *et al.* 2008) i en general, les dosis necessàries per inactivar aquest tipus de microorganismes són superiors a les dosis necessàries per inactivar bacteris (Taylor *et al.* 2009).

En un treball realitzat per Siddiqui *et al.* (2008), van publicar que trofozoïts i cists de *Balamuthia mandrillaris* eren capaços de sobreviure a una dosi de llum UV de 1000 i 2000 J/m². Pel que fa a altres grup d'amebes, Chang *et al.* (1985) van publicar que cists d'*Acanthamoeba castellanii* eren capaços de sobreviure després d'una exposició a dosis de radiació UV d'entre 2000-8000 J/m².

Entre els estudis en sistemes de distribució reals, Långmark *et al.* (2007) van descriure la presència d'amebes i microflagel·lats a totes les mostres de biofilm de sistemes de distribució

Introducció

d'aigua sotmesos a una desinfecció mitjançant monocloramines i radiació UV. A més, en molts casos les amebes aïllades contenen una mitjana de 100 cèl·lules bacterianes al seu interior.

OBJECTIUS / *OBJECTIVES*

Legionella spp. és un bacteri aquàtic que te en les amebes de vida lliure un dels seus principals reservoris. Aquest bacteri que pot actuar com a patogen oportunista quan és inhalat pel homes, ha trobat en els sistemes de distribució d'aigua dels edificis, especialment en els sistemes d'aigua calenta un nínxol on multiplicar-se, formant part dels biofilms on coincideix amb les amebes de vida lliure que li fan d'hoste.

L'objectiu principal d'aquest estudi és conèixer l'efecte de tres desinfectants aplicats habitualment en aigües de consum com són el clor, la temperatura i la radiació UV, sobre *Legionella* spp., amebes de vida lliure que poden actuar com a hostes i sobre els simbionts formats per ambdós microorganismes en condicions semblants. Per assolir aquest objectiu principal, el treball es va dividir en els següents sub-apartats:

- Obtenir una col·lecció de soques de *Legionella* spp i d'amebes de vida lliure de diferents orígens, tant ambiental com soques de Col·leccions i Bancs de Cultius tipus oficials.
- Posar a punt de mètodes per l'aïllament, el cultiu i la quantificació d'amebes de vida lliure en els seus dos estats de vida, trofozoïts i cists.
- Obtenir endosimbionts entre *L. pneumophila* i amebes de vida lliure.
- Posar a punt mètodes per monitoritzar l'estat de *L. pneumophila* dins d'amebes de vida lliure.
- Conèixer la susceptibilitat de soques de *Legionella* de diferents orígens davant de tractaments amb clor, temperatura i radiació UV.
- Conèixer la susceptibilitat de les soques d'amebes de vida lliure de diferents orígens davant tractaments amb clor, temperatura i radiació UV tenint en compte les seves dues formes de vida, trofozoïts i cists.
- Conèixer la susceptibilitat dels endosimbionts entre *L. pneumophila* i amebes de vida lliure davant els tractaments amb clor, temperatura i radiació UV.

Legionella spp. is an aquatic bacterium that has free-living amoebae as its main reservoir. This bacteria is considered an opportunistic pathogen which causes human disease when is inhaled via aerosols from polluted water. *Legionella* found in water distribution systems, specially hot water systems a niche to multiply, as a part of biofilms in association with free living amoebae, their hosts.

The main objective of this study was to determine the effect of three water disinfectants commonly applied in drinking water such as chlorine, temperature and UV radiation on *Legionella* spp., free-living amoeba which act as *Legionella* hosts and on the association between these two microorganisms by using molecular and culture methods under similar conditions. This objective is divided into the following subsections:

- Get a collection of strains of *Legionella* spp. and free-living amoebae from different origins, both environmental and official culture collection strains.
- Design methods for the isolation, culture and quantification of free-living amoebae for both life stages, trophozoites and cysts.
- Obtain endosymbionts of *L. pneumophila* within free-living amoebae.
- Design methods for monitoring the presence of *L. pneumophila* status within free-living amoebae.
- Study the susceptibility of the different *Legionella* strains to treatments with chlorine, temperature and UV radiation.
- Study the susceptibility of the different free-living amoebae strains to treatments with chlorine, temperature and UV radiation for both life stages, trophozoites and cysts.
- Study the susceptibility of *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* endosymbionts for treatments with chlorine, temperature and UV radiation.

MATERIAL I MÈTODES
MATERIAL AND METHODS

1. Microorganisms used in the study

1.1 *Legionella* spp. strains

Inactivation studies were conducted with five *Legionella* strains:

- Three reference strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC):
 - o *Legionella pneumophila* strain Philadelphia ATCC 33152
 - o *Legionella pneumophila* serogroup 7 ATCC 33823
 - o *Legionella longbeachae* ATCC 33462
- Two environmental strains were previously isolated from Catalonian hot tap water:
 - o *Legionella pneumophila* serogroup 1
 - o *Legionella pneumophila* serogroup 8

The five strains were stored at -80°C in Ringer 1/40 with 15% glycerol (Panreac).

1.2 Isolation of *Legionella* strains from the environment

In a previous study conducted by our group (Serrano-Suárez *et al.* 2013), samples from hot water continuous circulation systems with storage tanks were collected randomly from 30 hotels and nursing homes in Catalonia. Detection and enumeration of *Legionella* in water samples were done by culture on Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar supplemented with Glycine Polymyxin Vancomycin Cycloheximide (GPVC) (Oxoid Ltd, Oxoid LTD; Basingstoke, Hants, England) following the ISO 11731:1998 standard on water quality; detection and enumeration of *Legionella* (Anonymous 1998).

This method involves the filtration of a 1 L sample through a 0.45- μm porous size nylon membrane (Filter HNWP Millipore; Ireland); the retained material was then suspended in 10 mL of Ringer 1/40 by vortexing for 2 min.

Concentrates were cultured either directly and after two treatments: a thermal treatment of 50°C for 30 min and an acid treatment in which 100 μL of acid buffer (pH 2) is added to 900 μL of the sample concentrate, as described in the ISO 11731:1998 guidelines. Treated and untreated samples are inoculated then onto plates of BCYE + GPVC agar medium and incubated at 37°C for 10 ± 2 days.

- **Confirmation of presumptive colonies**

After incubation, morphologically characteristic colonies which form on the selective medium are regarded as presumptive *Legionella*. The confirmation of those colonies is performed, subculturing them to demonstrate their growth requirement for L-cysteine and iron in BCYE agar without L- cysteine (MAIM S.A., Vic, Catalonia) or Blood Agar (MAIM S.A., Vic, Catalonia) plates. Further biochemical and serological tests are needed for species identification.

1.3 Identification of *Legionella* strains

Several methods were used in order to identify *Legionella* isolates obtained:

- **Identification of *Legionella* species by serology**

The identification of *Legionella* species required as the first step, obtain pure cultures of the *Legionella* isolates. This step was performed subculturing *Legionella* isolates three times on BCYE agar plates. An average of between three and five colonies of positive samples for *Legionella* was tested using the *Legionella* agglutination test (*Legionella* latex test; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) following the manufacturer's instructions. This kit enables differentiation between *L. pneumophila* serogroup 1, *L. pneumophila* serogroups 2–14 and seven additional *Legionella* species.

- **Identification of *Legionella* species by using molecular methods**

From the pure cultures obtained the identification of *Legionella* species was realized with the following steps.

○ ***Legionella* DNA extraction**

DNA extraction was performed by modifying the protocol described by Van Eys *et al.* (1989). Briefly, 1 mL of the concentrated water by filtering was heated to 100°C for 10 min and cooled for 10 min at –20 °C. A total of 0.015 g of the resin Molecular Biology Grade AG 501- X8 (Bio-Rad) was then added to the sample and mixed with the vortex for 30 s. Finally, the sample was centrifuged for 5 min at 10.000 g. The supernatant was then recovered and stored at –20 °C for further analysis. This DNA extraction system was the most efficient removing potential inhibitors in previous studies realized in our group (Serrano-Suárez 2009).

- ***Legionella* detection by Semi-Nested PCR**

A semi-nested PCR was used for the detection of *Legionella* by amplifying the 16S rRNA gene, which is conserved in all species of the genera. The primers used for the semi-nested PCR were based on the method used in a study by Jonas *et al.* (1995). They are JFP (5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3') and JRP (5'-CAACAGCTAGTTGACATCG-3') for the first PCR round and a reverse inner primer was designed for the second round ASR (5'-TTCCACTACCCTCTCCCATA-3') which were used to generate a 234-bp amplicon (Serrano-Suárez *et al.* 2013).

The detection limit of the first round of PCR for *L. pneumophila* was 6.80×10^2 Genome copies (GC) for reaction, while the semi-nested PCR reached 6.80×10^0 GC for reaction (Serrano-Suárez 2009). Details of the PCR reaction and reagents are explained on Annex.

PCR products were then purified by using use the commercial kit "Montage ® PCR Devices" from Millipore (USA), following the manufacturer's protocol.

- ***Legionella* identification by DNA sequencing**

Purified PCR products were then sequenced using one of the primers of the Semi-Nested PCR. Reactions were performed with the ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit version 3.1 with Ampli Taq® DNA polymerase FS [Applied Biosystems] following the manufacturer's instructions. Finally, amplicons were sequenced by the Genomic Unit at Serveis Científico-tècnics of the Universitat de Barcelona (SCT-UB).

The obtained sequences were compared with the nucleotide sequences available in the Genbank using the BLAST algorithm from NCBI (National Center for Biotechnology Information), and were aligned with the ClustalX2 programme (Altschul *et al.* 1990).

- ***Legionella pneumophila* sg. 2-14 environmental identification**

The isolate *L. pneumophila* sg. 2-14 from environmental waters from hot water systems of hotels and nursing homes of Catalonia was typed during the collaboration period with the Institute of Water Hygiene and Applied Immunology at the Medical University of Vienna (Austria) by using Maldi-TOF and a Monoclonal Antibody (MAb).

1.4 Other bacterial strains

Another bacterial strain used in the current study was the reference strain *Escherichia coli* WG5, ATCC 25922.

1.5 Free-living amoebae (FLA) strains

The inactivation studies were performed with 4 different FLA strains.

- Two reference strains were obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa (Scotland, UK):
 - o *Acanthamoeba castellanii* CCAP 1534/2
 - o *Hartmannella vermiformis* CCAP 1534/7A
- Two environmental strains were previously isolated from Catalanian hot tap water:
 - o *Acanthamoeba* sp. 155
 - o *Hartmannella vermiformis* 195

The four strains were stored in the cystic stage at -80°C in Ringer 1/40 (Scharlau) with 20% glycerol.

1.6 Isolation of free-living amoebae strains from the environment

For the analysis of protozoa, 5 mL of water (from hot water continuous circulation systems with storage tanks were collected randomly from 30 hotels and nursing homes in Catalonia (Serrano-Suárez *et al.* 2013)) was taken from the bottom of each sampling container, after 2 h of sedimentation. Samples were centrifuged at 800 g for 5 min and 50 μL of the pellet was observed with an optical microscope. The isolation and identification of FLA was advised by O. Canals and Dr. H. Salvadó from the Departament de Biologia Animal, Universitat de Barcelona.

Subsequently, 500 μL of wheat broth medium was added, and it was incubated at room temperature under dark conditions to avoid algae proliferation. After that, suspensions were observed at day 2, 5, 10 and 15. Wheat broth medium was prepared using the following method (López-Ochoterena *et al.* 1991), 50 g of *Triticum vulgare* was boiled for 20 min in 1 L of distilled water, then filtered through a 0.45- μm porous size membrane (EZ-Pak® Membrane Filters; Millipore, Molsheim, France) and adjusted to 1 L by adding more distilled water. Finally 1.3 g of $\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ was added (Merck; Darmstadt, Germany) to the media before being sterilized by autoclave. Detection limit of the method is between 50 and 80 individuals per liter.

To isolate amoebae that were potentially present in the samples 100µl aliquots were spread on Non Nutritive Agar plates (Sanden *et al.* 1992) that had previously been seeded with a layer of living *Escherichia coli* WG5, ATCC 25922. NNA plates were incubated at 30°C and examined daily for the presence of amoebal cells.

Positive plates for amoeba presence were subcultured again on new NNA plates with *E. coli*. After three subcultures, under the same conditions, amoebae were harvested by scraping and resuspended in 1 mL of Ringer 1/40.

1.7 Identification of FLA strains

- Identification of FLA species by morphology

The identification of FLA by morphology was performed by O. Canals and Dr. H. Salvadó from the Departament de Biologia Animal, Universitat de Barcelona.

- Identification of FLA species by using molecular methods

○ FLA DNA extraction

DNA extraction was performed by modifying the protocol described by Van Eys *et al.* (1989). Briefly, amoeba isolates were recovered by adding 1 mL of Ringer 1/40 to the plates. The recovered cells were heated to 100°C for 10 min and cooled for 10 min at -20 °C. Finally, the sample was centrifuged for 5 min at 10.000 g. The supernatant was then recovered and stored at -20 °C for further analysis.

○ FLA detection by PCR

A PCR amplifying the 18S rRNA was performed following the protocol described by Thomas *et al.* (2006) modified by (Serrano-Suárez 2009). By using the primers Ami-6deg (5'-CCAGCTCCAAGAGYGTATATT- 3') and Ami9R (5'- GCGGCTTAATTTGACTCAAC -3') which generate a 618bp amplicon. Reaction details are specified in the section Annex.

After the PCR, amplicons were purified by using the commercial kit "Montage® PCR Devices" from Millipore (USA), following the manufacturer's protocol.

○ **FLA identification by sequencing**

Purified PCR products were then sequenced using the same primers than in the PCR. Reactions were performed with the ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit version 3.1 with Ampli Taq® DNA polymerase FS [Applied Biosystems] following the manufacturer's instructions. Finally, amplicons were sequenced by the Genomic Unit at Serveis Científic-tècnics of the Universitat de Barcelona (SCT-UB).

The obtained sequences were compared with the nucleotide sequences available in the Genbank using the BLAST algorithm from NCBI (National Center for Biotechnology Information), and were aligned with the ClustalX2 programme (Altschul *et al.* 1990).

2. Preparation of test suspensions

2.1 Preparation of *Legionella* spp. suspensions

Legionella strains were cultured on BCYE supplemented with GVPC at 37°C for 4±1 days. Cells were harvested from the agar plates, resuspended in Ringer 1/40 and homogenized using a vortex mixer. The cell concentration of the test suspension was adjusted by measuring the absorbance at 450 nm. As previous works realized in our group set, an absorbance of 0.8-0.9 A corresponded to a cell concentration of approximately 1×10^8 ufc/mL.

2.2 Preparation of FLA suspensions

The strains of amoebae were cultured on NNA plates (Sanden *et al.* 1992) seeded with fresh *E. coli* WG5 at 30°C for 8–10 days.

2.2.1 Trophozoites suspensions

Each inactivation study was performed on differentiated FLA suspensions according to its life stages, trophozoites or cysts.

For the *Acanthamoeba* trophozoite experiments, axenic cultures were obtained according to the method described by (Walochnik *et al.* 2000) using the liquid medium ATCC 1034 Proteose peptone-yeast extract-glucose (PYG).

Briefly, double-walled cysts from NNA plate cultures were harvested and incubated in 3% HCl (v/w) overnight in order to eliminate possible accompanying bacteria. Two washing steps with Ringer 1/40 were performed by centrifuging the cysts at 800 g for 15 min and then transferring

them to 10 ml of the PYG in 25 cm³ tissue culture flasks [Nunc]. Trophozoite cultures were maintained axenically by sub-culturing them in PYG in 25 cm³ culture flasks. Then, trophozoites were grown to confluence for 2–3 days at 30°C, they were recovered from the tissue culture flasks by softly shaking it once.

The obtained suspension was then centrifuged in order to replace the culture media for the chosen matrix.

Axenic cultures in PYG of *H. vermiformis* strains could not be obtained due to special nutritional requirements, so both cysts and trophozoites suspensions were obtained as detailed below.

2.2.2 Cysts suspensions

Acanthamoeba cysts were obtained by culturing amoebal strains on NNA agar plates seeded with fresh *E. coli* at 30°C for 10±2 days. At that time, cultures composed of 90% of double-walled cysts were harvested with Ringer 1/40.

H. vermiformis strains, both cysts and trophozoites were cultured on NNA plates seeded with fresh *E. coli*. Trophozoites were harvested from the plates approximately on day 2, before the population encysted, while cysts were obtained after 10 days.

Finally, trophozoite and cyst suspensions obtained from the 4 FLA strains were centrifuged at 800 g for 15 min and resuspended in Ringer 1/40, adjusting to a final concentration of 1 x 10⁵ amoeba cells/mL using a Neubauer chamber.

3. Co-culture of *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* strains

Trophozoites of *Acanthamoeba* strains were grown at 30°C for two days in 75 cm³ tissue culture flasks [Nunc] containing 30 mL of PYG medium. *L. pneumophila* sg. 1 environmental strain was cultured on BCYE agar plates supplemented with GVPC, at 37°C for 72 h and recovered as explained above.

20 µL of *Acanthamoeba* trophozoites were recovered by softly shaking the tissue flask for counting them with a Neubauer chamber and adjusted to a concentration of 1 x 10⁵ trophozoites/mL. Tissue flasks were incubated for one extra hour at 30°C to let trophozoites adhere again to the tissue flask bottom. PYG medium was then removed and substitute for 10 mL of Ringer 1/40 plus a suspension of 5 x 10⁷ *Legionella* cells/mL, at a multiplicity of infection (MOI) of 1:100.

Cultures were then incubated at 30°C for 2,30h. After that time, extracellular *Legionella* bacteria were removed by washing the monolayers four times with Ringer 1/40.

Finally, 20 mL of fresh PYG were added after washing steps. Microscope observations confirmed the absence of extracellular *L. pneumophila* after the successive washing steps (Amer *et al.* 2005, Declerck *et al.* 2010). This time was denoted as T₀.

In case of UV experiments, co-cultures were performed following a very similar protocol by using plastic tubes of 60 mL. Low speed centrifugation at 800 g for 30 min was used to initiate a physical interaction between amoeba and *Legionella* cells, the centrifuged suspension was then incubated at 30°C for 90 min.

Afterwards, gentamycin sulphate (50 mg/mL) was added to the suspension and incubated for 90 min at 30°C to kill the non-intracellular *Legionella* bacteria and followed for two centrifugation steps at 800 g for 15 min replacing the supernatant for fresh PYG medium to wash the remaining antibiotic. Finally, the pellet was resuspended in 60 mL of fresh PYG medium and incubated at 30°C.

Co-cultures were incubated at 30°C for 40 h in case of *Acanthamoeba* sp. 155 or 48 h in case of *A. castellanii* CCAP 1534/2.

3.1 Release of *L. pneumophila* sg. 1 from the trophozoites of *Acanthamoeba*

Several methods were tested in order to estimate the number of surviving intracellular *Legionella* after every disinfection treatment. Although lots of them are described in the literature, we could no find a method with a good balance between trophozoites lysis and a not damaged *Legionella* released.

Because of that and assuming that data reported here can underestimate the real number of *Legionella* viable cells, no extra treatments were applied after chlorine, thermal treatments and UV irradiation.

4. Monitoring of co-cultures between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* trophozoites

4.1 Implementation of Fluorescent *in situ* hybridization

In order to observe how *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* co-cultures evolved, co-cultures were also monitored by fluorescent *in situ* hybridization (FISH).

Fluorescence in situ hybridisation with rRNA-targeted nucleic acid probes can be used to directly identify microorganisms within complex samples in a few hours and therefore has widespread application in environmental and medical microbiology (Amann *et al.* 1998). Several hundred rRNA-targeted oligonucleotide probes suitable for FISH have been described, together with a large online database providing an encompassing overview of over 700 published probes and their characteristics (Loy *et al.* 2003). These probes are 15–25 nucleotides in length and are labelled covalently at the 5' end with a fluorescent dye. After stringent washing, specifically stained cells are detected via epifluorescence microscopy or flow cytometry (Wagner *et al.* 2003).

4.1.1 FISH of *L. pneumophila*

As we mentioned before, the gold standard method for detecting and quantifying *Legionellae* is still based on the cultivation on selective agar. The main drawbacks of this method are its long duration of up to 10 days and the fact that a high proportion of the *Legionellae* may persist in the environment in a viable but non culturable (VBNC) state (Kirschner *et al.* 2012).

Alternatively FISH is a very useful tool for a rapid detection of *Legionella* in water. We implemented a FISH for the detection of *Legionella* by using the kit Fluorescence *in-situ* Hybridization for *L. pneumophila* (Microbial Diagnostics, Ribo technologies) following manufacturers instructions.

Briefly, 1 mL of a *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 suspension (prepared as mentioned in point 2.1) of approximately 10^5 ufc/mL was centrifuged at 14,000 g for 5 min and fixed with the fixative buffer for 20 min at 4°C.

After fixation, cells were collected by centrifugation and washed with the buffer provided. After another centrifugation step, cells were dehydrated resuspending them into 300 µl of 70% ethanol and incubated for 5 min at room temperature. 150 µL of the dehydrated cells were then centrifuged and the pellet was resuspended with the hybridization buffer which includes a specific probe for *L. pneumophila* labelled with Cy3. Cells were then incubated for 16 hours at 54°C in the dark.

After hybridization, 20 µL of the suspension were washed with 4 mL of the provided pre-warmed buffer for 20 min at 54°C in the dark. After the washing step, samples were filtrated by using a polycarbonate membrane filter (0.2µm, GTTP, Millipore) and mounted on microscope slides. Preparations were observed by using a confocal microscope (Leica, TCS- SP2) at the Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona (SCT-UB).

4.1.2 FISH of FLA

Acanthamoeba and *H. vermiformis* strains cells were obtained by culturing amoebal strains on NNA agar plates seeded with fresh *E. coli* at 30°C for 10±2 days. Trophozoites were harvested from the plates on day 2 before the population encysted, while cysts were obtained after 10 days.

FLA FISH was performed by using an adaptation of the kit Fluorescence *in-situ* Hybridization for *L. pneumophila* (Microbial Diagnostics, Ribo technologies). Briefly, 1 mL of amoeba cells recovered from agar plates with Ringer 1/40 containing approximately 10⁵ cells/mL were centrifuged at 800 g for 15 min and fixed with the fixative buffer for 20 min at 4°C. After fixation, cells were collected by centrifugation and washed with the buffer provided. After another centrifugation step, cells were dehydrated resuspending them into 300 µl of 70% ethanol and incubated for 5 min at room temperature. 150 µL of the dehydrated cells were then centrifuged and the pellet was resuspended with the hybridization buffer which includes a specific probe EUK516 (Cy5-CCAGACTTGCCCTCC), specific for the *Eukaria* Domain (Schmitz-Esser *et al.* 2008) at a final concentration of 50 ng. Cells were then incubated for 16 hours at 54°C in the dark.

After hybridization, 20 µL of the suspension were washed with 4 mL of the provided pre-warmed buffer for 20 min at 54°C in the dark. After the washing step, samples were filtrated by using a polycarbonate membrane filter (0.2µm, GTTP, Millipore) and mounted on microscope slides. Preparations were observed by using a confocal microscope (Leica, TCS- SP2) at the Serveis Científic-Tècnics of the University of Barcelona (SCT-UB).

4.1.3 FISH used for *L. pneumophila* co-culture monitoring

The intracellular presence of *L. pneumophila* sg.1 environmental strain within *Acanthamoeba* strains was monitored by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using the kit Fluorescence *in-situ* Hybridization for *L. pneumophila* (Microbial Diagnostics, Ribo technologies) adapting manufacturers instructions to the experiment. The protocol followed was exactly the same that in case of FISH of FLA strains, using as a sample 1mL of the co-culture at different time points.

5. Quantification of microorganisms

5.1 Quantification of *Legionella* spp.

5.1.1 By culture on BCYE agar plates

As the gold standard for *Legionella* spp. quantification worldwide (ISO), we used this method as a reference to compare the effectiveness of the rest of methods implemented and because is comparable with most of the studies in the literature.

So, after the disinfection treatments, ten-fold dilution series in Ringer 1/40 of each treated and control samples were transferred to BCYE plates for the enumeration of *Legionella* viable colony-forming units (Anonymous 2005). Plates were incubated at 37°C for 10±2 days.

5.1.2 By molecular methods, real time PCR

A quantitative polymerase chain reaction (qPCR), also called real-time polymerase chain reaction, is a laboratory technique of molecular biology based on the polymerase chain reaction (PCR), which is used to amplify and simultaneously quantify a targeted DNA molecule. We implemented two qPCRs, the first one for the quantification of *Legionella* spp., and the second one for the quantification of *L. pneumophila*.

- *Legionella* spp. qPCR, was implemented by an adaptation of the protocol described by (Declerck *et al.* 2007). Primers LegF (5'-CTAATTGGCTGATTGTCTTGAC-3'), LegR (5'-GGCGATGACCTACTTTCG-3') and the TaqMan probe (5'-VIC-CGAACTCAGAAGTGAAAC-MGB- 3') were used to amplify a 259-bp DNA fragment sequence on 23S-5S spacer of *Legionella* spp. Details of the qPCR protocol are described in the Annex.
- *L. pneumophila* qPCR was implemented by an adaptation of the protocol described by (Diederer *et al.* 2007, Cervero-Aragó 2009). Primers mipF1 (5'-GCCAAGTGGTTTGCAATACCCC-3') and mipR1 (5'-CTCGACAGTGACTGTATCCGATTT-3') and the TaqMan probe Lpn-mip (FAM-5'-TAATCAATGCTGGAAATGGTGTTAAACCCG-3'-TAMRA) were used to amplify the *mip* the gene of *Legionella pneumophila*. The amplicon was 80pb. In order to obtain a better standard curve the amplification thermal profile was changed, from a unique hybridization and elongation step to hybridization and elongation separate steps. Details of the qPCR protocol are described in the Annex.

5.2 Quantification of FLA by using the Most Probable Number method in agar plates.

Once the disinfection treatments were performed, ten-fold dilution series in Ringer 1/40 were transferred to NNA plates previously seeded with five spots of 20 µL of fresh *E. coli* WG5. For every *E. coli* spot, 10 µL of the diluted treated sample was added. The plates were incubated at 30°C for 8 days and checked every 2 days using inverted microscopy (Axiovert25, Zeiss). The presence of trophozoites in a dilution spot was considered positive. The MPN values were obtained from MPN tables (ISO 8199:2005) (Anonymous 2005).

5.3 Quantification of *L. pneumophila* associated with *Acanthamoeba* strains

After disinfection treatments applied, ten fold dilution series in Ringer 1/40 of each sample were transferred on BCYE plates for the enumeration of *L. pneumophila* viable colony forming units as described above. In case of UV irradiation experiments, the procedure was performed under dark conditions to avoid photoreactivation.

In case of *Acanthamoeba* trophozoites, the quantification was performed by using the MPN method described above.

6. Material and reagents used for disinfection treatments

6.1 Chlorine experiments

6.1.1 Matrix, material preparation and reagents used for chlorine exposure

- Water matrix: Commercial natural mineral water, Viladrau (1.5 L)

- Glassware treatment:

Glassware treatment was made chlorine demand free by overnight soaking in a solution of at least 100 mg free chlorine/L. Beakers were then rinsed with chlorine-demand-free water and baked for at 4 h at 400°C. After this initial treatment, for each experiment only soaking in free chlorine and rinsing in demand free water was performed for all glassware.

- Reagents:

- o Free-chlorine concentration

Free chlorine concentration was measured by the *N,N*-diethyl-phenylenediamine (DPD) method (BOE 140:2003) by using HI 95711 Free & Total Chlorine (Hanna)

were the reaction between chlorine and the DPD reagent causes a pink tint in the sample. The HI 95711 meter measures the free and total chlorine (Cl_2) content in water samples in the 0.00 to 5.00 mg/L (ppm) range. The method is an adaptation of the USEPA METHOD 330.5 for wastewater, and Standard Method 4500-Cl G for drinking water. The reagents are in powder form and are supplied in packets (HI 93701).

○ Sodium hypochlorite stock solution

A chlorine stock solution of 100mg/L was prepared using bleach (commercial sodium hypochlorite solution, of approximately 42 g of free chlorine/L) suitable to tap water disinfection. The solution was kept at 4°C for further experiments at maximum of one month. Chlorine concentration was measured before every disinfection experiment. Dilution of this stock solution, in chlorine-demand-free water, was carried out to achieve free chlorine concentrations used in the disinfection experiments.

○ Sodium tiosulphate solution (3%)

The solution was prepared by dissolving 30 g of sodium tiosulphate per liter of deionized water.

○ Buffered Demand Free water (BDF)

BDF water was prepared by dissolving 0.54 g of Na_2HPO_4 (anhydrous) and 0.88 g of KH_2PO_4 (anhydrous) per liter of deionized water. The pH was adjusted to 8 with 1 M NaOH.

6.1.2 Experimental protocol

100 mL of mineral water were placed on chlorine-demand-free glass beakers. Immediately prior to each experiment, the free chlorine concentration of the stock solution was measured by the DPD method, and the volume necessary to achieve the initial free-chlorine dose in each experimental beaker was calculated. Moreover, mineral water chlorine concentration, temperature and pH were also measured.

Three experimental reaction beakers were analyzed for every experimental condition.

- First reaction beaker: mineral water was inoculated with the free-chlorine stock solution and immediately stirred. The beaker was sampled to determine the initial (at 10 s) free-chlorine dose in the absence of any chlorine demand that may occur

with microorganisms addition and sampled again every 15 min until 1h to determine the natural free-chlorine decay.

- Second reaction beaker: mineral water was inoculated with 100 μL of microorganisms suspensions in order to determine the effect of mineral water on the different microorganisms.
- Third reaction beaker: mineral water was inoculated with the free-chlorine stock solution and immediately stirred. The beaker was sampled to check that water reached the chosen chlorine concentration.

After that, 100 μL of microorganism suspension was inoculated to the beaker. Samples were taken successively at chosen times. For every sampling time, chlorine concentration was also measured.

In order to determine microorganism's inactivation by free chlorine, 2 mL samples were taken successively from the beaker at chosen times throughout the reaction. Residual free chlorine was immediately quenched by placing the 2 mL samples into collection tubes containing 100 μL of sterile 3% sodium thiosulphate solution.

6.1.3 Statistical data analysis

The inactivation of different microorganisms was defined as a logarithmic reduction (N/N_0), where N_0 and N were the concentrations of cultivable organisms of *Legionella* or the MPN of the amoebae, before and after chlorination, respectively.

The data reported in this chapter were obtained independently in triplicate. The results are reported as the mean \pm standard deviation (SD). The experimental conditions were statistically analyzed using full factorial ANOVA tests (Statgraphics[®] Plus 5.1); p values less than 0.05 were considered to indicate statistical significances. After the ANOVA test, the pairwise Fisher's LSD (Least Significant Difference) test was used to discern between the means in cases of significant difference (Statgraphics[®] Plus 5.1). Before any statistical analysis, the data were checked for compliance with ANOVA assumptions. The graphs were plotted using GraphPad Prism 4.

The chlorine disinfection was characterized by the efficiency factor Hom (EPH) model (de Abreu Corrêa *et al.* 2012), a widely used model that takes into account the decreasing chlorine concentration caused by the microorganisms itself and the organics present in solution. The chlorine concentration in each experiment is therefore modelled as a first-order kinetic equation:

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

Where $C(t)$ is the residual chlorine concentration in mg/L (or ppm) at time t (in min), C_0 is the initial chlorine concentration, and k' is the first order decay rate constant. C_0 and k' from equation 1 were used in the following equation to the model disinfection kinetics:

$$\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -kC_0^n t^m \left(\frac{1 - e^{-nk' t/m}}{nk' t/m}\right)^m \quad (2)$$

Where k is the inactivation rate constant, n is the coefficient of dilution and m is the Hom's exponent. To determine the parameter value for both equation, Microsoft Excel Solver (Microsoft Excel 2010; Microsoft Corp.) was used to minimize the error sum squares between the observed and predicted $C(t)$ and $\ln(N(t)/N_0)$ for each microorganism disinfection replicate of each experiment.

6.2 Thermal treatment

6.2.1 Matrix, material and reagents

- Matrix: Ringer 1/40
- Dialysis bags (Medicell International Ltd). Dialysis bags were pre-treated to ensure a uniform pore size (molecular weight cut-off of 14kDa) before used. To that, bags boiled for 10 min in a Washing solution (20 g Na_2CO_3 , 5 mL of EDTA 0.2 M in 1L of deionized water), followed by a washing step with deionized water and boiled for 10 min more in an EDTA solution (5 mL of EDTA 0.2 M in 1L of deionized water). Bags were stored at 4°C for a maximum time of 1 month. Details of these solutions are described in section Annex.
- Thermal exposure: Water bath, (Wasserbad Water Bath 1002-1013, GFL).

6.2.2 Experimental protocol

For the study of microbiological inactivation by thermal treatment, a microcosms system using dialysis bags was designed. Bags containing 3 mL of each *Legionella* suspension or 2 mL for FLA suspensions were sealed with a knot and placed in the water bath.

For *Legionella* experiments 5 experimental temperatures were chosen: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C and 70°C, whereas FLA experiments were performed at 50°C, 60°C and 70°C. For the *L.*

pneumophila sg. 1 environmental associated to two cultures with *Acanthamoeba* strains, the chosen temperatures were 50°C, 55°C, 60°C and 70°C.

Once thermal treatments were performed, microbial suspensions were recovered by cutting the knot and plated where corresponded.

6.2.3 Statistical analysis

The data reported in this study were obtained independently in triplicate. The results are reported as the log reduction mean \pm standard deviation (SD). The experimental conditions were statistically analysed using full factorial ANOVA tests (Statgraphics® Plus 5.1); *p* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. After the ANOVA test, the pairwise Fisher's LSD (Least Significant Difference) test was used to discern between the means in cases of significant difference (Statgraphics® Plus 5.1). Before any statistical analysis, the data were checked for compliance with ANOVA assumptions. The graphs were plotted using GraphPad Prism 4.

Legionellae and FLA inactivation was calculated as the decrease in log₁₀ units (log reduction Nt/N₀), where N₀ is the value at the beginning of the experiment and Nt is the value at the times indicated (t). Inactivation kinetics were modelled using a monophasic exponential decay and a polynomial first order regression (straight line) following Chick Watson's law (Chick 1910):

$$\log_{10} (Nt) = \log_{10} (N_0^{-\lambda t})$$

where λ is the inactivation kinetic constant. The model parameters were estimated by the least squares estimation and the best fitting model was chosen using the Akaike Information Criterion (Hurvich *et al.* 1989). A correlation coefficient of R² was added. The times required to achieve a 4-log reduction in case of *Legionella* and a 3-log reduction for the FLA were estimated by solving (t) with the equations mentioned above using the most likely parameter values. All data were fitted to the experimental data using the program GraphPad Prism 4.

6.3 UV irradiation experiments

6.3.1 Matrix and reagents

- Matrix: Ringer 1/40

6.3.2 Description of the UV device

A board mounted with 10 low-pressure mercury UV lamps (EK 36, length 500 mm, wavelength 253.7 nm, ozone free, Katadyn) was horizontally suspended over the irradiation vessel. An aperture (60 mm by 60 mm) was fixed directly below the UV lamps, providing a bundle of quasi-parallel radiation to the irradiation vessel. The aperture was equipped with optical wire made of different types of mesh, resulting in fluence rates of approximately 2, 0.2 and 0.02 W/m². The UV fluence of 253.7 nm was measured on-line with a research radiometer (IL 1700 SED 240, International Light, USA), taking into consideration the absorption at 253.7 nm of the test suspension and the reflection at the surface, as described previously (Sommer *et al.* 1995). The irradiation equipment was evaluated for reliability in an international laboratory trial for UV irradiation devices (Sommer *et al.* 1995). The experiments were performed at room temperature.

6.3.3 Experimental protocol

In the experiments, the UV fluence was varied by the exposure time. The test suspensions (25 mL) were irradiated in sterile petri dishes (diameter 90 mm) placed on a magnetic stirrer with permanent mixing; the depth of the suspension was 4 mm.

For the inactivation experiments, the UV-253.7 susceptibility of the 5 *Legionella* and the 4 FLA test strains were roughly estimated in pre-tests. For the main experiments, five UV-253.7 nm fluences were chosen, and the analyses of the *Legionella*, amoebal and co-culture suspensions were performed in triplicate. Each of the UV fluences was obtained by using a 0.2 W/m² UV fluence rate, resulting in five exposure times for *Legionella* experiments, and using a 2 W/m² UV fluence rate for amoebal and co-culture experiments, also resulting in five exposure times. These exposure times differed by a factor of 10 in the case of the *Legionella* strains and a factor of 100 for most amoebal suspensions, to obtain a minimum irradiation time of at least 30 s, ensuring homogeneous irradiation conditions for the suspensions. The test suspensions were processed as described above immediately after irradiation in dark conditions to avoid photoreactivation.

6.3.4 Statistical analysis

The inactivation of different microorganisms was defined as a logarithmic reduction (N/N_0), where N_0 and N were the concentrations of cultivable organisms of *Legionella* or the MPN of the amoebae, before and after irradiation, respectively. As controls, identical samples were stirred and held for the same length of time as that required for irradiation.

The data reported in this chapter were obtained independently in triplicate. The results are reported as the mean \pm standard deviation (SD). The experimental conditions were statistically analyzed using full factorial ANOVA tests (Statgraphics[®] Plus 5.1); p values less than 0.05 were considered to indicate statistical significances. After the ANOVA test, the pairwise Fisher's LSD (Least Significant Difference) test was used to discern between the means in cases of significant difference (Statgraphics[®] Plus 5.1). Before any statistical analysis, the data were checked for compliance with ANOVA assumptions. The graphs were plotted using GraphPad Prism 4.

Inactivation kinetics for *Legionella* and FLA strains were fitted to the first-order polynomial described by the equation suggested by Sommer *et al.* (2000) and Coohill *et al.* (2008):

$$\log (N/N_0) = b - k^* \text{Fluence.}$$

Using the curve parameters b (y-intercept), also defined as the shoulder broadness, and $-k^*\text{Fluence}$ (slope; m^2/J), the inactivation rate constants were calculated (Sommer *et al.* 2000, Hijnen *et al.* 2006, Coohill *et al.* 2008). The correlation coefficient R^2 was used to check the robustness of the chosen model. In addition, the required UV fluences for 1 log and 3 log reductions were calculated. These parameters are described as the fluences (J/m^2) required to reduce the cultivability of the initial microbial population by 90% or 99.9%, and it corresponds to the value of X in the equation when $Y = 1$ or when $Y=3$. All models were fitted to the experimental data using the program GraphPad Prism 4.

RESULTATS I DISCUSSIÓ
RESULTS AND DISCUSSION

CHAPTER 1, SETTING OF MATERIAL AND METHODS

1.1 Identification of *Legionella* strains

Several methods were used in order to identify *Legionella* isolates obtained:

- Identification of *Legionella* species by serology

The two isolates were identified as *Legionella pneumophila* sg. 1 and *Legionella pneumophila* sg. 2-14 by using the *Legionella* agglutination test (*Legionella* latex test; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) following the manufacturer's instructions.

- Identification of *Legionella* species by using molecular methods

o *Legionella* identification by DNA sequencing

The obtained sequences were compared with the nucleotide sequences available in the Genbank using the BLAST algorithm from NCBI (National Center for Biotechnology Information), and were aligned with the ClustalX2 programme (Altschul *et al.* 1990). Following that, the two isolates were classified as *Legionella pneumophila* (>99% identity).

o *L. pneumophila* sg. 2-14 environmental identification

The typing of our isolate of *L. pneumophila* 2-14 environmental strain was performed by using MALDI-TOF. The strain was classified as *L. pneumophila* sg. 8. We want to thank Dr. Regina Sommer for offering the possibility to do it.

1.2 Identification of FLA strains

1.2.1 Identification of FLA species by morphology

The isolated free-living amoeba strains were classified as a member of the genus *Acanthamoeba*, and a presumptive *Hartmannella vermiformis*. The isolation and identification of FLA was advised by O. Canals and Dr. H. Salvadó from the Departament de Biologia Animal, Universitat de Barcelona.

1.2.2 FLA identification by sequencing

The obtained sequences were compared with the nucleotide sequences available in the Genbank using the BLAST algorithm from NCBI (National Center for Biotechnology Information), and were aligned with the ClustalX2 programme (Altschul *et al.* 1990). The two isolates were classified as *Hartmannella vermiformis* and *Acanthamoeba sp.* (>98% identity for both strains).

1.3 Co-cultures between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* trophozoites

Several co-cultures were realized between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* trophozoites as described in the Material and Methods chapter. Every co-culture, was monitored at time 24 and 48 h by using an inverted microscope.

Some of the trophozoites of co-culture monolayers changed its morphology from well attached trophozoites to amoeba round bodies as the time goes by after co-culture, however none of the trophozoites turned in to a double wall structure as cysts. After 48h of co-culture some extracellular bacteria were observed as well as some cellular debris, that fact suggests that some *L. pneumophila* may have lysed their amoeba hosts.

1.3.1 Monitoring by culture

L. pneumophila cells were plated on BCYE agar plates at different times after performing co-culture protocols and being incubated at 30°C in PYG medium. A control culture to ensure that *L. pneumophila* cells did not grow on PYG medium was also realized.

L. pneumophila in association with *A. castellanii* CCAP 1534/2 approximately grew 1.2 logs after 48 h, and the same *Legionella* strain in association with *Acanthamoeba sp.* 155 grew 2 logs after 48 h. Because of that and jointly with microscope co-culture monitoring co-cultures were incubated at 30°C for 40 h in case of *Acanthamoeba sp.* 155 or 48 h in case of *A. castellanii* CCAP 1534/2.

It is important to note that despite the *Legionella* concentration at the end of the co-culture protocol, at T₀ was approximately 10⁵ cfu/mL, when it was recovered 40 or 48 h after, it increased until 10⁷ cfu/mL, which means that the concentration of *Legionella* on the co-culture disinfection treatments was higher than the cell concentration used in axenic conditions, except for UV radiation treatments *Legionella* concentration for co-culture experiments was around 10⁵ cfu/mL.

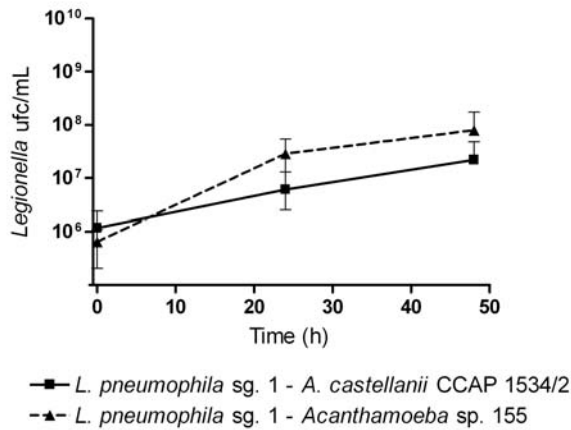


Figure 1.1.1. *L. pneumophila* growth in co-culture with the two *Acanthamoeba* strains.

1.3.2 Monitoring by fluorescent *in situ* hybridization

To ensure that *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* strains were forming endosymbiont in co-culture conditions, we implemented a FISH protocol, first to observe *L. pneumophila*, then to observe FLA and finally to observed *L. pneumophila* within *Acanthamoeba* trophozoites.

1.3.2.1 FISH of *L. pneumophila*

The FISH realized for the detection of *L. pneumophila* was performed by using the kit Fluorescence *in-situ* Hybridization for *L. pneumophila* (Microbial Diagnostics, Ribo technologies) following manufacturers instructions. Results obtained are shown in Figure 1.1.2.

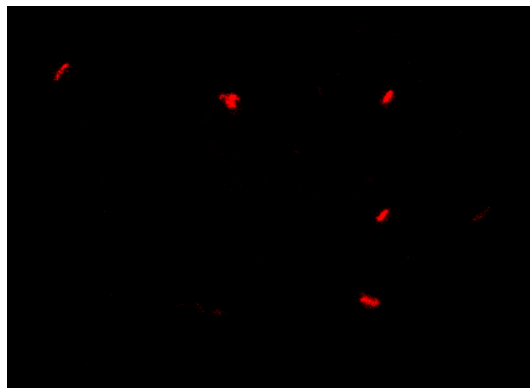


Figure 1.1.2 FISH for the detection of *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152. Results were obtained by using a confocal microscope (Leica, TCS- SP2).

1.3.2.2 FISH of FLA

The FISH realized for the detection of FLA was performed by using the kit Fluorescence *in-situ* Hybridization for *L. pneumophila* (Microbial Diagnostics, Ribo technologies) modifying manufacturer's instructions. After the fixation and dehydration step, a specific probe EUK516 (Cy5-CCAGACTTGCCCTCC), which hybridizes with the 18S rRNA region of *Eukaria* Domain was added at a final concentration of 50 ng (Amann *et al.* 1998, Kuiper *et al.* 2004, Declerck *et al.* 2005, Schmitz-Esser *et al.* 2008).

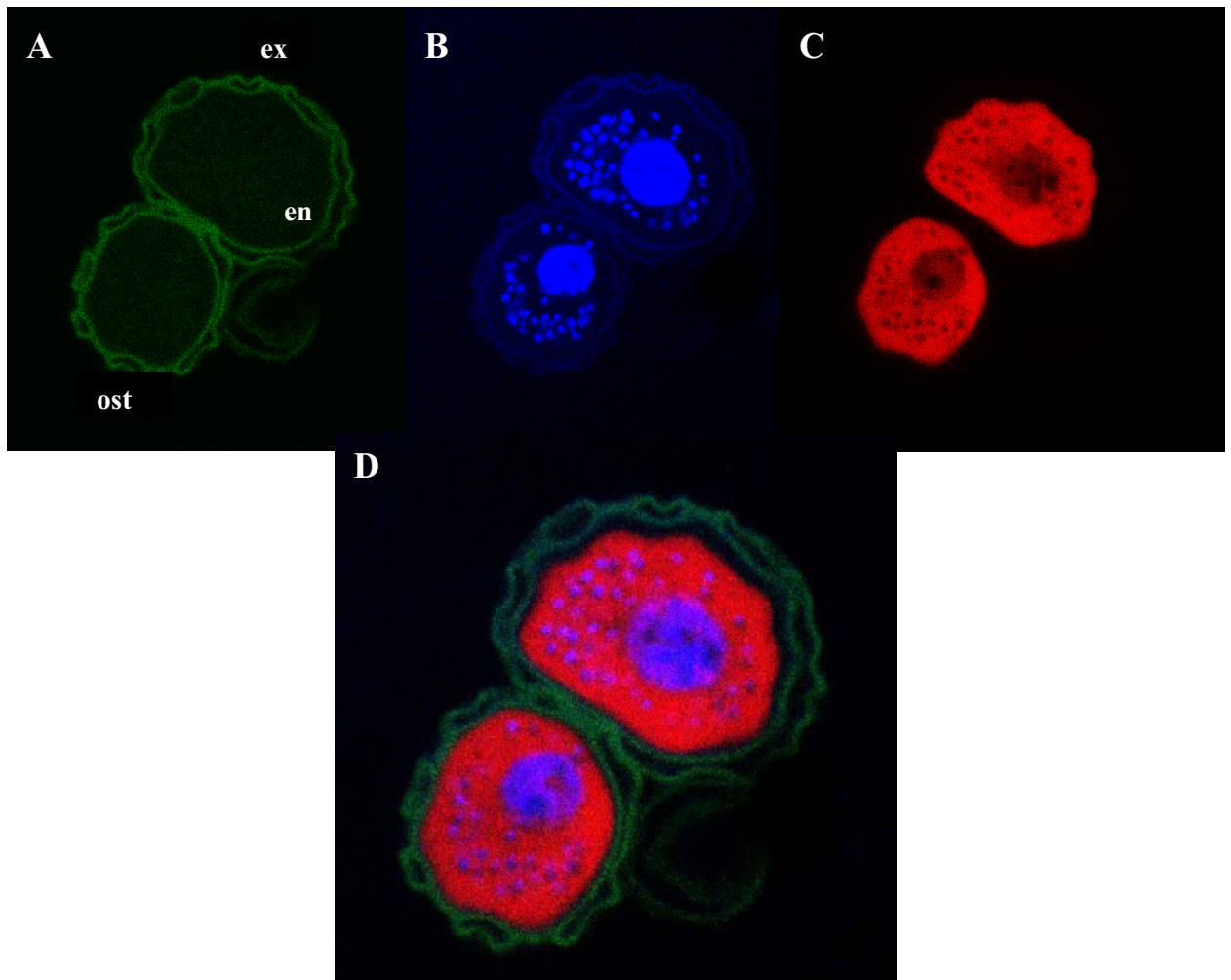


Figure 1.1.3. Pictures obtained by using the confocal microscope Leica TCS-SP2 of the Serveis Científico-Tècnics UB. In the pictures (A) and (B) two autofluorescent cysts of *A. castellanii* CCAP 1534/2 observed with two different filters (emission at 488 nm and at 360 nm respectively) (C) Picture of the same two cysts hybridized with the EUK 516 probe labelled with Cy5 (at 633 nm) (D) Fusion of the three previous pictures. (ex) Exocyst, (en) Endocyst (ost) Ostioles

As observed in the Figure 1.1.3 cysts of *A. castellani* CCAP 1534/2 were observed by using different filters at different wavelength of light emission. Pictures (A) and (B) were obtained due to the own autofluorescence of the amoebae cysts and picture (C) belonged to the hybridization treatment with the probe EUK 516 which was labelled with Cy5. In order to distinguish better the fluorescent dye, colour blue conferred for the Cy5 was changed to colour red by using the software Image J.

In the Figure 1.1.3 (A) and (B) the amoebal cyst wall layers can be differentiate, the exocyst (ex) the outern layer, the endocyst (en) the intern layer as well as the ostioles (ost) hole between the tw layers.

1.3.2.3 FISH used for *L. pneumophila* association with *Acanthamoeba* trophozoites monitoring

In order to observe how the cycle of *L. pneumophila* evolves within *Acanthamoeba* trophozoites the FISH technique was applied at several times after realizing the co-culture. Images showed in the Figure 1.1.4, belonged to the same co-culture and have the same incubation time (24h at 30°C).

Co-cultures realized resulted in the formation of *L. pneumophila* vesicles within *Acanthamoeba* trophozoites after 24 h of incubation at 30°C. The fact that *L. pneumophila* within trophozoites were packed into vesicles discard the option of an extracellular location.

The evolution of *L. pneumophila* association with *Acanthamoeba* trophozoites was not synchronous, no all the trophozoites contained bacterial vesicles, in some cases one trophozoite has more than one vesicle as well as not all bacterial vesicles contained the same number of *L. pneumophila* cells; suggesting that every association cycle depends on intrinsic amoeba and bacterial cell characteristics. E.g. different trophozoite distribution on the Roux flask, attached or not attached trophozoites to flask walls or trophozoite feeding state at the time of co-culture are factors that could alter bacterial uptake.

In the Figure 1.1.4 some of the different states could be observed, in picture (A) as well as in one of the trophozoites in picture (D), amoeba cells were completely full of *L. pneumophila* which after several replication cycles by using intracellular trophozoites components as nutritional source released from the vesicle or vesicles and spread over the cytosol. In picture (B) and (C) replicative vesicles inside *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites were observed as well as some *L. pneumophila* cells attached to the trophozoite membrane.

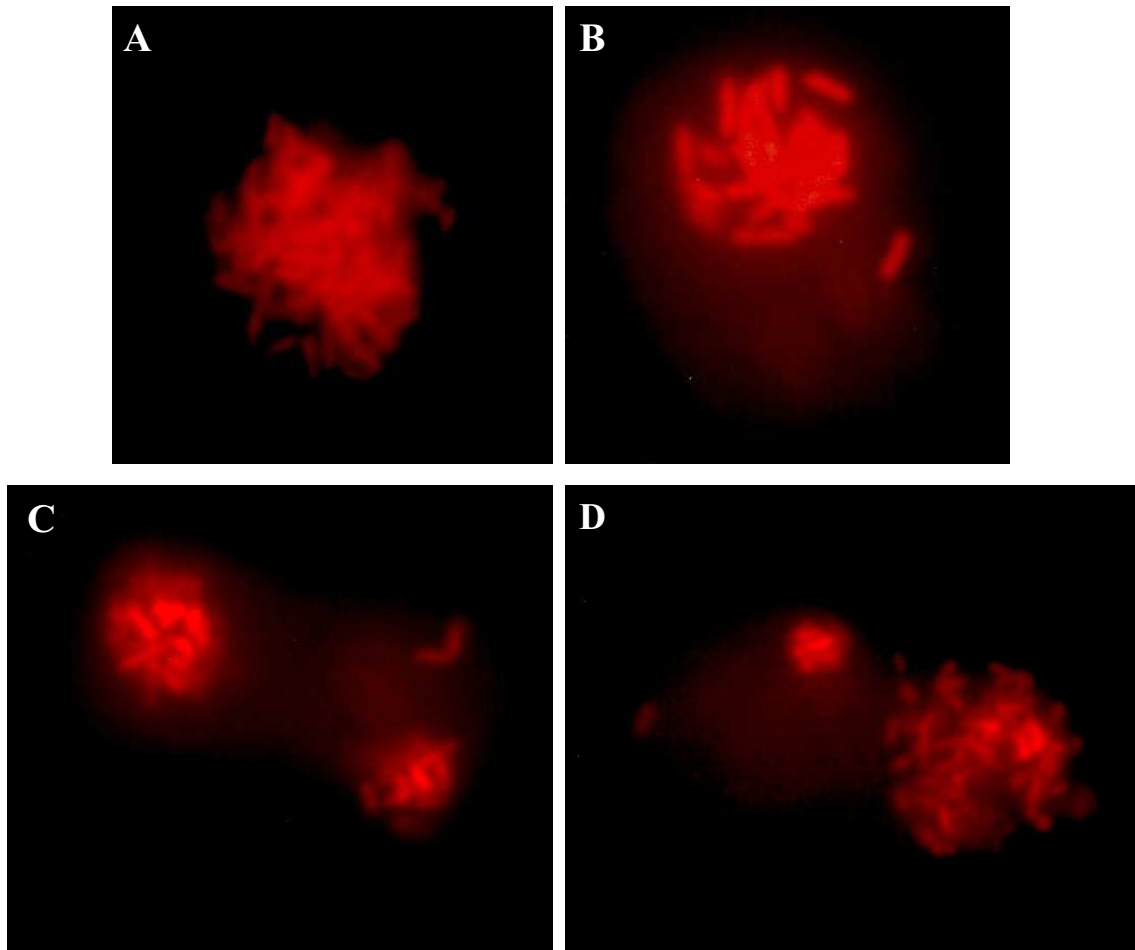


Figure 1.1.4. Images of *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites in association with *L. pneumophila* sg. 1 by using FISH. Pictures were taken at time 24 h after the co-culture following the protocol for chlorine and thermal treatments. In the pictures can be observed *L. pneumophila* bacteria in red, within the autofluorescent trophozoites of *Acanthamoeba* sp. 155. Images obtained by using a confocal microscope (Leica, TCS- SP2)

1.4 Release of *L. pneumophila* from *Acanthamoeba* trophozoites

One of the objectives of this work was to observe how the association between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* trophozoites interferes on the effect of water disinfectants against them. To that, apart of setting of a protocol to promote *L. pneumophila* replication inside trophozoites it was necessary to implement a method to release and quantify intracellular *L. pneumophila* that survive after the disinfection treatments. Thus a method that lyses trophozoites membranes without damaging surviving *L. pneumophila* was required.

A deep search on the literature was realized in order to find the optimum release method. The methods found were applied first on *Acanthamoeba* trophozoites, and then on *L. pneumophila*

cells to quantify the cellular damage by culture on NNA and BCYE agar plates. Some of the release methods tested were summarized below.

Table 1.1.1. Treatments applied on the different microorganisms to observe the effect of the release methods to free *Legionella* from inside *Acanthamoeba* trophozoites. For each treatment, the reference, a brief description of the treatment as well as the mean of log reduction \pm SD obtained, the cell survival % and the number of times tested.

Strain	Reference	Treatment	Log reduction (%) survival	SD (n° exp.)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	(Dupuy <i>et al.</i> 2011)	Centrifuge 10,000 g for 5 min	0 (100%)	0 (3)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Present work	Centrifuge 6,000 g for 10 min, incubation 15 min with H ₂ O _d Sonication 20 pulse (60%).	-1.89 (1.5%)	0.33 (5)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1			-0.63 (52%)	0.66 (2)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	(Moffat <i>et al.</i> 1992)	Pass through Syringe 27G, 3 times up/down	-0.56 (35%)	0.13 (2)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	(adapted from Berk <i>et al.</i> (1998))	Freeze-thawing (-80°C, room temperature)	-2 (4.5)	0.77 (3)
<i>E. coli</i>			-5 (0.001%)	0 (1)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1			-2 (0.92%)	0 (1)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	(Buse <i>et al.</i> 2012)	800 g 10 min, Triton X-100 0.02% 10 min + 5 mL of H ₂ O _d which reduce Triton X-100 to <0.01%	-0.5 (42%)	0.15 (2)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1			-4.17 (0.02%)	1.3 (2)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	(Chambers <i>et al.</i> 1926)	Centrifuge 800 g 10 min, incubation 3 h in 0.15 M NaCl, 800 g 10 min in H ₂ O _d , Sonication 20 pulses (60%)	-2 (6%)	0.57 (11)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1			0 (100%)	0 (2)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	(Chambers <i>et al.</i> 1926)	Centrifuge 800 g 10 min, incubation 3 h in 0.038 M KCl, 800 g 10 min in H ₂ O _d , Sonication 20 pulses (60%)	-2.36 (0.44%)	0.08 (2)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1			0 (100%)	0 (1)
<i>Acanthamoeba</i> spp.	(Chambers <i>et al.</i> 1926)	Centrifuge 800 g 10 min, incubation 3 h in 0.39 M KCl, 800 g 10 min in H ₂ O _d , Sonication 20 pulses (60%)	-2.15 (1.49%)	0.8 (5)
<i>L. pneumophila</i> sg. 1			0 (100%)	0 (1)

Among the treatments tested, treatment repeatability, *L. pneumophila* survival as well as trophozoite lyses were the three main factors considered to choose to better treatment. According to that, we considered Salts Treatments the best treatments (incubation of 3 h with 0.15 M NaCl, 0.038 M KCl, 0.39 M KCl plus a sonication step) because it lysed almost two

logs of both *Acanthamoeba* trophozoites (99%) without harming *L. pneumophila* and showed a greater repeatability represented by low SD values.

However, due to the treatment applied required a sonication step by using a certain probe made very difficult to export this protocol to other laboratories. As the chapter about UV disinfection was performed at the Medical University of Vienna, where the same sonication probe was not available we preferred not to use it. Moreover, the fact of using sonication steps while manipulating pathogenic bacteria which produces pneumonia via contaminated aerosols, was not very recommended. So, at the end, to better compare results obtained from all experiments performed with *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* trophozoites bacterial and amoebal cells were plated without any extra treatment assuming that we could be underestimating the number of survival *L. pneumophila* cells.

1.5 Quantification of microorganisms

Legionella spp. were quantified by plating it on BCYE agar plates, as well as by using molecular methods.

1.5.1 Quantification of *Legionella* by qPCR

We implemented two qPCRs, the first one for the quantification of *Legionella* spp., and the second one for the quantification of *L. pneumophila*.

- *Legionella* spp. qPCR, was implemented by an adaptation of the protocol described by (Declerck *et al.* 2007). Primers LegF (5'-CTAATTGGCTGATTGTCTTGAC-3'), LegR (5'-GGCGATGACCTACTTTTCG-3') and the TaqMan probe (5'-VIC-CGAACTCAGAAGTGAAAC-MGB-3') were used to amplify a 259-bp DNA fragment sequence on 23S-5S spacer of *Legionella* spp.

The standard curve was prepared by using serial dilutions of *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152. Results of standard curves values were summarized in Table 1.1.2. For every assay, the slope, the coefficient of relation and the Ct values for 4 points of the curve were included. Considering that the best fit of a standard curve slope is -3.4, so our curve is close to that result. Apart from that, the variability between assays was low, being less than 1 Ct for three of the four values analysed. At higher dilutions as 10^6 *Legionella* spp. genome copies/reaction were detected at Ct 24 whereas lower dilutions as 10^2 *Legionella* spp. genome copies/reaction were detected at Ct 39. No *Legionella* spp. was detected by dilution lower than 10^1 *Legionella* spp. genome copies/reaction, however, the variability at these bacteria concentration was high (data not shown).

Taula 1.1.2. Summary of the standard curve values obtained, slope, regression coefficient (R^2) and Ct values obtained for 10^0 , 10^2 , 10^4 and 10^6 genome copies of *Legionella* spp. genome copies/reaction.

Assay	Slope	Coeff. R^2	10^0	10^2	10^4	10^6
1	-3.661	0.97	Undet	40.98	31.85	24.82
2	-3.603	0.995	Undet	39.32	31.97	25.02
3	-3.645	0.998	Undet	38.80	31.72	24.32
4	-3.542	0.978	Undet	37.8	30.91	23.45
5	-3.657	0.999	Undet	39.96	32.52	25.03
Mean	-3.621	0.988	Undet	39.37	31.79	24.52
SD	0.05	0.013	Undet	1.19	0.58	0.66

- L. pneumophila* qPCR was implemented by an adaptation of the protocol described by (Diederer *et al.* 2007, Cervero-Aragó 2009). Primers mipF1 (5'-GCCAAGTGGTTTGCAATACCCC-3') and mipR1 (5'-CTCGACAGTGACTGTATCCGATTT-3') and the TaqMan probe Lpn-mip (FAM-5'-TAATCAATGCTGGAAATGGTGTAAACCCG-3'-TAMRA) were used to amplify the *mip* gene of *Legionella pneumophila*. The amplicon was 80pb. In order to obtain a better standard curve the amplification thermal profile was changed, from a unique hybridization and elongation step to hybridization and elongation separate steps. Details of the qPCR protocol are described in the Annex.

The standard curve was prepared by using serial dilutions of *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152. Results of standard curves values were summarized in Table 1.1.3. For every assay, the slope, the coefficient of relation and the Ct values for 4 points of the curve were included. Considering that the best fit of a standard curve slope is -3.4, so our curve is close to that result. Apart from that, the variability between assays was higher than the qPCR of *Legionella* spp. At higher dilutions as 10^6 *L. pneumophila* genome copies/reaction were detected at Ct 21 whereas lower dilutions as 10^2 *L. pneumophila* genome copies/reaction were detected at Ct 35. No *Legionella* spp. was detected by dilution lower than 10^1 *L. pneumophila* genome copies/reaction, however, the variability at these bacterial concentration was high as it happened in the case of *Legionella* spp.

The comparison between the two *Legionella* qPCR showed a higher sensitivity in case of *L. pneumophila* qPCR, as lower bacteria concentrations were detected at lower Ct.

Taula 1.1.3. Summary of the standard curve values obtained, slope, regression coefficient (R^2) and Ct values obtained for 10^0 , 10^2 , 10^4 and 10^6 genome copies of *L. pneumophila*. genome copies/reaction

Assay	Slope	Coeff. R^2	10^0	10^2	10^4	10^6
1	-3.875	0.986	Undet	35.10	27.02	23.04
2	-3.930	0.987	Undet	34.21	27.52	20.02
3	-3.762	0.991	Undet	35.78	27.86	21.83
4	-3.481	0.929	Undet	34.89	29.89	20.20
5	-3.438	0.999	Undet	33.80	27.28	20.24
Mean	-3.59	0.980	Undet	34.75	27.91	21.06
SD	0.13	0.03	Undet	0.77	1.15	1.32

CHAPTER 2

CHAPTER 2: RESULTS AND DISCUSSION CHLORINE TREATMENTS

2.1 RESULTS

In the present work, the effect of chlorine (sodium hypochlorite) was studied on two *L. pneumophila* strains, *L. pneumophila* sg. 1 strain ATCC 33152 and *L. pneumophila* sg. 1 environmental; on two FLA strains, *Acanthamoeba castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155; and on the association between the two *Acanthamoeba* strains with *L. pneumophila* sg. 1 environmental strain.

2.1.1 Free chlorine effect on *L. pneumophila* sg. 1 strains

Two strains of *Legionella* spp., *L. pneumophila* sg.1 ATCC 33152 and an environmental strain of *L. pneumophila* sg.1 were inactivated by an exposure to two different concentrations of free chlorine.

Results showed that there were no significant differences in the inactivation of both *L. pneumophila* sg. 1 strains after an exposure to 0.2 ppm of free chlorine for 24 min. However, at 0.5 ppm, some significant differences between strains were found after 1 and 4 min respectively.

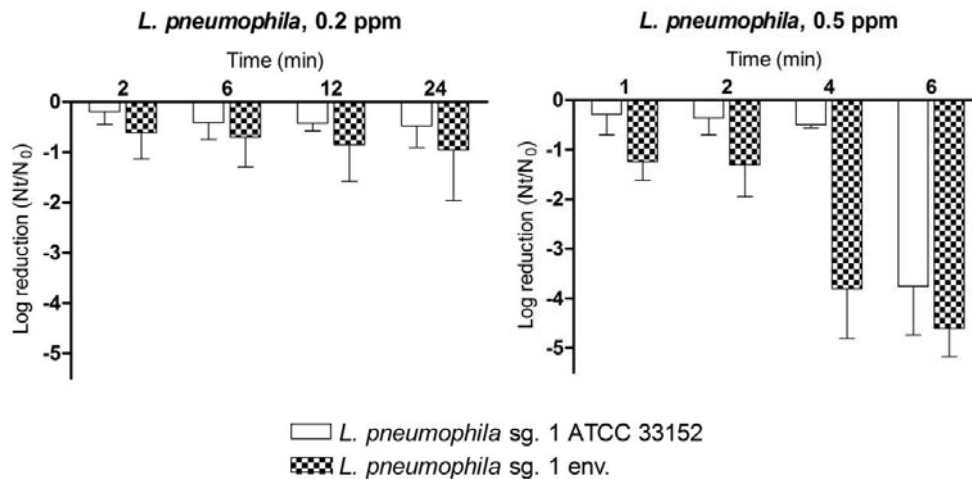


Figure 2.1. Free chlorine effect on the inactivation of two *L. pneumophila* sg. 1 strains, at 0.2 ppm and 0.5 ppm. Bacterial inactivation was determined using viable counts on BCYE medium. Data are presented as means \pm SD (columns and error bars). Time is presented in minutes.

2.1.2 Inactivation kinetics of *L. pneumophila* sg. 1 strains in front free chlorine

The kinetics for the two *L. pneumophila* sg. 1 strains inactivation fitted a one phase exponential decay (monophasic) model, represented by an initial decrease in cell concentration followed by softer slope which can reach stability. *L. pneumophila* sg. 1 strains exposed to 0.2 ppm of free chlorine followed this pattern. At that concentration *Legionella* suspensions were reduced less than 1 log.

Nevertheless, at higher chlorine concentrations such as 0.5 ppm, the behaviour of both strains changed and although they still fitted a one phase exponential decay (high R^2 values indicate the robustness of the estimated model), the slope representing the decrease of the number of cells was steeper.

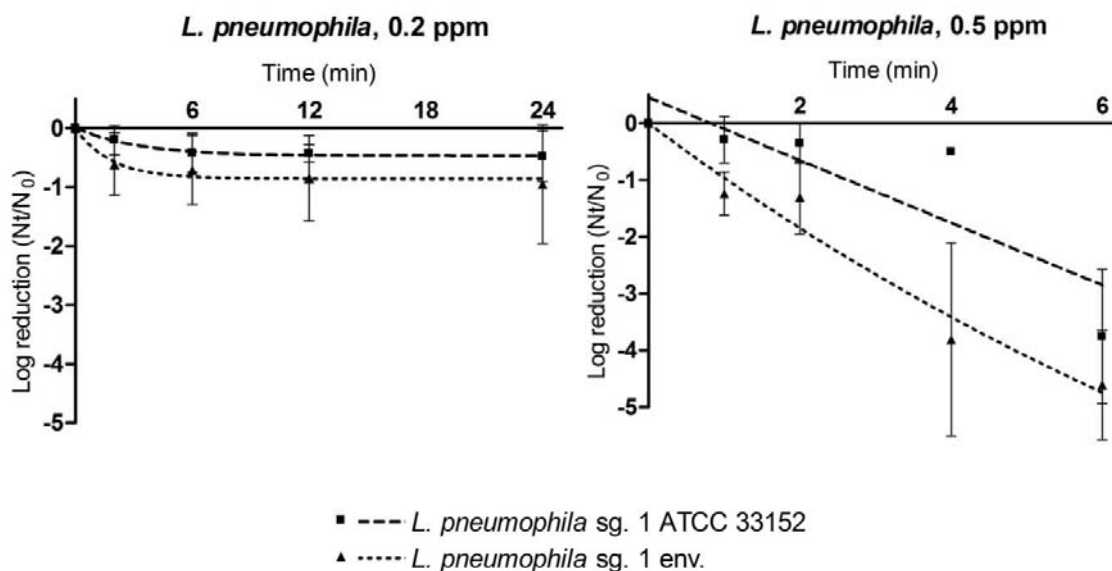


Figure 2.2. Free chlorine effect on the inactivation of two *L. pneumophila* sg. 1 strains, at 0.2 ppm and 0.5 ppm. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics for *Legionella* strains fitted to a monophasic exponential decay model and the estimated parameters of the model are shown as dashed lines.

The effectiveness of the treatment at 0.5 ppm was much higher than at 0.2 ppm, and significant differences in the inactivation pattern of both *L. pneumophila* strains were found. The estimated time required to reduce 4 log of *L. pneumophila* sg.1 ATCC 33152 strain was 8.11 min, whereas an estimated 5.19 min exposure was needed to obtain the same result for the environmental *L. pneumophila* sg.1 strain.

$C(t)$ values were calculated for both *L. pneumophila* sg. 1 strains exposed to both chlorine concentrations. At 0.2 ppm bacterial suspensions were reduced less than 1 log, because of that

C(t) values could not be estimated. At 0.5 ppm, C(t) values to achieve a 4 log reduction ($C(t)_{99.99}$) were 0.67 for *L. pneumophila* sg.1 Philadelphia ATCC 33152 and 0.48 for *L. pneumophila* sg.1 environmental (Table 2.1).

Table 2.1. Calculated parameters for the chlorine inactivation curves of two *L. pneumophila* strains exposed to 0.2 ppm and 0.5 ppm. Inactivation kinetics for *L. pneumophila* strains fitted to a one phase exponential model (monophasic). R^2 values showed the robustness of the model. C(t) values are represented as (ppm x min)

Chlorine	<i>Legionella</i> strains	Equation of the line	R^2	Required time (min)		C(t) ₉₀	C(t) _{99.99}
				1-log	4-log		
0.2 ppm	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	Monophasic	0.989	NA	NA	NA	NA
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	Monophasic	0.958	NA	NA	NA	NA
0.5 ppm	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	Monophasic	0.721	2.64	8.11	0.22	0.67
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	Monophasic	0.964	1.29	5.19	0.12	0.48

2.1.3 Free chlorine effect on *Acanthamoeba* spp.

To investigate the effectiveness of chlorine exposure against FLA, two strains were tested: *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 environmental. Each experiment was performed considering the amoebal life stage: trophozoite or cyst. Both life stages were exposed to two sodium hypochlorite concentrations, 1.2 ppm and 2.5 ppm (Figure 2.3).

Results showed that the effectiveness of chlorine exposure was significantly higher on trophozoites compared to cysts especially at 2.5 ppm. Significant differences in inactivation patterns were found between life stages of *A. castellanii* CCAP 1534/2 for exposures longer than 2 min at both chlorine concentrations. No significant differences were found between trophozoites and cysts of the environmental *Acanthamoeba* sp. 155 strain, after an exposure to 1.2 ppm. However, significant differences were found between these life stages at 2.5 ppm after an exposure of 60 min.

A comparison between strains showed that *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites were significantly the most sensitive to chlorine exposure for both concentrations tested being reduced around 3 logs after and exposure of 30 min at 1.2 ppm and after 15 min at 2.5 ppm.

Thus, significant differences were found when comparing trophozoites inactivation between *Acanthamoeba* strains, as *Acanthamoeba* sp. 155 did not achieve a 3 log reduction in any of the conditions applied.

In the case of the cysts, no significant differences were found between *Acanthamoeba* strains. Chlorine treatments applied reduced less than one log the cysts suspensions, either at 1.2 ppm or at 2.5 ppm.

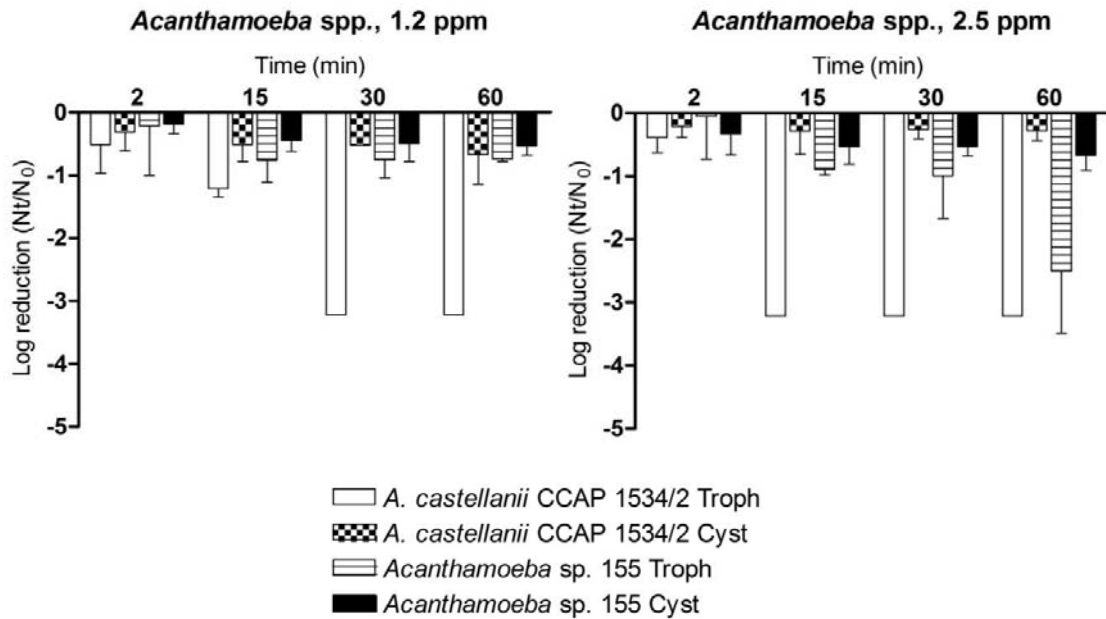


Figure 2.4. Free chlorine effect on the viability of trophozoites and cysts of two FLA strains *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 at 1.2 ppm and 2.5 ppm. Inactivation was determined using an adaptation of the MPN method. Data are presented as logarithmic reduction mean \pm standard deviation (SD). Time is presented in minutes.

2.1.4 Inactivation kinetics of *Acanthamoeba* spp. by front sodium hypochlorite

The inactivation kinetics for the four FLA strains fitted a one phase exponential decay (monophasic) model. Even though the effectiveness of the chlorine treatment applied differs from trophozoites to cysts, the monophasic model is still usable to describe the *Acanthamoeba* strains inactivation (Figure 2.5). Due to the latter point, and because cysts of both *Acanthamoeba* strains did not achieve a reduction higher than 1 log, some of the model parameters such as $C(t)$ values could not be estimated (Table 2.2). On the one hand, the estimated time required for trophozoites of *A. castellanii* CCAP 1534/2 to achieve a 3 log reduction after an exposure to 1.2 ppm was 39.51 min and the $C(t)$ value for that reduction was

22 ppm x min Furthermore it was estimated that it required 16.35min to reach the same result at 2.5ppm with a C(t) value of 30.46 ppm x min.

On the other hand, the inactivation kinetics for *Acanthamoeba* sp. 155 strain trophozoites was reduced more than one log. At that chlorine concentration, the 3 log reduction was estimated to be reached after a 74.09 min exposure with a C(t) value of 109.03 ppm x min.

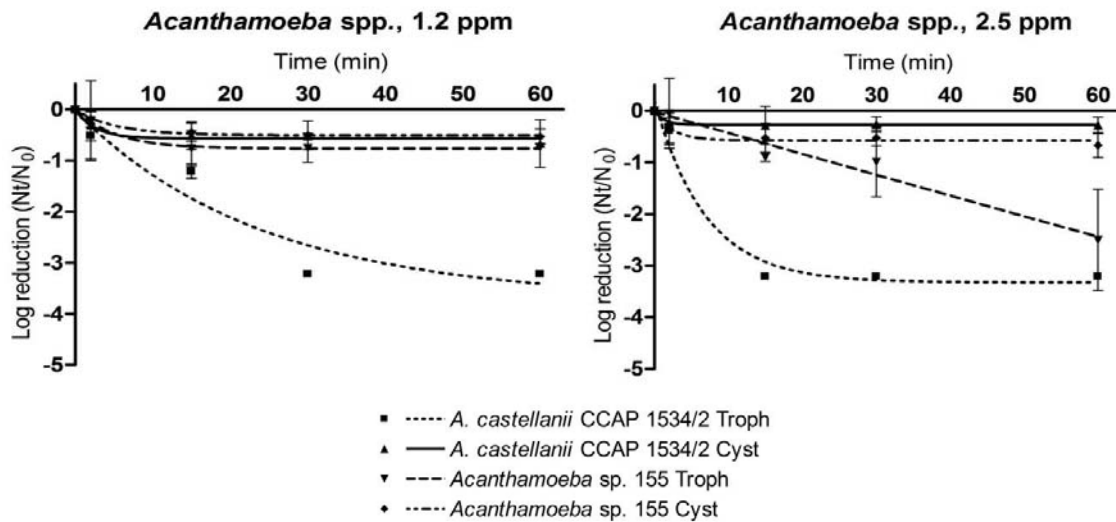


Figure 2.5. Free chlorine effect on the viability of trophozoites and cysts of two *Acanthamoeba* strains at 1.2 ppm and 2.5 ppm. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics for *Acanthamoeba* strains fitted to a monophasic exponential decay model. The estimated parameters of the models are represented in dashed lines.

Table 2.2. Calculated parameters for the chlorine inactivation curves of two *Acanthamoeba* strains exposed to 1.2 ppm and 2.5 ppm. Inactivation kinetics for the *Acanthamoeba* strains fitted to a one phase exponential model (monophasic). R^2 values showed the robustness of the model. C(t) values are represented as (ppm x min).

	FLA strains	Life stage	Equation of the line	R^2	Required time (min)		C(t) ₉₀	C(t) _{99.9}
					1-log	3-log		
1.2 ppm	<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Troph	Monophasic	0.927	7.33	39.51	6.33	22
		Cysts	Monophasic	0.941	NA	NA	NA	NA
	<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Troph	Monophasic	0.994	NA	NA	NA	NA
		Cysts	Monophasic	0.988	NA	NA	NA	NA
2.5 ppm	<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Troph	Monophasic	0.979	2.86	16.35	6.23	30.46
		Cysts	Monophasic	0.996	NA	NA	NA	NA
	<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Troph	Monophasic	0.967	23.99	74.09*	48.38	109.03
		Cysts	Monophasic	0.952	NA	NA	NA	NA

(*) estimated parameter

2.1.5 Free chlorine effect on *L. pneumophila* sg. 1 in association with *Acanthamoeba* spp.

2.1.5.1 Effect on *L. pneumophila* sg. 1

The effect of sodium hypochlorite was evaluated on *L. pneumophila* sg. 1 environmental in association with *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 (Figure 2.6). Overall, significant differences were found between the inactivation of both associations performed, being *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 more sensitive to chlorine exposure compared to *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2.

At 0.5 ppm, significant differences between the two associations tested were found every time stage. At the end of the treatments *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 achieved a 3 log reduction whereas *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 was less than one log reduced.

Results of *L. pneumophila* sg. 1 environmental not associated to protozoa (axenic) was included in the graph to enable the comparison of their inactivation pattern. Results showed significant differences between the inactivation of *L. pneumophila* axenic and *L. pneumophila* associated to protozoa, especially for times over 6 min in the case of the association with *A. castellanii* CCAP 1534/2. Axenic *L. pneumophila* achieved a 5 log reduction after 30 min at 0.5 ppm, whereas *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 was reduced 3 logs and *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 was reduced less than one log.

At 1.2 ppm, significant differences in inactivation were found between both *L. pneumophila* associations tested in time stages below 15 min. Nevertheless, at longer expositions more similarity was observed. *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 achieved a 2.95 log reduction after 30 min of exposure whereas *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 was 1.2 logs reduced.

At 2.5 ppm, no significant differences between the *L. pneumophila* associations were observed. After 30 min of exposure *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 achieved a 3.8 log reduction and *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 was reduced 3.12 logs. Although the effectiveness of chlorine treatment was higher at 2.5 ppm in comparison to 1.2 ppm for the association between *L. pneumophila* and *A. castellanii* CCAP 1534/2, in the case of *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 the effectiveness of the treatment did not differ as much.

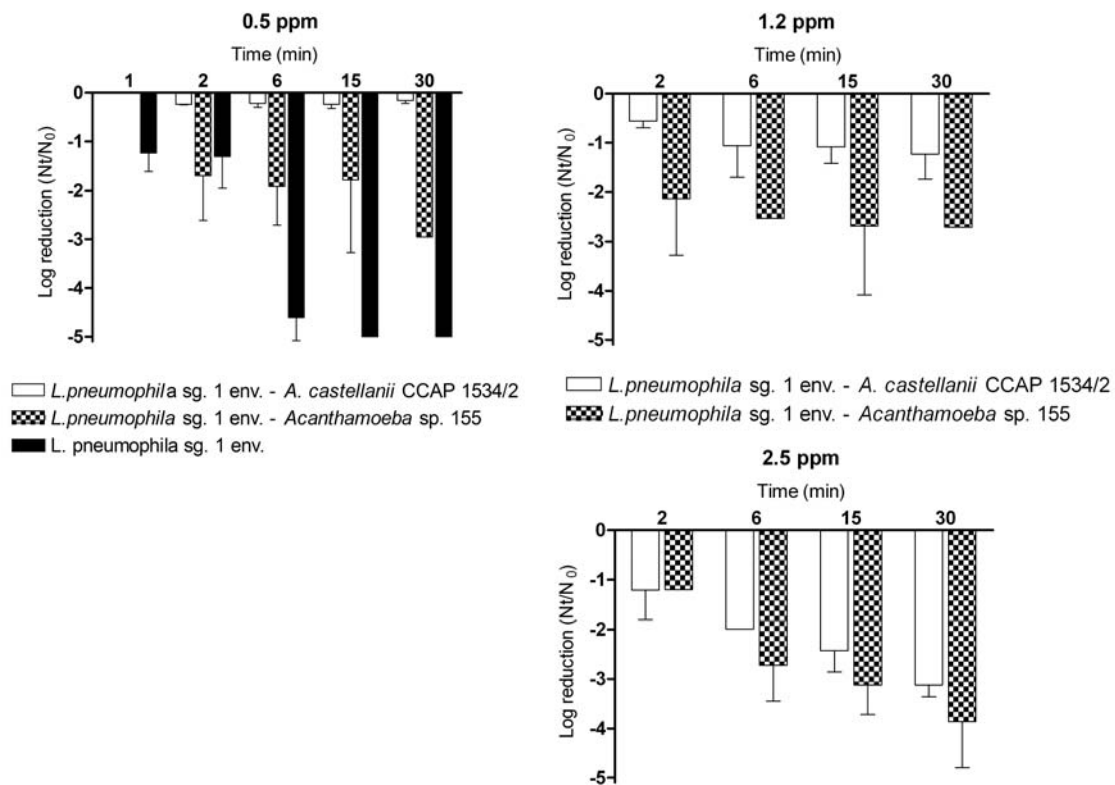


Figure 2.6. Free chlorine effect on the viability of *L. pneumophila* sg. 1 environmental associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 at 0.5 ppm, 1.2 ppm and 2.5 ppm. Bacterial inactivation was determined using viable counts on BCYE medium. Data are presented as means \pm SD (columns and error bars). Time is represented in minutes.

2.1.5.2 Inactivation kinetics for *L. pneumophila* sg. 1 in association with *Acanthamoeba* spp.

Inactivation kinetics for *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 fitted a one phase exponential decay (monophasic) model (Figure 2.7). At 0.5 ppm *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 did not achieve a 1 log reduction so inactivation kinetics parameters could not be estimated. In the case of *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 the estimated time required to reach a 1 log reduction was 0.90 min compared to 1.29, however, C(t) values calculated did not differ that much, being 0.11 and 0.12 ppm x min respectively (Table 2.3).

At 1.2 ppm, the estimated time required for *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 to reduce 1 log was 5.59 min whereas for *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba*

sp. 155 it was 0.58 min, from there calculated $C(t)$ values were 1.05 and 0.51 ppm x min respectively.

Finally, at 2.5 ppm *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 behave in a similar way. The first one required 1.99 min to achieve 1 log reduction with a $C(t)$ value of 2.04 ppm x min, whereas *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 required 1.56 min with a $C(t)$ value of 3.28. In the case of the latter association, the model showed an estimated 3 log reduction to be achieved in 8.52 min with a $C(t)$ value of 15.78 ppm x min.

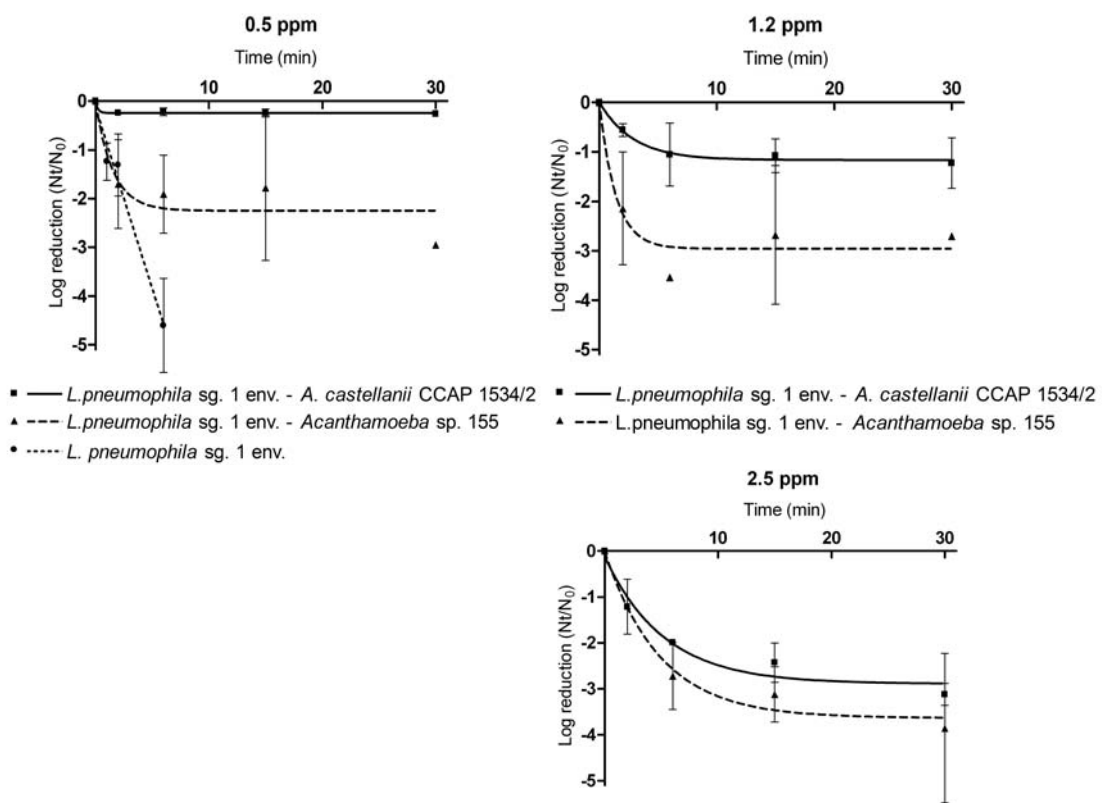


Figure 2.7. Free chlorine effect on the viability of *L. pneumophila* sg. 1 environmental associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155, at 0.5 ppm 1.2 ppm and 2.5 ppm. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics for the *Legionella* strains fitted to a monophasic exponential decay model and the estimated parameters of the model are represented in lines.

Table 2.3. Calculated parameters for the chlorine inactivation curves of *L. pneumophila* sg. 1 environmental associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155. Inactivation kinetics for the tested strains fitted to a one phase exponential model (monophasic). R^2 values showed the robustness of the model. $C(t)$ values are represented as (ppm x min).

Chlorine	<i>Legionella</i> strains	Model	R^2	Required time (min)		$C(t)_{90}$	$C(t)_{99,99}$
				1-log	4-log		
0.5 ppm	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 – <i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Monophasic	0.983	NA	NA	NA	NA
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 – <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Monophasic	0.822	0.90	NA	0.11	NA
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	Monophasic	0.964	1.29	5.19	0.12	0.48
1.2 ppm	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 – <i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Monophasic	0.988	5.59	NA	1.05	NA
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 – <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Monophasic	0.924	0.58	NA	0.51	NA
2.5 ppm	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 – <i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Monophasic	0.964	1.99	NA	2.04	NA
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 – <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Monophasic	0.980	1.56	NA	3.28	NA

2.1.5.3 Effect on *Acanthamoeba* sp.

The effect of free chlorine on the trophozoites of two *Acanthamoeba* strains associated with *L. pneumophila* sg. 1 was evaluated. Overall, results showed that the effectiveness of the chlorine treatments applied was higher on *Acanthamoeba* trophozoites associated with *L. pneumophila* than on *Acanthamoeba* trophozoites alone (Figure 2.8).

At 0.5 ppm significant differences were found between the trophozoites of both *L. pneumophila*-*Acanthamoeba* associations at shorter exposure times, however both strains were similarly reduced at the end of the treatment. After 30 min of exposure *A. castellanii* CCAP 1534/2 was 1.6 logs reduced whereas *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites were reduced 1.25 logs. At 1.2 ppm, no significant differences were found in the inactivation of both *Acanthamoeba* trophozoites associated to *L. pneumophila* except at 30 min of exposure time. At

that time the association of *L. pneumophila* with *A. castellanii* CCAP 1534/2 was reduced 2.11 logs, whereas the association between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* sp. 155 was reduced 3.61 logs.

At 2.5 ppm, no significant differences were found when comparing the inactivation of *Acanthamoeba* trophozoites associated to *L. pneumophila*. At the end of the experiment (30 min), the association of *L. pneumophila* with *A. castellanii* CCAP 1534/2 was reduced 2.96 logs and the association between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* sp. 155 was reduced 3.61.

In order to elucidate if the association with *L. pneumophila* modify trophozoites susceptibility to free chlorine, the results obtained from the trophozoites of *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 exposed alone to sodium hypochlorite were also included. At 1.2 ppm, significant differences were found between associated and non-associated trophozoites of *A. castellanii* CCAP 1534/2 for exposure times higher than 2 min, being the associated trophozoites more sensitive with the exception of the last time stage where the inactivation was higher in non-associated *Acanthamoeba* trophozoites. In the case of the *Acanthamoeba* sp. 155 associations, data obtained showed a higher inactivation for associated trophozoites compared to the non-associated ones. Differences between them were especially higher, 2.86 logs, after 30 min of exposure.

At 2.5 ppm, no significant differences were found between trophozoites of *A. castellanii* CCAP 1534/2 associated to *L. pneumophila* for most of the time stages analysed and, after 30 min of exposure both *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites were nearly reduced 3 logs. However, in the case of the *Acanthamoeba* sp. 155 association significant differences were found when compared with the non-associated trophozoites. While trophozoites of *Acanthamoeba* sp. 155 associated to *L. pneumophila* were 3.61 logs reduced after 30 min of exposure, the non-infected trophozoites were only 1 log reduced.

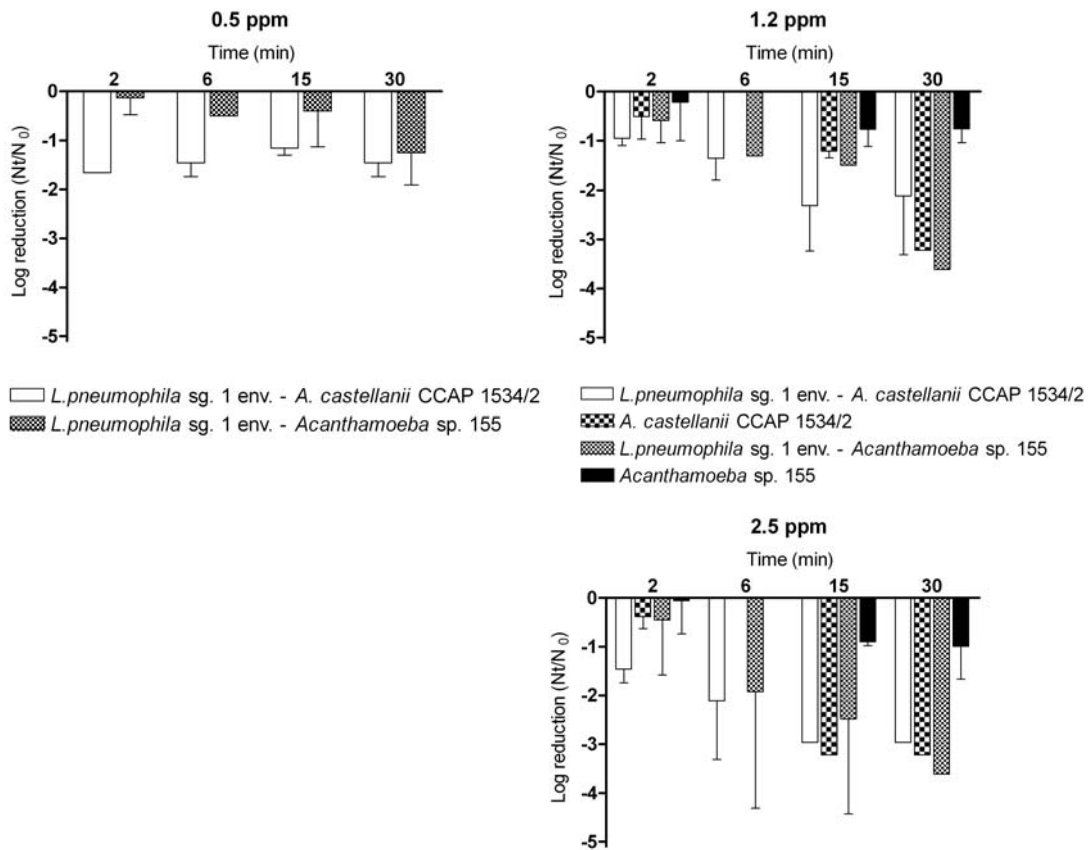


Figure 2.8. Free chlorine effect on the viability of *L. pneumophila* sg. 1 environmental associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155, at 0.5 ppm, 1 ppm and 2 ppm. Inactivation was determined using an adaptation of the MPN method. Data are presented as means \pm SD (columns and error bars).

2.1.5.4 Inactivation kinetics for *Acanthamoeba* sp.

Inactivation kinetics for *Acanthamoeba* strains associated to *L. pneumophila* sg. 1 fitted an exponential monophasic decay model for all the free chlorine concentrations applied, as happened for the non-associated *Acanthamoeba* trophozoites (Figure 2.9.).

At 0.5 ppm, the estimated time required to achieve a 1 log reduction of *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 was 0.68 min whereas for *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 was 30 min.

At a higher free chlorine concentration such as 1.2 ppm, the estimated time required for *A. castellanii* CCAP 1534/2 associated to *L. pneumophila* to achieve 1 log reduction was 2.85 min. whereas the non-associated trophozoites required 7.33 min. Otherwise, *Acanthamoeba* sp. 155

associated trophozoites required 6.82 min to be 1 log reduced, while the non-associated trophozoites did not achieve this reduction at any of the time stages tested.

At 2.5 ppm, 1 log reductions were achieved by the associated and non-associated *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites after 1.49 and 2.86 min of free chlorine exposure respectively. Greater differences were found in the case of *Acanthamoeba* sp. 155 associated and non-associated trophozoites, whereas achieving a 1 log reduction the associated *Acanthamoeba* sp. 155 required 3.44 min, the non-associated *Acanthamoeba* sp. 155 required 23.99 min.

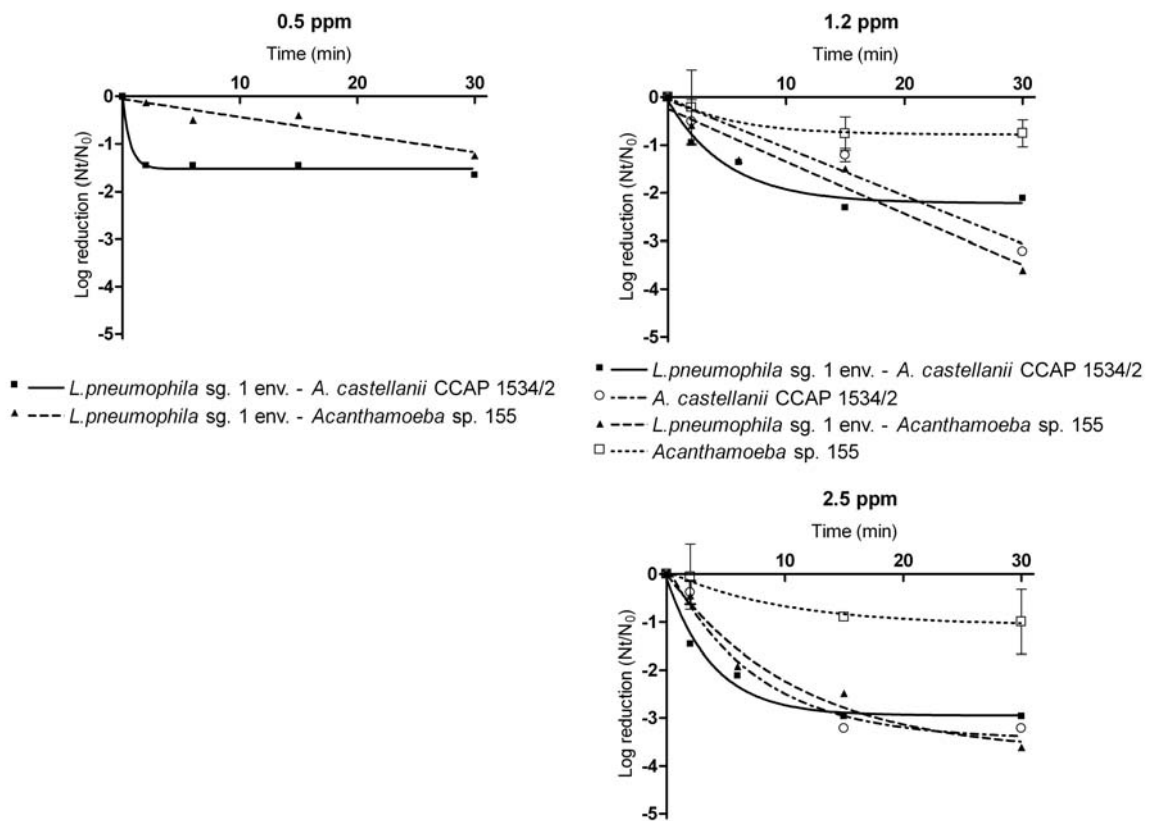


Figure 2.9. Free chlorine effect on the viability of *L. pneumophila* sg. 1 environmental associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155, at 0.5 ppm, 1.2 ppm and 2.5 ppm. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics for *Acanthamoeba* trophozoites strains fitted to a monophasic exponential decay model and the estimated parameters of the model are represented in lines.

2.2 DISCUSSION

In this chapter, the effect of chlorine, one of the widely used disinfection treatments on drinking water, was studied on two strains of *L. pneumophila* sg. 1, two strains of *Acanthamoeba* spp. and the association between one of the *L. pneumophila* strains with suspensions of the two *Acanthamoeba* strains.

The chlorine effect was evaluated by using several concentrations of sodium hypochlorite. Advantages of using sodium hypochlorite are that it is a less hazardous and easier to handle solution compared to elemental chlorine and requires fewer training requirements and regulations.

First, two *L. pneumophila* sg. 1 strains were exposed to two chlorine concentrations 0.2 ppm and 0.5 ppm. Chlorine concentrations were chosen according to the WHO drinking water quality guidelines, that recommend that the minimum target chlorine concentration at the point of delivery should be 0.2 ppm in normal circumstances and 0.5 ppm in high-risk circumstances (BOE 2003b. WHO 2008). This chlorine concentration is mostly used as a secondary disinfectant for the maintenance of water quality on the distribution system.

Results showed that, while the effectiveness of the treatments applied for *L. pneumophila* sg. 1 strains at 0.2 ppm was very low, not achieving a 1 log reduction at the end of the experiment (24 min), the effectiveness of the treatment significantly increased at the highest concentration 0.5 ppm. Inactivation pattern of both *L. pneumophila* sg. 1 strains fitted a monophasic model. However, significant differences were found when comparing their inactivation patterns, whereas *L. pneumophila* sg. 1 environmental strain achieved a 4 log reduction after 5.19 min of exposure, *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 achieved the same reduction after 8.11 min.

Results obtained in the current study agreed with those reported by several authors who reported that *Legionella* was more resistant to chlorine exposure than other bacteria such as coliforms Kuchta *et al.* (1993) or the general bacteria C(t) values estimated by the WHO which are 0.08 ppm x min at 1-2°C, pH 7 (WHO 08). So, following the WHO recommendations on the maintenance of a residual chlorine concentration of 0.2 ppm on the distribution systems, and considering the results obtained in the current study, without any other disinfection procedure *Legionella* will persist on the system.

Our results also agreed with the study of Kuchta *et al.* (1993) who reported that, a suspension of *L. pneumophila* sg. 1 was reduced 2 logs after and exposure to 0.5 ppm for less than 5 min. As it

happened in their study as well as in ours, significant differences on the inactivation pattern between *L. pneumophila* strains were found. They attribute these differences to the strains characteristics themselves instead of the serogroup division. That phenomenon was also observed in the current study where significant differences were found when comparing inactivation patterns of two *L. pneumophila* strains of the same serogroup.

Results reported in the current study were performed under *in vitro* conditions which mean that no environmental factors could interfere with chlorine action on *Legionella* cells. However, under environmental conditions, the disinfectant effect of chlorine on bacteria can be altered. As an example, Fisher *et al.* (2012) suggested the latter point due to the fact that chlorine is lost by reaction with substances left in the water after treatment, particularly organic matter and inorganic substances such as iron, manganese or ammonia. They also suggested that it's usual to partition chlorine decay in pipes into two parts: the "bulk decay" that results from reaction of chlorine with substances in the bulk water, and the "wall decay", which is due to the reaction of chlorine with pipe walls, and the biofilm and corrosion products that adhere to them (Fisher *et al.* 2012).

But apart from the structure of the distribution systems, there are other biological factors that alter chlorine effect on cells. *Legionella* is an aquatic microorganism which has been often related with biofilms which protect cells from disinfectants, requiring a much higher concentration of disinfectants to be effective. In a review realized by Kim *et al.* (2002), some studies about chlorine and *Legionella* within biofilms were summarized. Green (1993) showed that 1 ppm of free chlorine killed planktonic *Legionella bozemanii* cells whereas up to four times this concentration was needed to penetrate the biofilm and kill sessile *Legionella* bacteria in 24 h. This was observed by Wright *et al.* (1991) who reported that it took about four times longer to control sessile *L. pneumophila* populations than planktonic populations under the same disinfection conditions. Yabuchi *et al.* (1995) were able to inactivate planktonic *Legionella* within 15 min at 0.4 ppm of free chlorine. However, >3 ppm of free chlorine was needed to inactivate and suppress the bacteria associated in biofilms (Kim *et al.* 2002).

In a study realized by Muraca *et al.* (1987) on a pilot scale system, *L. pneumophila* population was reduced 5 to 6 logs within 6 h of continuous disinfection conducted with a chlorine concentration ranging between 4 to 6 ppm. This is much higher than the typical chlorine concentration (usually around 1 ppm or less) found in domestic potable water. However, in another study realized on a pilot scale, Loret *et al.* (2005) reported that sessile *Legionella* population remained stable for 3 months at 2 ppm, the maximum dose according to French regulations for *Legionella* control in domestic water systems.

So, in some of these cases, chlorine only decreases *Legionella* concentration rather than eliminating it. Because of that, chlorination failure can result in rapid emergence of dangerously high levels of the opportunistic bacteria within days of chlorine removal (Cooper *et al.* 2010). Another theoretical reason why *Legionella* may recolonize after chlorine levels decrease is the presence of protozoan hosts that act as a shield for the pathogenic bacteria against disinfectants (Abu Kwaik *et al.* 1998, Lin *et al.* 1998, Donlan *et al.* 2005).

Because of that in the current study the effect of free chlorine was evaluated on trophozoites and cysts of two *Acanthamoeba* strains at two different concentrations 1.2 ppm and 2.5 ppm. Chlorine concentrations were chosen according to pre-tests in which lower concentrations were tested without any significant decrease on FLA numbers. Results showed significant differences between inactivation patterns of trophozoites and cysts, being the first ones more sensitive. A chlorine exposure of 1.2 ppm reduced 3 logs *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites after 30 min, however, the effectiveness of the treatments was very low compared to *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites and the cysts of both *Acanthamoeba* strains which were reduced less than 1 log after a 60 min exposure. At 2.5 ppm, *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites were again the most sensitive, achieving a 3 log reduction in 15 min, however, the effectiveness of the treatment increased for *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites which achieved a 2.5 log reduction after 60 min of exposure. As happened with the lower concentration, none of the *Acanthamoeba* cysts suspensions achieved a reduction higher than 1 log at 2.5 ppm.

Even though the effectiveness of the treatments applied was very different for *Acanthamoeba* trophozoites and cysts, both inactivation kinetics fitted a monophasic exponential decay model, high R^2 values supported it. From the estimated models, $C(t)$ values for trophozoites inactivation were calculated. At 1.2 ppm, *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites had a $C(t)_{99,9}$ value of 22 ppm x min. whereas the same strain exposed at 2.5 ppm of sodium hypochlorite had a $C(t)_{99,9}$ value of 30.46 ppm x min. In the case of *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites had a $C(t)_{99,9}$ value of 109.03 ppm x min at 2.5 ppm.

Studies on the effectiveness of chlorine exposition have been performed in recent years; however most of them were focused on waterborne pathogen protozoa as *Giardia* or *Cryptosporidium*. As mentioned before, even though chlorination was effective against *Giardia* with a $C(t)_{90}$ value of 41 ppm x min, resulted not effective on reducing *Cryptosporidium* (WHO 2008).

Concerning the effectiveness of chlorination on FLA some studies are found in the literature. Siddiqui *et al.* (2008) reported that the viability of neither *B. mandrillaris* trophozoites nor cysts

were affected by 0.05, 0.5, 1, 1.25, 2.5, 5, 10 and 25 ppm of chlorine at room temperature for 1 h. Another amphizoic amoeba as *Naegleria* achieved a 4 log reduction when cysts were treated at a chlorine concentration of 2.5 ppm for approximately 20 min (Chang 1978). So, according to the literature, the effectiveness of chlorine exposure on the *Acanthamoeba* strains used in the current study resulted higher in comparison to the chlorine effectiveness on the *Giardia* (WHO 2008), *Balamuthia* (Siddiqui *et al.* 2008) or *Naegleria* (Chang 1978) studies.

In the case of *Acanthamoeba*, Mogoia *et al.* (2010) and Mogoia *et al.* (2011) published two complete studies about the cellular changes induced by chlorination on *A. castellanii*. The comparison of the Mogoia *et al.* (2010) study and the results obtained in this work showed some disagreement. While they found that the C(t) value for a 3 logs inactivation of *A. castellanii* trophozoites was 1.6 ppm x min, the C(t) values obtained here were much higher. Differences in the experimental procedure applied may explain it, whereas in Mogoia *et al.* (2010) study the chlorine effect was evaluated after a 30 s exposure, in our study the exposure time was 60 min. An interesting data that Mogoia *et al.* (2010) reported in their study was that chlorine was more efficient at inhibiting cultivability than at permeabilizing the cells. For example, at 5 ppm of chlorine there was a 3 log reduction in cell cultivability while only 1 log was permeabilized. This finding suggests that some non-cultivable cells would still be viable, as they were not permeabilized. This study was further completed with pictures of *A. castellanii* trophozoites by using scanning electron microscopy and transmission electron microscopy (SEM and TEM respectively). While pictures captured using SEM show that the treatments induced a retraction of the acanthopods, in the pictures captured by TEM it appears that chlorine may have had a slight effect on cell structure, but most of the cells lost electron-dense material and became clear (Mogoia *et al.* 2011).

Dupuy *et al.* (2011) reported that a chlorine treatment between 2 and 3 mg Cl₂/L (to provide approximately 1 mg Cl₂/L residual after 1 h) was efficient to inactivate, at least 3 logs, all the *Acanthamoeba* strains they tested. However, they showed that the efficiency of the chlorination treatments applied depend on the target strain. These results are similar to the ones obtained in the current study, both in the inactivation of *Acanthamoeba* trophozoites and in the differences between strains.

About the effectiveness of chlorine exposure on *Acanthamoeba* cysts, Storey *et al.* (2004) reported that cysts of two *Acanthamoeba* strains remained viable after a treatment by free and combined chlorine at 100 ppm over an exposure time of 10 min, being one of the most resistant *Acanthamoeba* strains found in the literature. So, considering that point and the data reported here, we agreed with Coulon *et al.* (2010), who considered chlorine to be ineffective against

Acanthamoeba cysts, notably at low residual concentrations (2 to 5 ppm) used to control microbial flora in drinking water networks.

But apart from the *in vitro* studies about the effect of chlorine on FLA, some data has been reported about the disinfection of these microorganisms on pilot scale systems. Loret *et al.* (2005) reported that after an exposure to 2 ppm for 3 months a natural planktonic amoebae population remained stable at a concentration of 10^4 cysts. So, in their case, amoebae population was more resistant to chlorine exposure than the *in vitro* studies reported in this work. As explained in the case of *Legionella* inactivation, differences on the studies can be attributable to environmental factors.

Finally, the effectiveness of chlorination treatments was evaluated on the association between *L. pneumophila* sg. 1 environmental strain and both trophozoites of *A. castellanii* CCAP 1534/2 and trophozoites of *Acanthamoeba* sp. 155. Results showed that the association with both *Acanthamoeba* strains significantly reduced the effectiveness of the chlorine treatments applied on *L. pneumophila* sg. 1 strain. While *L. pneumophila* achieved a 4 log reduction after being exposed to 0.5 ppm of free chlorine for 5.19 min, in association with *Acanthamoeba* strains, the same *L. pneumophila* strain did not even achieved a 3 log reduction after 30 min of exposure.

At higher chlorine concentrations, it was necessary to expose the association between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* sp. 155 to 2.5 ppm for 8.52 min to obtain a 3 log reduction of the bacteria, however. *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 did not achieve that in any of the treatments applied. Thus, the association between *L. pneumophila* and *A. castellanii* CCAP 1534/2 was the most resistant of the associations used.

Kinetics for *L. pneumophila* inactivation associated to the two *Acanthamoeba* strains fitted a monophasic model. $C(t)_{90}$ of *L. pneumophila* sg. 1 associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 at 1.2 ppm and at 2.5 ppm was 1.05 and 2.04 respectively. In the case of *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155 $C(t)_{90}$ at 1.2 ppm and at 2.5 ppm was 0.51 and 3.28 respectively. Kinetics for *Acanthamoeba* strains inactivation fitted a monophasic model.

The inactivation pattern of associated *Acanthamoeba* trophozoites was also analyzed. Results showed that the association with *L. pneumophila* modifies the effectiveness of chlorine exposure on *Acanthamoeba* trophozoites, especially in the case of *Acanthamoeba* sp. 155 which became more sensitive to a free chlorine concentration of 1.2 ppm in comparison to the trophozoites of the non-associated strain. At 2.5 ppm differences between associated and non-associated trophozoites were very similar than those that appeared at 1.2 ppm for the same *Acanthamoeba* strain.

Furthermore, *L. pneumophila* sg. 1 associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 was the most resistant *L. pneumophila* to the chlorine treatments applied, and that fact coincides with the results from the inactivation pattern of associated trophozoites analysis in which the *A. castellanii* CCAP 1534/2 was the most resistant among associated amoeba used.

Results obtained agreed with previous studies such as the one published by Dupuy *et al.* (2011) which reported that chlorine and chlorine dioxide were more efficient on free *L. pneumophila* than co-cultured *L. pneumophila*, and the study by García *et al.* (2007), which reported a higher resistance to chlorine of *L. pneumophila* when it was within *A. polyphaga*. However, some disagreements were also found with these studies, whereas García *et al.* (2007) reported a reciprocal protection of *L. pneumophila* and *A. polyphaga* against chlorine exposure (that fact is not that clear in the current study). Dupuy *et al.* (2013) reported that the effectiveness of chlorine treatments were the same for infected and non-infected trophozoites.

In the current study we observed that in the case of infection the effectiveness of chlorine against *Acanthamoeba* trophozoites was higher, as Storey *et al.* (2004) reported in their study. Apart from that, in the study by Storey *et al.* (2004) different associations of *L. pneumophila* with several *Acanthamoeba* strains were exposed to chlorine; no significant differences between the inactivation patterns of these associations were reported. However, in the current study these differences were observed for chlorine exposures at 0.5 and 1.2 ppm.

So, as many authors suggests, in the current work the protective role of the association of *L. pneumophila* with *Acanthamoeba* trophozoites was demonstrated. *Acanthamoeba* is a natural inhabitant of drinking water systems since water treatments applied for them resulted ineffective and once in the distribution network, low disinfectant levels as 0.5, 1.2 and 2.5 ppm have only limited activity on them (Thomas *et al.* 2004), as reported here. So, chlorine concentrations commonly applied to prevent the presence of *L. pneumophila* in drinking water systems are not an effective enough way of removing amoeba, and consequently intracellular *Legionella*.

CHAPTER 3

CHAPTER 3: RESULTS AND DISCUSSION THERMAL TREATMENTS

3.1 RESULTS

To realize thermal treatments under controlled conditions at the laboratory, the first need was to find the appropriate heat system. Several options were assessed considering that when there is heat transfer between a fluid and a solid, there exists a boundary layer of fluid at the interface that acts as a resistance to the transfer of heat from the fluid to the solid (Davey 1990).

The chosen option was to use dialysis bags, previously used in another study of the group (Rodríguez *et al.* 2012), which produced the minimum effect of delayed time for heat transfer. Once pre-treated as explained above, the dialysis bags were placed to a laboratory Water bath. (Wasserbad Water Bath 1002-1013. GFL) and exposed to the chosen temperatures.

3.1.1 Thermal inactivation of *Legionella* spp. strains

A thermal treatment at five different temperatures, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C and 70°C, was applied to five *Legionella* spp. strains: *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152. *L. pneumophila* sg. 7 ATCC 33823 and *L. longbeachae* ATCC 33462; and two environmental strains: *L. pneumophila* sg. 1 and *L. pneumophila* sg. 8.

The strains were chosen according to the origin of the strain (culture collection strain or environmental isolate), the specie (*L. pneumophila* an non *pneumophila*) and the serogroup (1 compared to 2-14), in order to observe possible differences on their behaviour in front different temperatures.

Results showed significant differences between the inactivation patterns of the five strains, especially *L. longbeachae* ATCC 33462 which showed a very different pattern compared to the rest of the *L. pneumophila* strains being significantly the most sensitive to all the thermal treatments applied. Among the rest of strains used, significant differences were found between them, although the behaviour of each strain varied depending of the thermal treatment applied (Figure 3.1).

At 50°C three differenced trends were observed, first *L. longbeachae* ATCC 33462 was the most sensitive strain achieving a 5 log inactivation after 20 min at this temperature. The second trend grouped *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 and *L. pneumophila* sg. 8 which were significantly the most resistant strains at 50°C. The third group *L. pneumophila* sg. 1

environmental and *L. pneumophila* sg. 7 ATCC 33823 showed a similar behaviour at 50°C being significantly more sensitive to this temperature than the strains mentioned before.

At 55°C, *L. longbeachae* ATCC 33462 achieved the 5 log inactivation at the first time point of the graphic. 5 min. At this temperature, two trends were observed for the rest of strains analyzed which coincide with the serogroup division. *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 and *L. pneumophila* sg. 1 environmental resulted significantly more sensitive to thermal treatment than the non serogroup 1 strains. Differences between strains were higher at lower exposure times, 5 min.

At 60°C, significant differences between strains were just found at the lowest exposure time, 1 min. At that time, a similar behaviour as 50°C was observed. *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 and *L. pneumophila* sg. 8 were significantly the most resistant strains compared to *L. pneumophila* sg.1 environmental and *L. pneumophila* sg. 7 ATCC 33823.

A very similar behaviour was also observed at 65°C with one exception. Although *L. pneumophila* sg. 1 environmental was more sensitive to other strains at the lowest exposure time; hold better the thermal exposure at 1 min. At 70°C, *L. pneumophila* sg.1 ATCC 33152 was the most resistant strain at the lowest exposure time but reached the 5 log inactivation at the same time than the rest of strains analyzed. On the other hand, *L. pneumophila* sg.1 environmental strain was the most sensitive at that temperature.

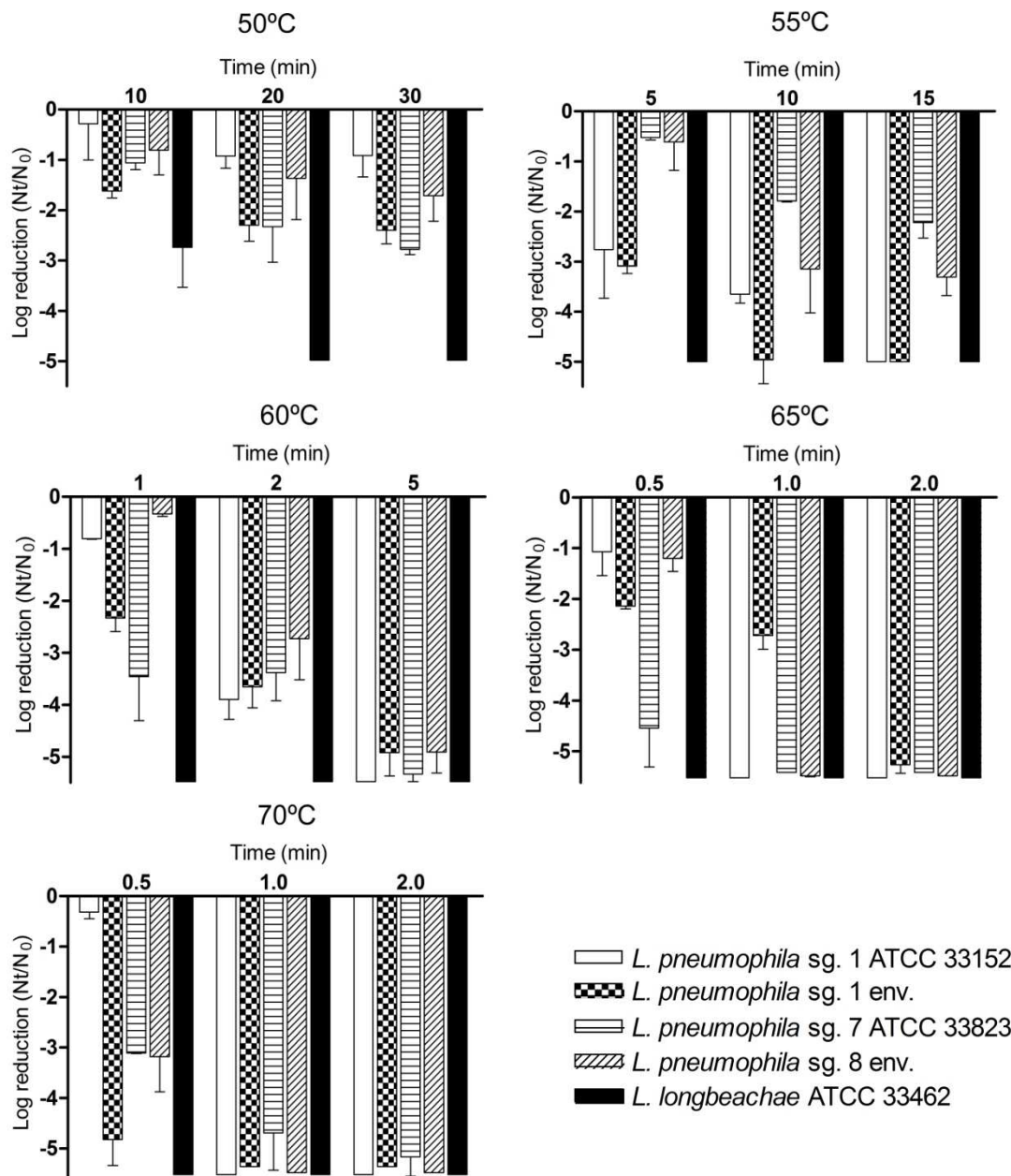


Figure 3.1. Effect of thermal treatments at 50°C, 55°C, 60°C, 65°C and 70°C on the inactivation of five *Legionella* strains. Bacterial inactivation was determined using viable counts on BCYE medium. Data are presented as means \pm SD (columns and error bars). Time is presented in minutes.

3.1.2 Inactivation kinetics of *Legionella* spp. strains in front thermal treatments

The inactivation kinetics of the five *Legionella* strains fit to a first-order polynomial model (straight line), Figure 3.2. Equations of the line adjusted to the formula described in the text and

were represented as Y (surviving fraction) = Intercept (shoulder broadness) + Slope $\cdot x$. High R^2 values supported the chosen model (Table 3.1).

For each strain and temperature tested, inactivation kinetics was calculated and T_{90} and $T_{99.99}$ value were estimated. T_{90} is defined as the time required for inactivating the 90% or 1 log of the population present in the original suspension, and the $T_{99.99}$ which represents the inactivation of the 99.99% or 4 logs of the original suspension.

At 50°C estimated parameters showed that the most resistant strain at that temperature was *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 which needed 116.169 min whereas the time required for the rest of strains to achieve a 4 log inactivation ranged between 40.57-68.21 min. *L. longbeachae* ATCC 33462 was the most sensitive strain in all the treatments applied, at 50°C achieved a 4 log reduction in 30.68 min.

As mentioned before. at 55°C inactivation patterns of *Legionella* strains showed similarities within serogroups. Serogroup 1 strains were more sensitive to temperature than the other serogroup strains. Whereas *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 and *L. pneumophila* sg. 1 env. needed around 10 min to achieve a 4 log reduction. *L. pneumophila* sg. 8 and *L. pneumophila* sg. 7 ATCC 33823 needed between 16 and 25 min to obtain the same result.

At higher temperatures, 60°C, 65°C and 70°C, when comparing estimated inactivation parameters of the five *Legionella* strains, differences between them were higher for the 1 log reduction value compared to the 4 log reduction. As an example, it took around 3 min to achieve a 4 log reduction after a thermal exposure at 60°C for all *Legionella* strains, however to achieve 1 log reduction the time ranged between 0.06 and 1 min.

Overall, results showed that the effectiveness of thermal treatments were higher against *L. longbeachae* ATCC 33462 which resulted significantly the most sensitive strain. On the other hand, the effectiveness of the thermal treatments was lower against *L. pneumophila* sg.1 ATCC 33152 which resulted the most resistant strain.

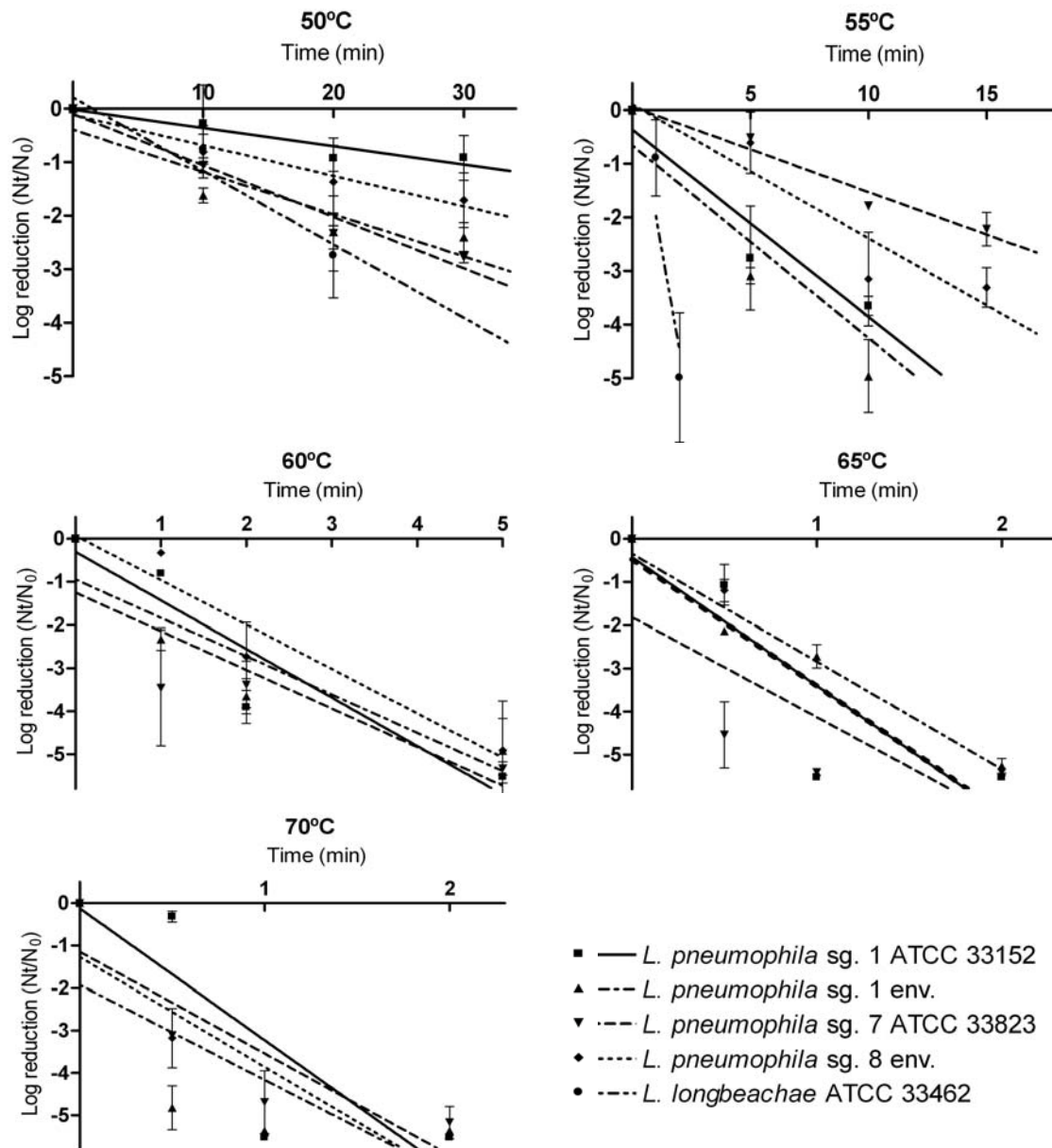


Figure 3.2. Effect of thermal treatments on the inactivation of the 5 *Legionella* strains. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics of *Legionella* strains fitted to a first order polynomial model and the estimated parameters of the model are represented in lines.

Table 3.1. Calculated parameters for the thermal inactivation of five *Legionella* strains and the time (min) for 1-log and 4-log reduction, T_{90} and $T_{99.99}$. Equations of the line adjusted to the formula described in the text and were represented as Y (surviving fraction) = Intercept (shoulder broadness) + Slope*x. R^2 values showed the robustness of the model.

Temp (°C)	<i>Legionella</i> strains	Equation of the line	R^2	Required Time (min)	
				1-log	4-log
50°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	$Y = -0.021 - 0.0341$	0.887	28.71	116.69*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	$Y = -0.398 - 0.0788$	0.842	7.64	45.71*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 7 ATCC 33823	$Y = -0.101 - 0.0961$	0.969	9.35	40.57*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 8 env.	$Y = -0.119 - 0.0569$	0.967	14.48	68.21*
	<i>L. longbeachae</i> ATCC 33462	$Y = 0.2033 - 0.137$	0.938	8.78	30.68
55°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	$Y = -0.365 - 0.349$	0.962	1.82	10.41
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	$Y = -0.66 - 0.359$	0.899	0.95	9.3
	<i>L. pneumophila</i> sg. 7 ATCC 33823	$Y = 0.057 - 0.1586$	0.961	6.66	25.58*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 8 env.	$Y = 0.103 - 0.2494$	0.888	4.42	16.45
	<i>L. longbeachae</i> ATCC 33462	$Y = 0.535 - 2.495$	0.879	0.61	1.82
60°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	$Y = -0.3075 - 1.125$	0.878	0.61	3.28
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	$Y = -0.9493 - 0.8879$	0.833	0.06	3.43
	<i>L. pneumophila</i> sg. 7 ATCC 33823	$Y = -1.253 - 0.895$	0.759	---	3.06
	<i>L. pneumophila</i> sg. 8 env.	$Y = 0.064 - 1.029$	0.938	1.03	3.95
	<i>L. longbeachae</i> ATCC 33462	---	---	---	---
65°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	$Y = -0.428 - 2.971$	0.759	0.19	1.20
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	$Y = -0.348 - 2.494$	0.969	0.26	1.46
	<i>L. pneumophila</i> sg. 7 ATCC 33823	$Y = -1.816 - 2.313$	0.580	---	0.94
	<i>L. pneumophila</i> sg. 8 env.	$Y = -0.48 - 2.926$	0.763	0.177	1.20
	<i>L. longbeachae</i> ATCC 33462	---	---	---	---
70°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	$Y = -0.128 - 3.099$	0.730	0.28	1.24
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	$Y = -1.928 - 2.237$	0.538	---	0.93
	<i>L. pneumophila</i> sg. 7 ATCC 33823	$Y = -1.148 - 2.394$	0.767	---	1.19
	<i>L. pneumophila</i> sg. 8 env.	$Y = -1.272 - 2.586$	0.725	---	1.05
	<i>L. longbeachae</i> ATCC 33462	---	---	---	---

(*) estimated parameter

3.1.3 Effect of thermal treatment on FLA strains

A thermal treatment at three different temperatures, 50°C, 60°C and 70°C, was applied to four FLA strains: *A. castellanii* CCAP 1534/2 strain, *Acanthamoeba* sp 155, *H. vermiformis* CCAP 1534/7A strain and *H. vermiformis* 195. Each experiment was performed based on the amoebal life stage: trophozoite or cyst (Figure 3.3).

Comparison of the inactivation pattern between life stages showed that for all amoeba strains, the thermal treatments were significantly more effective against trophozoites compared to cysts.

3.1.3.1 Effect of thermal treatment on trophozoites

The analysis of trophozoite inactivation of the four FLA strains showed no significant differences between strains when cells were exposed to 50°C. Thermal treatments at 60°C and 70°C for less than 2 min reduced the viability of both *Hartmannella* strains by more than 4 logs. In the case of *Acanthamoeba* strains, the viability of *Acanthamoeba* sp. 155 was reduced by more than 4 logs after being exposed to 60°C for more than 5 min and to 70°C for more than 0.5 min, whereas it was necessary to expose trophozoites of *A. castellanii* CCAP 1534/2 to 60°C for more than 10 min to obtain the same result. Moreover, *A. castellanii* CCAP 1534/2 was the only strain in which trophozoites remained viable after being treated at 70°C for 0.5 min (Figure 3.3).

3.1.3.2 Effect of thermal treatment on cysts

The viability of cysts of all strains was reduced by less than 1 log after 30 min at 50°C, with no significant differences between strains at this temperature. Amoebal cyst inactivation clearly increased when cells were treated at 60°C and 70°C (Figure 3.3). These temperatures significantly affected the two *Hartmannella* strains, the viability of which was reduced by more than 4 logs after being treated for 2 min at 60°C or 0.5 min at 70°C.

In the case of *Acanthamoeba* cysts, although significant differences were found between strains, both *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 were more resistant to thermal treatment than the *Hartmannella* strains. While the viability of *Acanthamoeba* sp. 155 was reduced by 4.5 logs after exposure to 60°C for 20 min, *A. castellanii* CCAP 1534/2 showed just a 2-log reduction under the same conditions. *A. castellanii* CCAP 1534/2 was the only strain in which cysts remained viable after thermal treatment at 70°C for 1 min.

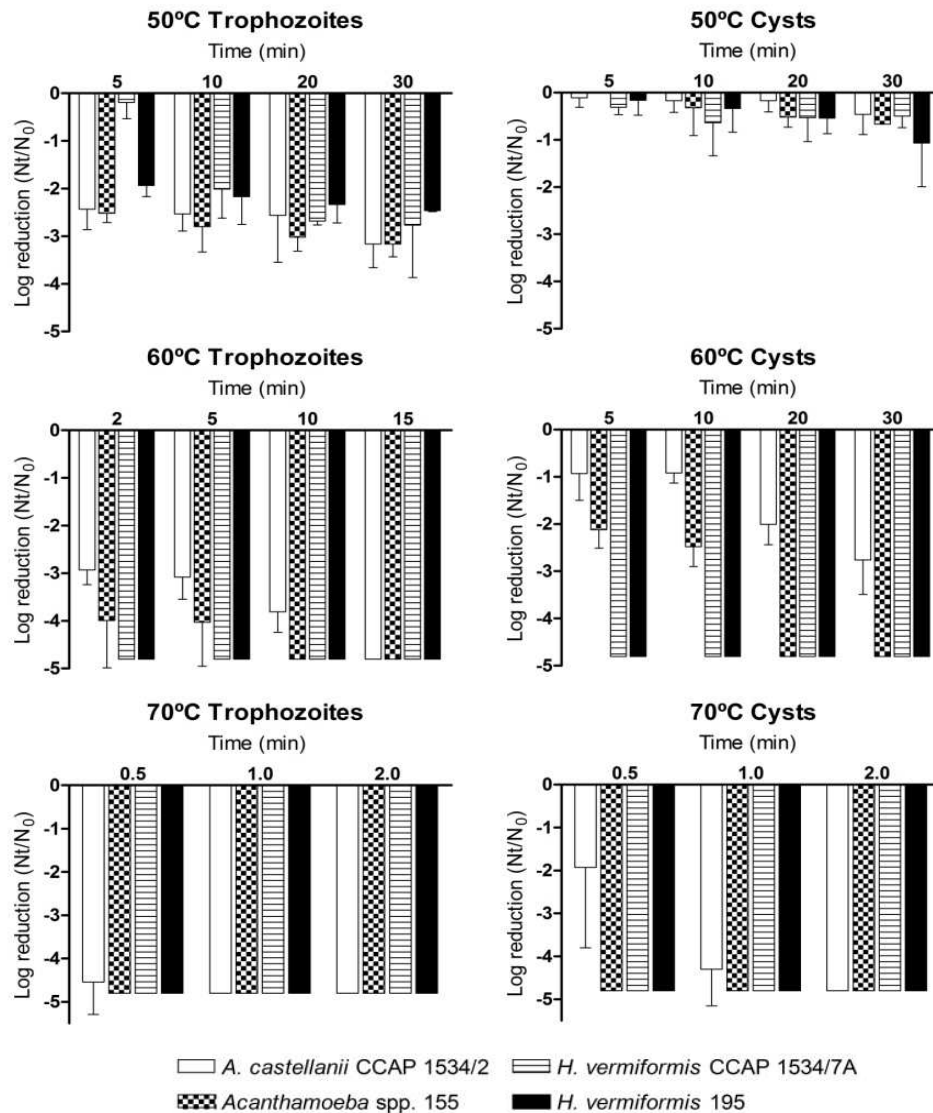


Figure 3.3. Effect of thermal treatments at 50°C, 60°C and 70°C on the viability of trophozoites and cysts of four free-living amoeba strains. *A. castellanii* CCAP 1534/2, *Acanthamoeba* sp. 155, *H. vermiformis* CCAP 1534/7A and *H. vermiformis* 195. Inactivation was determined using an adaptation of the MPN method. Data are presented as logarithmic reduction mean \pm standard deviation (SD). Time is presented in minutes.

3.1.3.3 Inactivation kinetics of trophozoites in front thermal treatments

The inactivation kinetics of trophozoites was calculated at 50°C, 60°C and 70°C. The results showed that trophozoites of all FLA strains fitted to a monophasic exponential decay model when amoeba cells were exposed to 50°C (Figure 3.4). High R^2 values supported the robustness of the model (Table 3.2). The estimated inactivation times required to obtain a 3-log reduction at 50°C could not be obtained due to the model characteristics except for *H. vermiformis* CCAP 1534/7A, which achieved a 3 log reduction after being exposed at 50°C for 12.55 min.

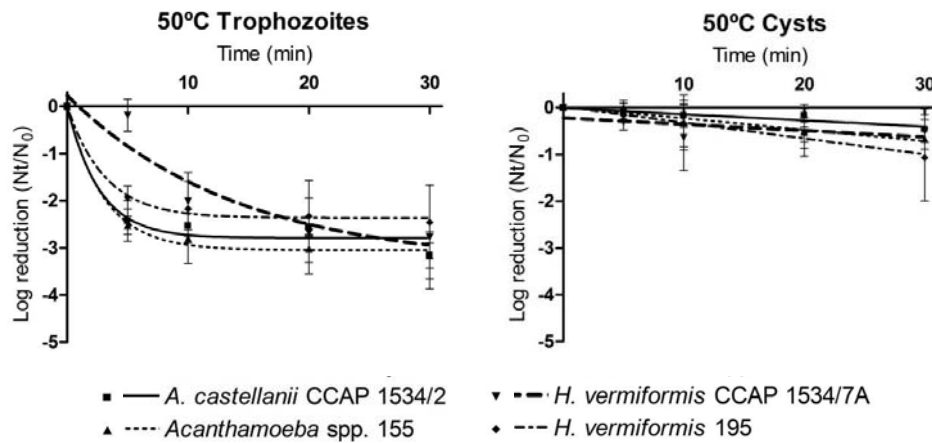


Figure 3.4. Effect of thermal treatments on the inactivation of the 4 FLA strains at 50°C. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics of FLA strains fitted to a monophasic exponential decay in case of trophozoites and to a first order polynomial model in case of cysts. The estimated parameters of the models are represented in lines.

At 60°C, inactivation kinetics was estimated for *Acanthamoeba* strains; because these strains had more than one value above the detection limit (Figure 3.5). As it happened at 50°C, trophozoites of *Acanthamoeba* strains fitted to a monophasic exponential decay model. The estimated inactivation times required to obtain a 3-log reduction at 60°C were 2.9 min in case of *A. castellanii* CCAP 1534/2 and 1.1 min in case of *Acanthamoeba* spp. 155.

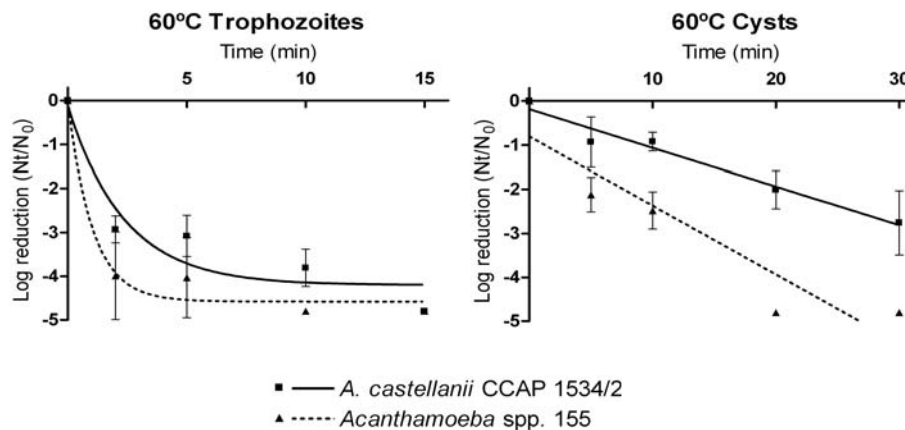


Figure 3.5. Effect of thermal treatments on the inactivation of *Acanthamoeba* strains at 60°C. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics of *Acanthamoeba* strains fitted to a monophasic exponential decay in case of trophozoites and to a first order polynomial model in case of cysts. The estimated parameters of the models are represented in lines.

Table 3.3. Estimated parameters of FLAstrains inactivation kinetics and time needed (min) to achieve a 1-log and 3-log reduction in trophozoites viability after being exposed to thermal treatments at 50°C and 60°C. (NA) not achieved.

Trophozoites	Strain	Best fitting model	R ²	Inactivation time (min)	
				1 log	3 log
50°C	<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Monophasic	0.962	1.17	NA
	<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Monophasic	0.995	1.19	NA
	<i>H. vermiformis</i> CCAP 1534/7A	Monophasic	0.901	5.90	12.55
	<i>H. vermiformis</i> 195	Monophasic	0.995	1.71	NA
60°C	<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Monophasic	0.914	0.57	2.90
	<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Monophasic	0.982	0.25	1.09

3.1.3.4 Inactivation kinetics of cysts in front thermal treatments

Cyst inactivation at 50°C fitted a first order polynomial model (Figure 3.4, Table 3.4). The time required to reduce the viability of the initial amoeba suspensions by 3 logs varied from one strain to another. Thermal treatment was most effective against *H. vermiformis* 195, the viability of which decreased by 3 logs in 89 min; the same loss of viability required exposure for 124 min for *Acanthamoeba* sp. 155, 206 min for *H. vermiformis* CCAP 1534/7A and 227 min for *A. castellanii* CCAP 1534/2. At 60°C, the time required to undergo a 3-log reduction was 14 min for *Acanthamoeba* sp. 155 and 32.1 min for *A. castellanii* CCAP 1534/2.

Table 3.4. Parameters of FLA strain inactivation kinetics and time needed (min) to achieve 1-log and 3-log reduction in viability of cysts after being exposed to thermal treatments at 60°C.

Cysts	Strain	Best fitting model	R ²	Inactivation time (min)	
				1 log	3 log
50°C	<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Polynomial first order	0.864	75.26*	227.49*
	<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Polynomial first order	0.933	41.77*	124.21*
	<i>H. vermiformis</i> CCAP 1534/7A	Polynomial first order	0.425	57.85*	206.38*
	<i>H. vermiformis</i> 195	Polynomial first order	0.970	30.04	89.01*
60°C	<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Polynomial first order	0.971	9.30	32.13*
	<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Polynomial first order	0.872	1.24	14.02

(*) estimated value

3.1.4 Effect of thermal treatment on *L. pneumophila* sg. 1 associated to *Acanthamoeba* strains

3.1.4.1 Effect of thermal treatment on *L. pneumophila* sg. 1

The effect of thermal treatments at 50°C, 55°C, 60°C and 70°C was evaluated on *L. pneumophila* sg. 1 associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155. Overall, no significant differences were found when comparing the inactivation pattern of *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 or associated to *Acanthamoeba* sp. 155 in any of the thermal treatment applied.

Results showed that at 50°C no significant differences were found when comparing the two associated *L. pneumophila* experiments. However, significant differences were found when the comparison was performed with axenic *L. pneumophila*. In that case, the effectiveness of the thermal treatment was significantly much higher. Whereas a *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* trophozoites was reduced less than 1 log after 30 min at 50°C, the same strain in a axenic state was reduced more than 2 logs.

At 55°C, differences between *L. pneumophila* associated experiments and the axenic *L. pneumophila* were the highest. Whereas *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba*

trophozoites were nearly 1.5 logs reduced after 30 min, the same strain in an axenic state was 5 logs reduced.

At 60°C, differences between associated and axenic *L. pneumophila* were dramatically reduced. And at 70°C, no significant differences were found when comparing inactivation pattern of associated and axenic *L. pneumophila* after 0.5 min of exposure, however after 1 min the effectiveness of the thermal treatment at 70°C was higher on associated *L. pneumophila*.

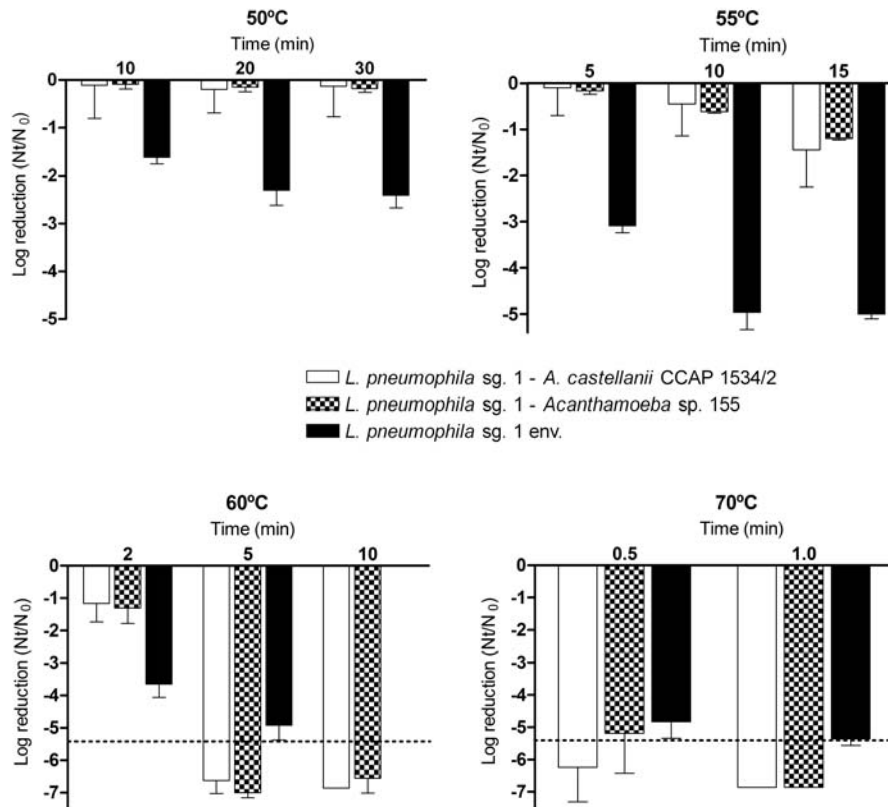


Figure 3.6. Effect of thermal treatments at 50°C, 55°C, 60°C and 70°C on the inactivation of *L. pneumophila* sg. 1 associated to two *Acanthamoeba* strains, *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155. Bacterial inactivation was determined using viable counts on BCYE medium. Data are presented as logarithmic reduction mean \pm standard deviation (SD). Time is presented in minutes. (----- *L. pneumophila* sg. 1 axenic detection limit).

3.1.4.2 Inactivation kinetics of *L. pneumophila* sg. 1

The effect of thermal treatments on *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* strains fitted to a polynomial of first order (straight line) model. R² values showed the robustness of the chosen model for most of the cases (Figure 3.7, Table 3.5).

In order to compare if significant differences between the inactivation patterns were found between associated *L. pneumophila* and axenic *L. pneumophila*, the results obtained for the latter one were also included. As mentioned before, no significant differences were found between the inactivation of *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* sp. 155. However, significant differences were found between associated and axenic *L. pneumophila*, at 50°C and especially at 55°C. These big differences can be observed for differences in the slope steep of the Figure 3.7. At higher temperatures as 60°C and 70°C differences between associated and axenic *L. pneumophila* were dramatically reduced being still the axenic bacteria more sensitive to the thermal temperature. However, at 70°C, patterns were interchanged and the effectiveness of the thermal treatment resulted higher for the associated *L. pneumophila*.

The time required to achieve a 4 log reduction of the axenic *L. pneumophila* sg. 1 at 50°C was 45 min at, 9.3 min at 55°C, 3.43 min at 60°C and 0.93 min at 70°C. In case of both *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* strains these times ranged from 664-825 min at 50°C, 45-50 min at 55°C, 4.5-4.7 at 60°C and 0.44-0.49 at 70°C.

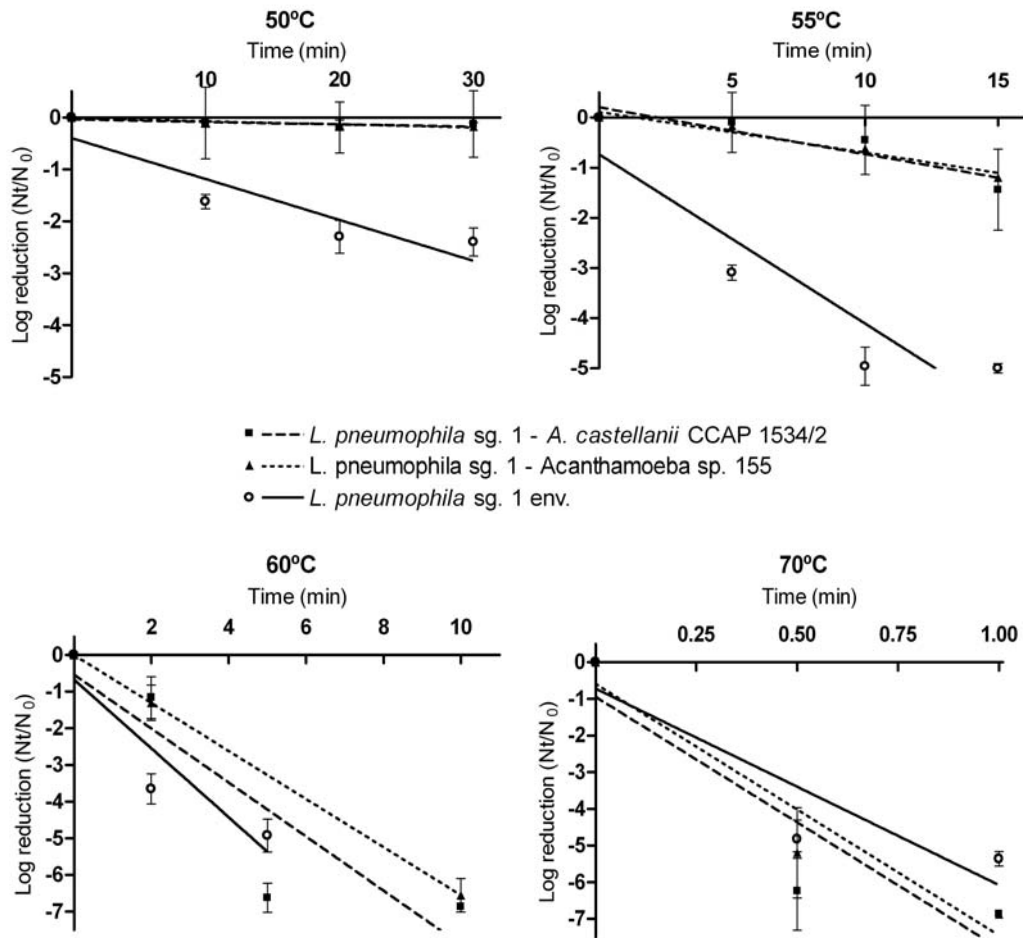


Figure 3.7. Effect of thermal treatments on the inactivation of of *L. pneumophila* sg. 1 associated to two *Acanthamoeba* strains. *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 at 50°C, 55°C, 60°C and 70°C. Data are presented as means \pm SD (points and error bars). Inactivation kinetics of *Acanthamoeba* strains fitted to a first order polynomial model. The estimated parameters of the models are represented in lines.

Table 3.5. Calculated parameters for the thermal inactivation of two *L. pneumophila* strains associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and associated to *Acanthamoeba* sp. 155 and the time (min) for 1-log and 4-log reduction, T_{90} and $T_{99.99}$. Equations of the line adjusted to the formula described in the text and were represented as Y (surviving fraction) = Intercept (shoulder broadness) + Slope*x. R^2 values showed the robustness of the model.

	Strain	Best fitting model	R^2	Inactivation time (min)	
				1 log	4 log
50°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Polynomial first order	0.56	200*	825*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Polynomial first order	0.952	164*	664*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	Polynomial first order	0.842	7.64	45.71*
55°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Polynomial first order	0.841	12.88	45*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Polynomial first order	0.950	13.70	50.74*
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	Polynomial first order	0.899	0.95	9.3
60°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Polynomial first order	0.707	0.63	4.71
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Polynomial first order	0.698	0.29	4.53
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	Polynomial first order	0.833	0.06	3.43
70°C	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Polynomial first order	0.817	0.009	0.44
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1 - <i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Polynomial first order	0.920	0.06	0.49
	<i>L. pneumophila</i> sg. 1	Polynomial first order	0.538	0.05	0.93

(*) estimated parameter

3.1.4.3 Effect on *Acanthamoeba* sp associated to *L. pneumophila* sg. 1

The effect of thermal treatments on trophozoites of *Acanthamoeba* strains association with *L. pneumophila* was evaluated. Differences on the inactivation pattern of both *Acanthamoeba* trophozoites associated to *L. pneumophila* were found, being the associated trophozoites of *Acanthamoeba* sp. 155 more sensitive to the thermal treatments applied compared to the associated *A. castellanii* CCAP 1534/2.

Moreover, the comparison between the inactivation of associated and axenic trophozoites showed that at 50°C and 60°C. *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 in association with *L. pneumophila* were more resistant than the axenic trophozoites. Higher differences between them were found at 60°C, were after 5 min of exposure, axenic trophozoites

were reduced 3 logs more than *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 in association with *L. pneumophila*.

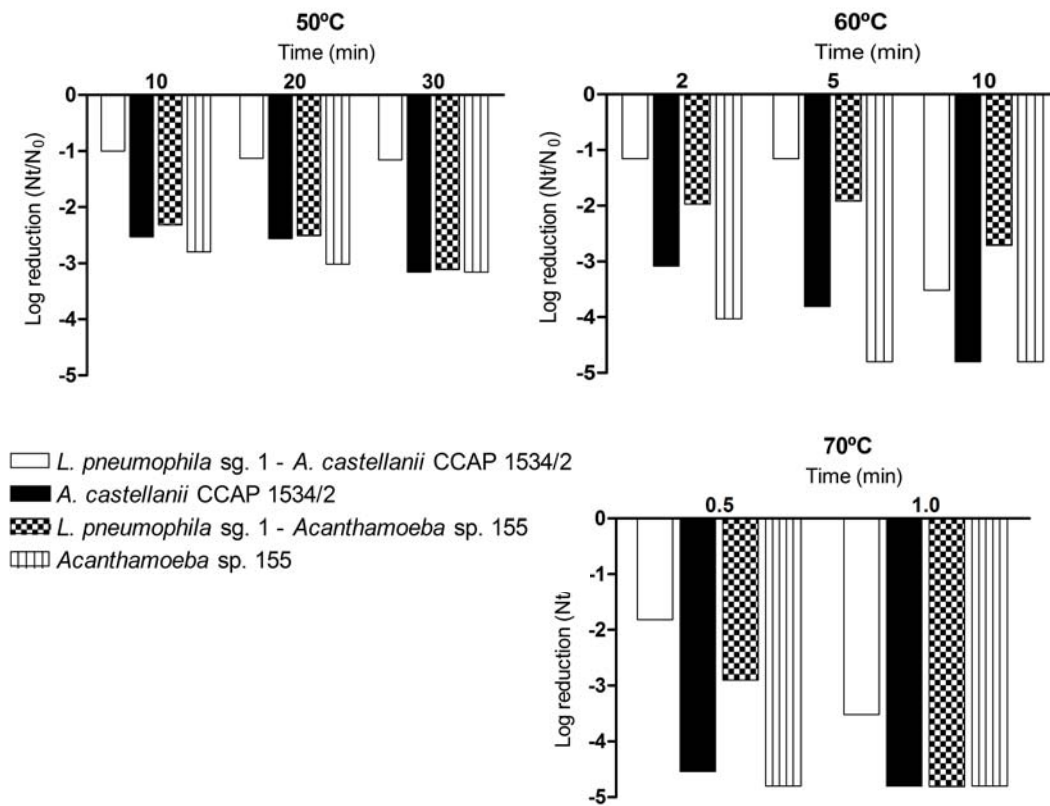


Figure 3.8. Effect of thermal treatments at 50°C, 55°C, 60°C and 70°C on the inactivation of *L. pneumophila* sg. 1 associated to two *Acanthamoeba* strains, *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155. Trophozoite inactivation was determined using an adaptation of the MPN method. Data are presented as logarithmic reduction means. Time is presented in minutes.

3.2 DISCUSSION

This work focused on the effect of thermal treatments on *Legionella* spp., FLA and the association between *L. pneumophila* and two *Acanthamoeba* strains. To that, several thermal treatments were chosen based on the international guidelines and national recommendations for the control and prevention of legionellosis (BOE 2003a, Bartram *et al.* 2007, WHO 2008).

Five *Legionella* spp. strains were exposed at five different temperatures, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C and 70°C. Bacterial inactivation was quantified by culture, the gold standard. Although by using cell culture we are probably underestimating the cells that had adopted a VBNC state due to the thermal stress (Allegra *et al.* 2011), this method led us compare the results obtained with most studies reported worldwide.

Overall, the effectiveness of thermal treatments applied increased as the temperatures and exposition times did, especially for temperatures higher than 50°C. However, significant differences were found when comparing inactivation patterns of the five *Legionella* strains analyzed.

In order to determine if the effectiveness of thermal disinfection varied depending on the *Legionella* specie, *L. longbeachae* ATCC 33462 was included in the study. Results showed that all thermal treatments applied were significantly more effective reducing *L. longbeachae* ATCC 33462 counts compared to the rest of *L. pneumophila* strains. The first-order polynomial model which represents *L. longbeachae* ATCC 33462 inactivation kinetics, estimated that this specie achieved a 4 log inactivation after an exposure at 50°C for 30.68 min and at 55°C for 1.82 min.

Water is the major reservoir for *Legionellae*, and the bacteria have been found in freshwater environments worldwide (Fields *et al.* 2002). However, *Legionella longbeachae* has been also frequently isolated from potting soil (Velonakis *et al.* 2010). The adaptation for surviving under soil conditions might supposed to *L. longbeachae* a worst adaptation to high temperatures.

Following, in order to determine if the effectiveness of thermal treatments apart of varying between species also varies between serogroups, results from *L. pneumophila* sg. 7 and *L. pneumophila* sg. 8 were compared to those obtained from the two *L. pneumophila* sg. 1 strains. Results showed significant differences between the different serogroups used even between the two *L. pneumophila* sg. 1 strains. So, instead of determining that differences on the effectiveness of thermal treatments applied are serogroup dependent, our results indicate that those differences could be attributable to each strain itself.

Results showed that thermal expositions at 50°C for 30 min. excluding *L. longbeachae* ATCC 33462, reduced less than 4 logs any of the *L. pneumophila* strains used. Thus, following USEPA (1989) recommendations which assesses that sufficient drinking water disinfection needs to reduce 4 logs the concentration of bacterial pathogens (USEPA 1989) we could not consider the treatment applied safe enough.

In case of 55°C, whereas *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 and *L. pneumophila* sg. 1 env, required 10 min to achieve a 4 log inactivation, the other strains *L. pneumophila* sg. 8 env and *L. pneumophila* sg. 7 ATCC 33823 needed to increase the exposure time until 16 and 25 min respectively. At this temperature, differences on the inactivation patterns between strains reached the highest values.

At higher temperatures 60°C, 65°C and 70°C inactivation patterns showed significant differences at the lowest time points being imperceptible at the end of the treatments. The time needed for the 4 *L. pneumophila* strains to achieve a 4 log reduction at 60°C was around 3.5 min. On the other hand, the effectiveness of thermal treatments at the highest temperatures, 65°C and 70°C was very similar and achieving a 4 log reduction in approximately 1 min.

The results obtained in the current study slightly differed from a similar study realized by Stout *et al.* (1986) which reported the effect of thermal treatment on 19 members of the Family *Legionellaceae*. In that study 1 log reductions (T_{90} values) were obtained for thermal treatments at 60°C, 70°C and 80°C. Among the species and strains analyzed by Stout *et al.* (1986), they found that *L. pneumophila* sg. 1 achieved 1 log reduction after being exposed for 2.3-4.8 min at 60°C and between 1.2-1.4 min at 70°C. Those values and the inactivation values obtained for the rest of strains analyzed were higher compared to the ones obtained in the current study. The fact that different experimental protocols were used, they used tubes in a water bath that could delay temperature effect compared to the use of dialysis bags could explain those differences.

But, despite of the differences when comparing inactivation rates of both studies, some agreement was found for general trends. In both studies, the effectiveness of thermal treatments was higher on *L. longbeachae* strains compared to *L. pneumophila* strains; and differences between *L. pneumophila* serogroups were strain dependent. Eg, T_{90} values obtained from a strain of *L. pneumophila* sg. 7 and a *L. pneumophila* sg. 8 at 60°C were 3.7 and 2.5 min respectively, so inactivation values of both strains fitted within the range of T_{90} values obtained for the 21 strains of *L. pneumophila* sg. 1 analyzed which was 2.3-4.8 min.

When comparing the results obtained to those realized in real water systems is important to consider that environmental variables, such as pH, water activity and content of the medium or

matrix used, can greatly influence thermal inactivation rates, making difficult to extrapolate these results to heat inactivation in a fresh water medium (Spinks *et al.* 2006). Moreover, growth phase and nutrient availability are also known to have pronounced influences on heat resistance with stationary-phase and starved cells demonstrating maximum resistance, due at least partly to the translation of the global regulator *rpoS* gene (Fujita *et al.* 1994, Spinks *et al.* 2006, Chang *et al.* 2007).

But although considering the influences of those environmental factors, some agreements between the current study and real water systems could be found. In a study realized in an artificial plumbing model, Muraca *et al.* (1987) reported that temperatures in the range of 50 to 60°C completely eradicated *L. pneumophila* from the model system in less than 3 h. In the study of Hrubá (2009) a temperature of 50°C was considered an insufficient requisite for the eradication of *Legionella* and suggested that a system operating temperature of 55°C might be a better optimum to control *Legionella*, given the economical and safety limitations of temperatures as high as 60°C (Hrubá 2009). In another study realized by Saby *et al.* (2005), it was also suggested that perfect control of a temperature of 55°C in the network would allow the containment of *Legionella* contamination of the water. According to data reported in the current study we consider that temperatures of 50°C or below are not effective enough to keep *Legionella* under control as Muraca *et al.* (1987) suggested, instead of that a temperature range between 55°C and 60°C would ensure the system safety.

Mouchtouri *et al.* (2007) also agreed with the findings of the current study reporting that *Legionella* non-pneumophila species are less resistant to thermal treatments than *L. pneumophila*. However, they did not find significant differences on the sensitivity of *L. pneumophila* sg. 1 and *L. pneumophila* sg. 2-14 against thermal treatments applied in a hospital water distribution system (Mouchtouri *et al.* 2007) and mentioned that in the study of Borella *et al.* (2005c) they considered *L. pneumophila* sg. 1 the most resistant. The results obtained in the present study agreed with Mouchtouri *et al.* (2007) because even *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 was the most resistant strain for most of the treatments applied the other sg. 1 strain did not show the same inactivation pattern.

Regarding to protozoa, four FLA strains were exposed at 50°C, 60°C and 70°C. In order to observe how the effect of thermal treatment varies between life stages, trophozoites and cysts of CCAP and environmental FLA strains were treated separately. The lack of official standards available to assess the effectiveness of disinfectant treatments against amoebae (Coulon *et al.* 2010) led us to design a microcosm system using dialysis bags to ensure that the thermal effect was homogeneously applied to all amoeba cells. Although previous studies on the effect of

temperature on FLA have been reported (Griffin 1972, Storey *et al.* 2004, Coulon *et al.* 2010, Pumidonming *et al.* 2010), the current study is the first in which the effect of thermal treatments at 50°C, 60°C and 70°C was investigated in four FLA strains at different life stages, reflecting reported differences in their resistance to biocides (Turner *et al.* 2000, Lloyd *et al.* 2001).

The results showed that the thermal treatments applied were significantly more effective at inactivating trophozoites compared to cysts. Thermal treatment at 50°C showed a 2–3-log reduction in the viability of trophozoites after 30 min of exposure whereas cyst inactivation remained below 1 log. No significant differences were found between strains for either cysts or trophozoites at this temperature.

Trophozoite inactivation at 50°C and 60°C fitted a monophasic exponential model. A thermal exposure at 50°C for 12.55 min was the time required to reduce the viability of *H. vermiformis* CCAP 1534/7A trophozoites by 3 logs whereas at 60°C trophozoites of *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 required 2.9 and 1.09 min respectively. On the other hand, cyst inactivation fitted a first order polynomial model. The time required to achieve a 3-log reduction in viability at 50°C was 89 min for *H. vermiformis* 195, 124 min for *Acanthamoeba* sp. 155, 206 min for *H. vermiformis* CCAP 1534/7A and 227 min for *A. castellanii* CCAP 1534/2. At 60°C, reduction times were much lower, 32 min for *A. castellanii* CCAP 1534/2 and 14 min for *Acanthamoeba* sp. 155.

Thermal treatment at 60°C and 70°C was radically more effective against the four FLA used, and significant differences were found between species, especially *H. vermiformis* compared to *Acanthamoeba* strains. Cysts and trophozoites of both CCAP and environmental *H. vermiformis* strains showed a similar pattern of inactivation at these higher temperatures, with a reduction in viability of more than 4 logs in both stages when temperatures of 60°C and 70°C were applied over 2 min and 0.5 min respectively. This finding differed from the results of Kuchta *et al.* (1993), who reported that a temperature of 60°C was required for 30 min to achieve a cysticidal and trophocidal effect in an *H. vermiformis* environmental strain (Kuchta *et al.* 1993). It should be noted that in this case the inactivation study was performed using a different strain in a real water system, where other environmental factors may have influenced the temperature effect (Kuchta *et al.* 1993).

In the case of *Acanthamoeba* strains, thermal treatment was more effective against *Acanthamoeba* sp. 155 than the CCAP strain. A temperature of 60°C applied for 2 min reduced the viability of *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites by 4 logs whereas exposure to the same temperature was required for more than 10 min to obtain the same result in the cyst stage. No viable cysts or trophozoites were recovered after thermal treatment at 70°C. Thermal treatment

was less effective against *A. castellanii* CCAP 1534/2. the cysts of which showed less than a 4-log reduction in viability after exposure to 60°C for 30 min. and still remained viable after thermal treatment at 70°C for 1 min. So, among the four FLA strains used in the current study, *A. castellanii* CCAP 1534/2 was significantly more resistant to thermal treatment than the others. The differences between life stages shown by the *Acanthamoeba* strains used were consistent with the results of Turner *et al.* (2000), who observed that trophozoites of *A. castellanii* were inactivated following treatment at 46°C for 30 min whereas it was necessary to increase the temperature to 56°C to obtain the same level of inactivation for cysts (Turner *et al.* 2000). The morphology and structure of *Acanthamoeba* cysts and trophozoites have been studied by several authors (Khunkitti *et al.* 1998, Smirnov *et al.* 1999, Coulon *et al.* 2010), who reported a higher cellulose concentration in the inner wall of the cystic stages (Turner *et al.* 2000). This suggests that variations in the inactivation pattern between life stages as well as between strains in response to thermal treatment could be attributed to differences in membrane composition, especially since components such as cellulose have been used as fire insulation material (Poologanathan Keerthan 2013).

The comparison of our results with those found in the literature showed heterogenic results. While Ludwig *et al.* (1986) reported a cysticidal effect of thermal treatment on cysts of *A. castellanii* and *A. polyphaga* strains after exposure to 80°C for 10 min (Ludwig *et al.* 1986). Aksozek *et al.* (2002) reported the same effect in an *A. castellanii* strain after exposure to 65°C for more than 5 min (Aksozek *et al.* 2002). The *Acanthamoeba* cysts used in the current study were more resistant than the strain used by Aksozek *et al.* (2002) but more sensitive than that used by Ludwig *et al.* (1986) and Aksozek *et al.* (2002). In the case of *Hartmannella* strains, our results conflicted with the hypothesis of authors such as Rohr *et al.* (1998), who suggested that this genus is more heat tolerant than *Acanthamoeba* strains due to its higher prevalence in hot waters, since thermal treatments were more effective against *Hartmannella* strains than *Acanthamoeba* strains (Rohr *et al.* 1998).

The diversity of results could be attributed to differences in the intrinsic characteristics of each strain and the lack of official standards for inactivation assays, which makes it difficult to compare different studies about the disinfectant effect of temperature, especially when authors use different culture media, initial cell concentrations and methods for quantifying cell viability (Mercer 2008, Thomas *et al.* 2009, Coulon *et al.* 2010). As an example, the method used in the current study using dialysis bags ensured that all cells were quick and evenly subjected to the chosen temperature; therefore, thermal treatment was more effective at inactivating amoeba cells than the other studies mentioned above.

The variability of the results was even higher than that of those obtained in real water systems, where the inactivation of microorganisms could not be analysed as an isolated event but as a complex event influenced by many factors such as the presence of biofilms, pipeline design, water stagnation, etc. (Kuchta *et al.* 1993, Mathers *et al.* 1996, Ahearn *et al.* 1997, Taylor *et al.* 2009).

Even so, it is generally agreed that FLA play an important role in water systems and should be taken into consideration when applying disinfection treatments because as Mathers *et al.* 1996 reported, sub-lethal disinfectant doses can stimulate encystations of *Acanthamoeba*, which may be a source of thermotolerant strains (Mathers *et al.* 1996, Winięcka-Krusnell *et al.* 1999, Ahearn *et al.* 1997). Furthermore, FLA survival can promote rapid recolonization of these systems and is a likely source of emerging opportunistic pathogens such as *Legionella* (Swanson *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2004, Thomas *et al.* 2009, Loret *et al.* 2010)

Finally, in order to demonstrate how the association between *L. pneumophila* and FLA, several thermal treatments at 50°C, 55°C, 60°C and 70°C were applied on *L. pneumophila* sg. 1 associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and associated to *Acanthamoeba* sp. 155. Results showed that for most of the treatments applied, the association with *Acanthamoeba* trophozoites reduced its effectiveness compared to the planktonic form of the same *L. pneumophila* strain.

No significant differences were found when comparing inactivation patterns of *L. pneumophila* sg. 1 associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 at any of the temperatures analyzed. Thermal treatments at 50°C and at 55°C showed the highest differences between associated and non-associated *L. pneumophila*, whereas at 60°C inactivation patterns of all associated and non-associated bacteria were very similar. At 70°C was the only case that the effectiveness of the treatment was higher on associated *L. pneumophila*.

Inactivation kinetics of *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* strains fitted to a polynomial of first order model as it happened with the same strains in an axenic state. The time required to reduce 4 logs of the non-associated *L. pneumophila* change from 45 min at 50°C, 9.3 min at 55°C, 3.43 min at 60°C and 0.93 min at 70°C, to an average of 744 at 50°C, 48 min at 55°C, 4.62 min at 60°C and 0.46 min at 70°C for *L. pneumophila* associated to *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155.

Results for the axenic *Legionella* spp. strains showed that 55°C was the threshold temperature for thermal treatments to be effective. However, the experiments with *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* strains increased the threshold until 60°C. Thus, it seems that the association with *Acanthamoeba* strains protects the bacteria for temperatures below 60°C, but

for thermal treatments higher than this temperature its protection dramatically decreased. In fact, at this temperature non-associated trophozoites of *Acanthamoeba* strains were also significantly reduced, so it seems that *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* trophozoites was reduced following the inactivation pattern of its trophozoites hosts.

The behaviour of associated *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 trophozoites with *L. pneumophila* in front the thermal treatments was also analyzed. Among the associated trophozoites, *Acanthamoeba* sp. 155 was more sensitive to the treatments applied than *A. castellanii* CCAP 1534/2. However, comparing the associated *Acanthamoeba* strains with the non-associated, some differences were found being the first ones more resistant to thermal exposures at 50°C and 60°C.

The obtained results were then compared to those few found in the literature. Storey *et al.* (2004) reported that in association with *Acanthamoebae*, *Legionellae* increased their tolerance to thermal a treatments ranging from 40°C-50°C 1 log and between 60-80°C 2 logs when compared to the axenic *Legionella* form. Although the current study results agreed with the fact that *Legionella* increased its tolerance to thermal treatments in association with *Acanthamoeba* strains, especially at 55°C at 60°C and 70°C these differences were dramatically reduced at higher temperatures.

The World Health Organization (WHO) recommendations on drinking water quality state that water temperature should be kept above 50–55°C in systems in large buildings (WHO 2011). Furthermore, in the case of Spanish guidelines is mandatory that buildings keep water temperature above 50°C at the furthest point of the circuit as well as in the return pipe. Based on the current study, this temperature might not be high enough to maintain FLA populations under control in drinking water systems, especially if they are encysted. However, other water treatments such as pasteurization, which involves keeping the water temperature at 63°C for 30 min, could provide a greater level of safety. Higher temperatures such as 70°C, produce a greater biocide effect, however, the energy expenditure is not affordable for all large buildings.

CHAPTER 4

CHAPTER 4: RESULTS AND DISCUSSION UV RADIATION TREATMENTS

4.1 RESULTS

4.1.1 UV inactivation of *Legionella* spp. strains

Five strains of *Legionella* spp.: *L. pneumophila* sg. 1 Philadelphia ATCC 33152. *L. pneumophila* sg. 7 ATCC 33823 and *L. longbeachae* ATCC 33462; and two environmental strains: *L. pneumophila* sg. 1 and *L. pneumophila* sg. 8; were inactivated by UV irradiation (253.7 nm). All the *Legionella* strains had a similar sensitivity to UV irradiation, requiring a fluence of 50 J/m² to observe at least a 3 log reduction in the population (Figure 4.1). However, a specific analysis of *Legionella* spp. inactivation for each UV fluence revealed some significant differences between strains (Figure 4.1).

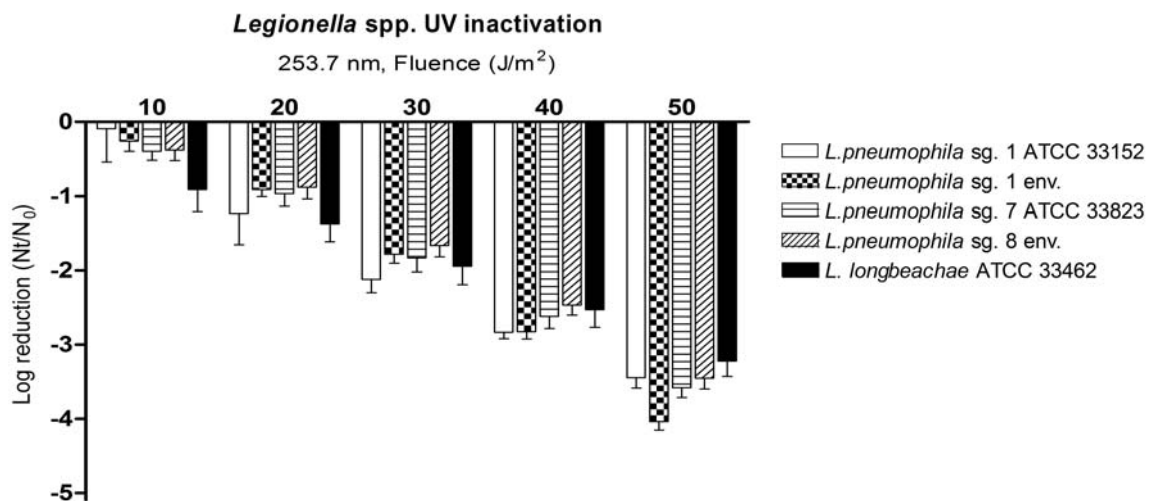


Figure 4.1. Effect of UV radiation (253.7 nm) on the inactivation of 5 *Legionella* strains. Bacterial inactivation was determined using viable counts on BCYE medium. Data are presented as means \pm SD (columns and error bars).

4.1.2 Inactivation kinetics of *Legionella* spp. strains in front UV irradiation

The inactivation kinetics of the 5 *Legionella* strains fit to a first-order polynomial model adapted to UV irradiation, which was characterized by an initial lag in the slope or shoulder followed by a linear decrease in cell concentration. High R² values supported the chosen model (Table 4.1). Of the strains analyzed, *L. longbeachae* had the smallest shoulder, represented by a negative value on the intercept, which indicates a greater sensitivity to UV fluence, whereas the *L. pneumophila* sg.1 environmental strain was the most resistant strain at lower UV fluences, as shown by the largest shoulder.

For each strain, the UV fluences required for 1 log and 3 log reductions were calculated (Table 4.1). *L. longbeachae* and *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 were the most UV sensitive strains; a 1 log reduction required fluences of 14 and 17 J/m², respectively. Of the other strains analyzed, *L. pneumophila* sg. 7, *L. pneumophila* sg. 1 environmental and *L. pneumophila* sg. 8 had very similar T₉₀ values, 17, 17 and 18 J/m², respectively. However, the results showed that whereas *L. longbeachae* was the most sensitive strain at lower UV fluences, as represented by the lowest 1 log reduction value, it required the highest UV fluence (47 J/m²) for 3 log reduction.

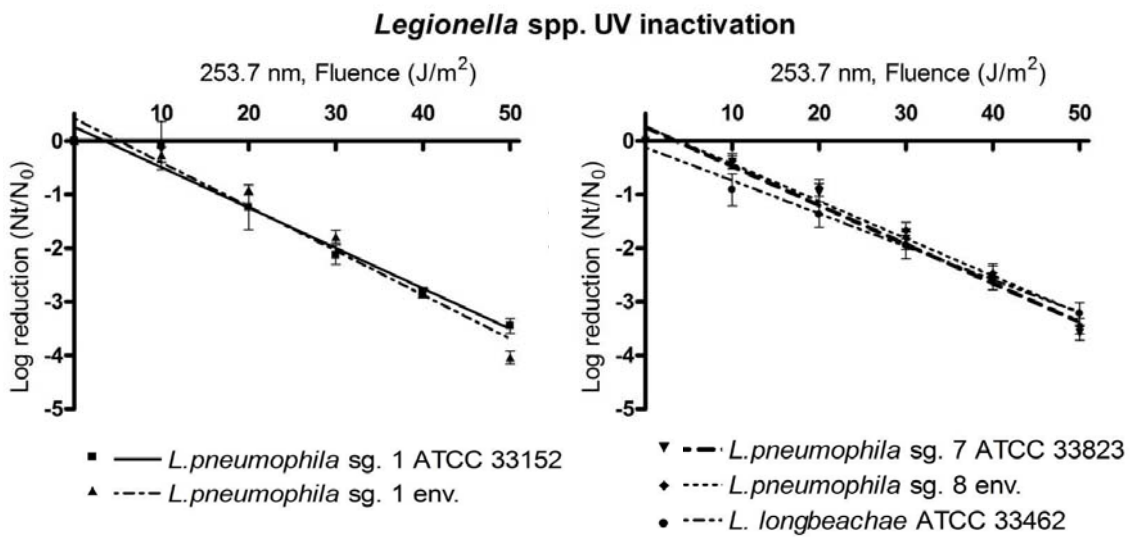


Figure 4.2. Effect of UV radiation (253.7 nm) on the inactivation of the 5 *Legionella* strains. Inactivation kinetics of *Legionella* strains fitted to a first order polynomial model (in lines).

Table 4.1. Calculated parameters for the UV inactivation curve (253.7 nm) of five *Legionella* strains and the required UV fluence (J/m²) for 1-log and 3-log reduction. Equations of the line adjusted to the formula described in the text and were represented as Y (surviving fraction) = Intercept (shoulder broadness) + Slope*x. R² values showed the robustness of the model..

<i>Legionella</i> strains	Equation of the line	R ²	Required UV fluence (J/m ²) to reduce		
			1-log	3-log	4-log
<i>L. pneumophila</i> sg. 1 ATCC 33152	Y = 0.2603 - 0.0753x	0.975	16.73	43.30	56.68*
<i>L. pneumophila</i> sg. 1 env.	Y = 0.4178 - 0.0822x	0.961	17.24	41.57	53.73*
<i>L. pneumophila</i> sg. 7 ATCC 33823	Y = 0.2510 - 0.0727x	0.981	17.20	44.71	58.47*
<i>L. pneumophila</i> sg. 8 env.	Y = 0.2633 - 0.0695x	0.974	18.17	46.93	61.31*
<i>L. longbeachae</i> ATCC 33462	Y = -0.1270 - 0.0615x	0.992	14.19	46.71	62.97*

(*) estimated parameter

4.1.3 Effect of UV irradiation on FLA

4.1.3.1 Effect of UV irradiation on FLA strains in different life stages

To investigate the efficacy of UV irradiation against protozoa, four strains of free-living amoebae (FLA) were tested: *A. castellanii* CCAP 1534/2, *Acanthamoeba* sp. 155 environmental, *H. vermiformis* CCAP 1534/7A and *H. vermiformis* 195 environmental. Each experiment was performed considering the amoebal life stage: trophozoite or cyst.

The *A. castellanii* CCAP 1534/2 strain did not show significant differences in the UV inactivation pattern between trophozoites and cysts at fluences below 800 J/m², but they were significantly different at higher UV fluences (Figure 4.3). At 800 J/m², *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites showed a greater than 4 log reduction, almost twice as much as the cysts, which were reduced by 2.30 logs. The same pattern between trophozoites and cysts was observed for the environmental *Acanthamoeba* sp. 155 strain (Figure 4.3).

The *H. vermiformis* CCAP 1534/7A strain showed similar inactivation values for trophozoites and cysts below 200 J/m². Above that fluence, the inactivation was more pronounced for trophozoites. 4.23 log at 320 J/m², compared to cysts, which showed a 2.28 log reduction at 400 J/m². On the other hand, trophozoites of *H. vermiformis* 195 strain showed a 4.44 log reduction at 320 J/m², while cysts were reduced 2.31 logs at 400 J/m². The differences between the life stage inactivation values were similar for both *H. vermiformis* strains for fluences above 200 J/m².

4.1.3.2 UV inactivation of FLA strains

The results revealed clear differences between the UV sensitivity of the two amoeba genera, with *H. vermiformis* strains being more susceptible than *Acanthamoeba* strains.

No significant differences were found between trophozoites of the *Acanthamoeba* strains. When comparing *Acanthamoeba* cyst stages, some significant differences were found at lower fluences. At 200 J/m² and 400 J/m², *Acanthamoeba* sp. 155 was more sensitive than the *A. castellanii* CCAP 1534/2 strain. The trophozoite stages of *H. vermiformis* strains did not reveal significant differences. However, cysts of *Hartmannella* strains showed significant different UV inactivation rates at most of the fluences, with *H. vermiformis* CCAP 1534/7A being the most sensitive.

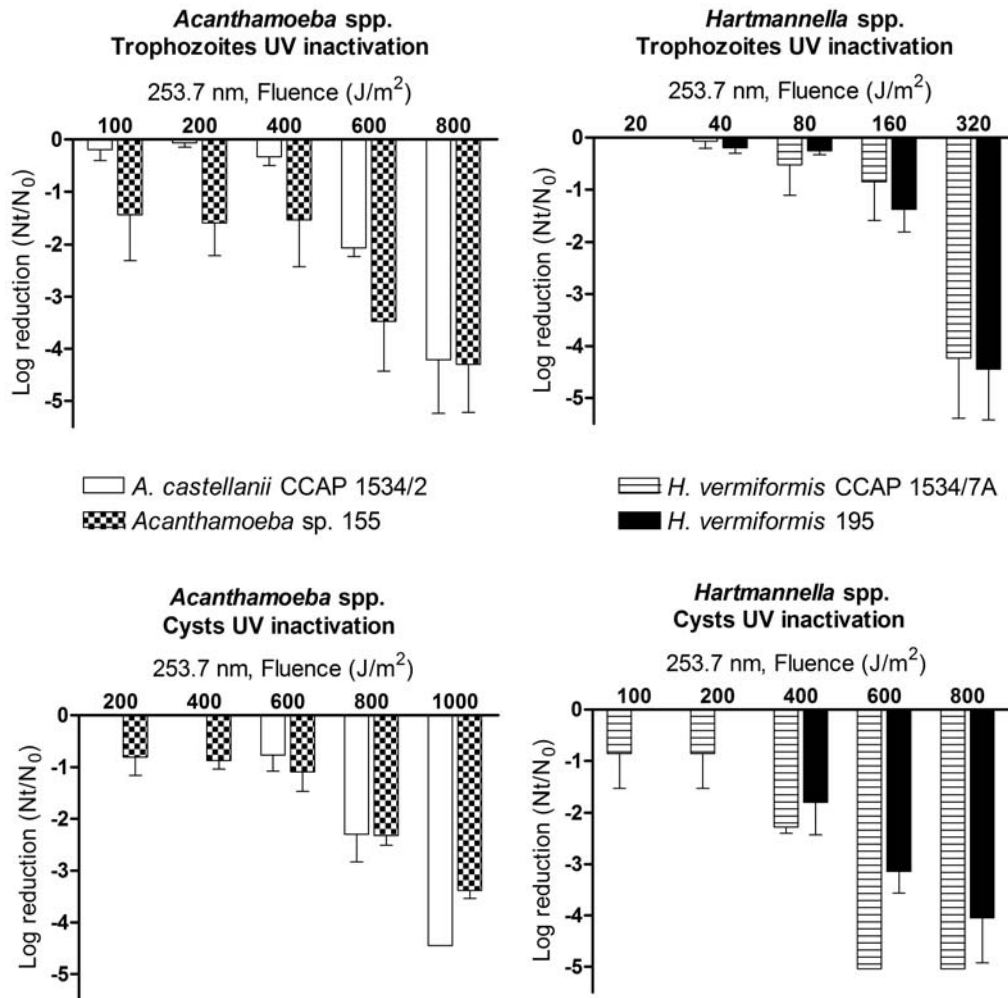


Figure 4.3. Effect of UV radiation (253.7 nm) on the inactivation of four FLA strains. Amoebal inactivation was determined using an adaptation of the MPN method. Data are presented as means \pm SD (columns and error bars).

4.1.4 Inactivation kinetics of FLA strains in front UV irradiation

The inactivation kinetics of the four FLA strains fit a first-order polynomial model characterized by an initial shoulder followed by a linear decrease in cell viability (Figure 4.4). The high R^2 values shown in Table 4.2 supported the assumption.

The comparison of 1 log reduction values for the FLA strains (Table 4.2) showed that UV irradiation was considerably more effective against trophozoites compared to cysts. While trophozoites of *H. vermiformis* strains showed 1 log values of approximately $100 J/m^2$ and trophozoites of *Acanthamoeba* strains of approximately $300 J/m^2$, the 1 log values for the cystic stages of *H. vermiformis* strains ranged between 160 - $300 J/m^2$ and the *Acanthamoeba* strains between 340 - $450 J/m^2$. A comparison between the 1 log and 3 log reduction values between

trophozoites and cysts of the same strain showed even greater differences, suggesting that both life stages had similar sensitivities at lower UV fluences but that the sensitivities at higher fluences considerably changed. Note that *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites had a 1 log value (321 J/m^2) higher than cysts of both *H. vermiformis* strains, which ranged from 168-315 J/m^2 .

Finally, among the 4 FLA strains used, UV irradiation was more effective against the *H. vermiformis* CCAP 1534/7A strain, whereas the effectiveness against *A. castellanii* CCAP 1534/2 was the lowest.

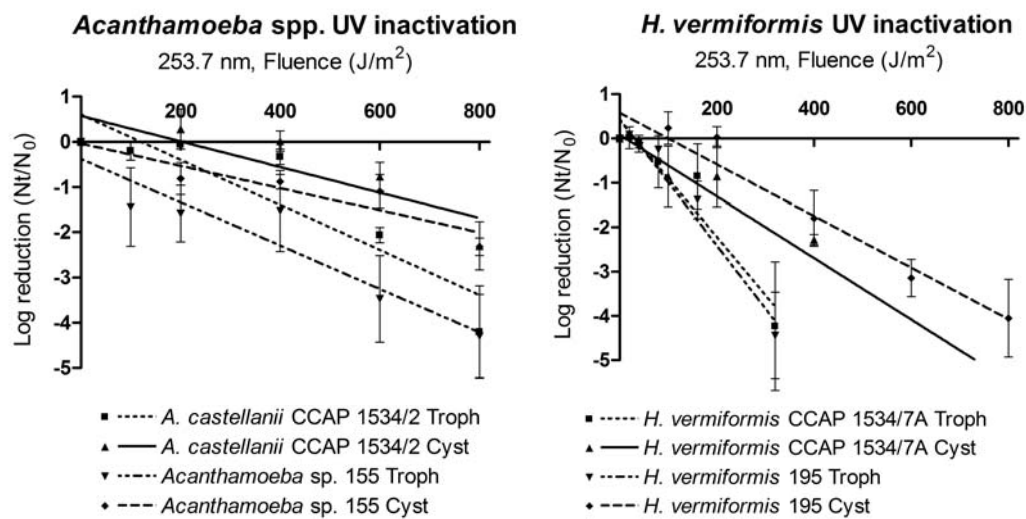


Figure 4.4. Effect of UV radiation (253.7 nm) on the inactivation of 4 FLA strains. Inactivation kinetics of FLA strains fitted to first order polynomial models represented in lines.

Table 4.2. Calculated parameters for the UV inactivation curves (253.7 nm) of four FLA strains irradiated separately by its life stage, cyst or trophozoite, and the required UV fluence (J/m^2) for 1-log and 3-log reduction. Inactivation kinetics of FLA strains which fitted to a first order polynomial model were represented as Y (surviving fraction) = Intercept (shoulder broadness) + Slope $\cdot x$. R^2 values which showed the robustness of the model.

FLA strains	Life stage	Equation of the line	R^2	UV fluence (J/m^2) required to reduce	
				1-log	3-log
<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Trophozoites	$Y = 0.6022 - 0.005x$	0.827	321.304	722.39
	Cysts	$Y = 0.9952 - 0.004x$	0.793	453.97	909
<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Trophozoites	$Y = -0.4460 - 0.005x$	0.812	275.90	657.5
	Cysts	$Y = -0.003x$	0.892	341.87	992
<i>H. vermiformis</i> CCAP 1534/7A	Trophozoites	$Y = 0.4122 - 0.013x$	0.919	107.55	259.9
	Cysts	$Y = -0.088 - 0.005x$	0.969	168.47	537.8
<i>H. vermiformis</i> 195	Trophozoites	$Y = 0.4378 - 0.014x$	0.953	101.04	241.6
	Cysts	$Y = 0.4116 - 0.004x$	0.959	315.24	761.9

4.1.5 Effect of UV irradiation on *L. pneumophila* associated with *Acanthamoeba* strains

4.1.5.1 Effect of UV irradiation on *L. pneumophila*

Co-cultures between *L. pneumophila* sg.1 environmental strain with *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 were performed as described above.

The associations between the *L. pneumophila* sg.1 env., strain and the *Acanthamoeba* strains significantly decreased the inactivation of the bacteria (Figure 4.5). Higher fluences were required to obtain the same population reduction. Inactivation kinetics of the co-culture fit a first-order polynomial model, as did the free *Legionella* bacteria. Thus, whereas to observe a 4 log reduction in the *L. pneumophila* sg.1 env., the suspensions were exposed to $53.7 J/m^2$, it was necessary to increase the fluence to $109.7 J/m^2$ in the association with *A. castellanii* CCAP 1534/2 or to $155.3 J/m^2$ with *Acanthamoeba* sp. 155 to observe the same inactivation effect (Table 4.3).

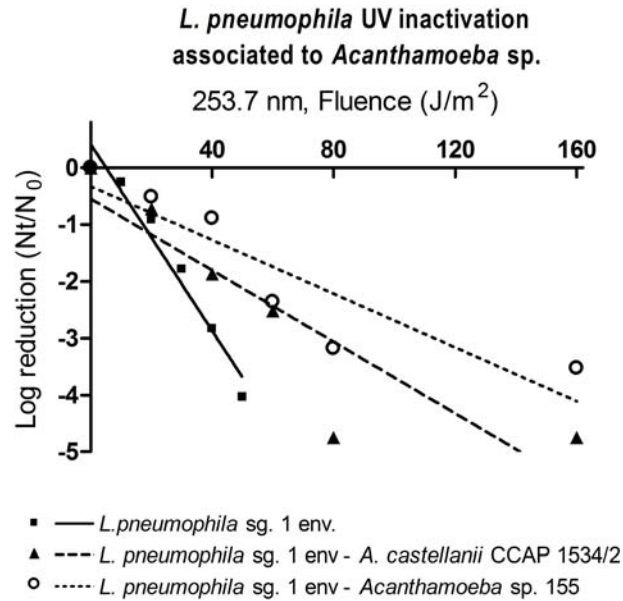


Figure 4.5. Effect of UV radiation (253.7 nm) on the inactivation of *L. pneumophila* sg. 1 env associated to two *Acanthamoeba* strains, *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 strains. Bacterial inactivation was determined using viable counts on BCYE medium. Data are presented as means of experiments performed by triplicate. Inactivation kinetics of *L. pneumophila* sg. 1 env strain and both amoeba strains fitted to a first order polynomial model.

Table 4.3. Estimated model parameters for the UV inactivation (253.7 nm) of *L. pneumophila* sg. 1 env. associated to two *Acanthamoeba* strains, *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 strains. Equations of the line adjusted to the first order polynomial model, and were represented as Y (surviving fraction) = Intercept (shoulder broadness) + Slope*x -. R² values which showed the robustness of the model and T₉₀, T₉₉ and T_{99,99} (J/m²) were also included.

<i>Legionella</i> strain	Association/State	Equation of the line	R ²	Required UV fluence (J/m ²) to reduce		
				1-log	2-log	4-log
<i>L. pneumophila</i> sg.1 env	<i>A. castellanii</i> CCAP 1534/2	Y = -0.5458 - 0.0315x	0.796	14.42	46.18	109.70
	<i>Acanthamoeba</i> sp. 155	Y = -0.3260 - 0.0236x	0.819	28.49	70.78	155.35
	Axenic	Y = 0.4178 - 0.0822x	0.961	17.24	29.4	53.73*

(*) estimated parameter

4.1.5.2 Effect of UV irradiation on *Acanthamoeba* strains

The effect of UV irradiation on *Acanthamoeba* trophozoites associated with *L. pneumophila* sg. 1 was evaluated. The fluences applied in this case were chosen in order to observe if the effect

of UV irradiation on *L. pneumophila* was modified for the association with *Acanthamoeba* trophozoites, which ranged from 20-320 J/m² (Figure 4.6).

Results of *Acanthamoeba* trophozoites associated with *L. pneumophila* showed some inactivation of *Acanthamoeba* strains for fluences higher than 80 J/m², even though any of the associated trophozoites were reduced more than 0.59 logs at 320 J/m². At that fluence significant differences were found between the two associated *Acanthamoeba* trophozoites, being *A. castellanii* CCAP 1534/2 more sensitive than *Acanthamoeba* sp. 155. Due to the fact that fluences applied in the case of associated *Acanthamoeba* trophozoites were different from those applied to the non-associated trophozoites, a proper comparison could not be performed.

Inactivation kinetics of associated *Acanthamoeba* trophozoites fitted a polynomial first order model. However, in the case of *Acanthamoeba* sp. 155 R² values were very low. Because of that, the time required to achieve 1 and 3 log reductions were not estimated.

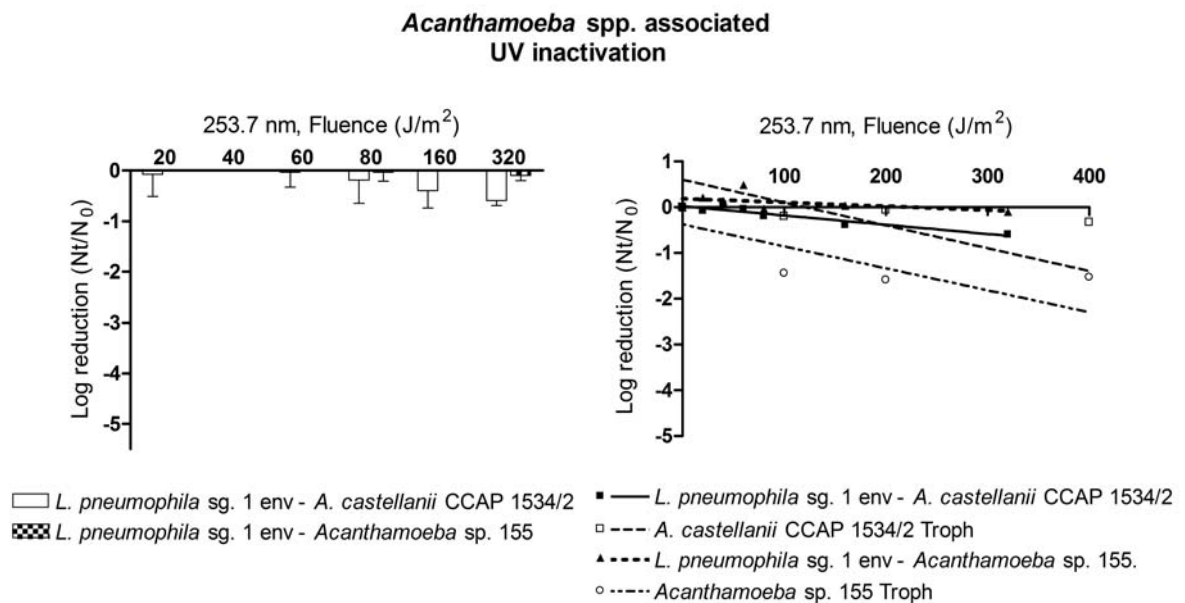


Figure 4.6. Effect of UV radiation (253.7 nm) on the inactivation of *L. pneumophila* sg. 1 env associated with two *Acanthamoeba* strains, *A. castellanii* CCAP 1534/2 and *Acanthamoeba* sp. 155 strains. Trophozoites inactivation was determined using an adaptation of the MPN method. Data are presented as means of experiments performed by triplicate. Inactivation kinetics of *Acanthamoeba* trophozoites associated and non-associated to *L. pneumophila* fitted to a first order polynomial model.

4.2 DISCUSSION

In this study, the effect of one of the most widely used disinfection treatments, UV irradiation, was studied (Hijnen *et al.* 2006, Sommer *et al.* 2008, Loret *et al.* 2010). The effectiveness of UV irradiation was evaluated in five *Legionella* strains, in separately treated trophozoites and cysts of four FLA strains, and in two co-cultures of two *Acanthamoeba* strains associated with a *L. pneumophila* strain.

Inactivation studies of microorganisms using UV irradiation have been performed during the last decade to determine which fluences should be used for the disinfection of water. The effectiveness of UV fluences used for *Legionella* inactivation in the current study which ranged from 10-50 J/m², almost reduced 4 logs the population of all the strains used. Considering only the data from laboratory conditions (batch experiments) in studies performed by several authors, it was shown that UV irradiation was more effective against *Legionella* strains compared to other bacteria such as *E. coli*, *Shigella* sp. or *Salmonella typhi* (Chang *et al.* 1985, Hijnen *et al.* 2006, Coohill *et al.* 2008). It is important to note that in all these experiments about UV inactivation, values reported are assumed to account for dark repair mechanisms (USEPA 2006) but not for photoreactivation.

No significant differences were found considering all of the inactivation curves of the five *Legionella* strains, although some significant differences appeared when the comparison was analyzed for the specific fluences. Inactivation kinetics of *Legionella* strains fitted the model suggested by Sommer *et al.* (2000) and Coohill (2008) that was characterized by an initial lag in slope or shoulder, which represents the ability of the bacteria to endure low exposures, followed by an exponential decrease of the population, represented by a linear slope (Sommer *et al.* 2000, Coohill *et al.* 2008).

Legionella strains were sorted by UV sensitivity by using 1 log, 3 log and 4 log reduction fluence values. UV irradiation was more effective against *L. pneumophila* sg. 1 env (53.73 J/m²), followed by *L. pneumophila* sg. 1 ATCC 33152 (56.68 J/m²), *L. pneumophila* sg. 7 ATCC 33823 (58.47 J/m²) and *L. pneumophila* sg. 8 env (61.31 J/m²). However, the *L. longbeachae* strain, which showed the lowest 1 log value (14 J/m²), required one of the highest UV fluences (62.97 J/m²) to be reduced 4 log. That fact might suggest that *L. longbeachae* requires more time to react against UV irradiation.

The results were compared to the studies by Antopol and Ellner (1978) and Knudson (1985), who studied the effectiveness of UV irradiation on different species and strains of *Legionella* (Antopol *et al.* 1979, Knudson 1985). Those authors describe a considerable divergence for 1

log values ranging from 4-22 J/m²; the results obtained in the present study were within this range. Considering all the species and strains used in the different studies, the *L. pneumophila* sg. 8 env, used in the current study and *L. micdadei* (Knudson 1985) were the most resistant species, with a 1 log value of 18 J/m², whereas the most sensitive species were *L. wadsworthii* and *L. bozemanii*, with a 1 log value of 4 J/m² (Knudson 1985).

Considering only the results for the *L. pneumophila* strains, no significant differences were found between the strains used in the current study. However, these strains were more resistant to UV irradiation than the strains tested by Antopol and Ellner (1979) and Knudson (1985), suggesting variability between strains of *L. pneumophila*. This fact should be considered when using UV disinfection (Antopol *et al.* 1979, Knudson 1985). The variability between strains of the same species was also described by Sommer *et al.* (2000), who observed a wide divergence in the UV inactivation in 7 *E. coli* strains which ranged from 12-125 J/m² to achieved the same log reduction (Sommer *et al.* 2000). Thus, when studying the effectiveness of UV irradiation, not only differences between species but also differences between strains should be taken into account.

Some studies about the effectiveness of UV irradiation against protozoa exist (Chang *et al.* 1985, Clancy *et al.* 2004), but most of those studies focused on waterborne pathogens, such as *Cryptosporidium* and *Giardia*, because this disinfection method was proven to be highly effective against them (Craik *et al.* 2000, Clancy *et al.* 2004). Despite this, only a few studies have been published based on the FLA group, although this group has pathogenic representatives and there is an increasing evidence of its importance as potential vectors for pathogenic bacteria such as *Legionella*, which causes concern to health authorities (Thomas *et al.* 2010).

Four different FLA strains were exposed to UV irradiation during their life stages, trophozoites or cysts. For the first time, two strains of *H. vermiformis* were included in a UV inactivation study. The results showed that the effectiveness of the UV irradiation was significantly higher in trophozoites compared to cysts in the four FLA strains analyzed. The greatest differences between life stages were observed in *H. vermiformis* strains, whereas for *Acanthamoeba* strains, significant differences were observed specially for fluences above 800 J/m². Thus, as other authors have described, the cyst stages, representing amoebae in their resistant form, show a greater resistance than trophozoites against several biocides (Turner *et al.* 2000, Lloyd *et al.* 2001). When comparing the effectiveness of UV irradiation within each genera, no significant differences were found when comparing the inactivation patterns of trophozoites within *Acanthamoeba* or *H. vermiformis* strains. In the case of cysts, the *Acanthamoeba* strains showed significant differences at lower fluences, such as 200 J/m² and 400 J/m², with the *Acanthamoeba*

sp. 155 strain showing more sensitivity than the *Acanthamoeba* CCAP 1534/2 strain. In the latter case, no inactivation occurred up to a fluence of 400 J/m². The inactivation patterns of *H. vermiformis* cysts also differed significantly for both strains at most of the fluences.

As for the bacteria, the inactivation kinetics of FLA fit to first-order polynomial models. The 1 log and 3 log reduction values showed that the effectiveness of UV irradiation was significantly higher against the *H. vermiformis* CCAP 1534/7A strain compared with the other strains for both life stages. In contrast, the UV effectiveness was significantly lower against the *A. castellanii* CCAP 1534/2 strain, which needed to be irradiated by the highest UV fluence to achieve 1 log and 3 log reduction values for both life stages. Moreover, the trophozoite stage of the *A. castellanii* CCAP 1534/2 strain had a greater UV resistance than the cysts of both *H. vermiformis* strains analyzed.

When comparing the UV inactivation studies in the literature, it is important to consider only those in which all the information about the methodology used is included, because the experimental conditions could considerably affect the results (Hijnen *et al.* 2006, Coohill *et al.* 2008). Therefore, the results obtained in the current study for FLA UV inactivation could barely be compared to any results in the literature. For example, Aksosek *et al.* (2002) used a non-comparable UV device with UV-B light instead UV-C, while Hwang *et al.* (2004) studied the effects of UV irradiation in mixed trophozoite and cyst suspensions (Aksozek *et al.* 2002, Hwang *et al.* 2004). For the *H. vermiformis* strains, no previous studies about UV inactivation were identified.

However, the current study could be compared with a few previously published studies. The results obtained in the present study differed from those obtained by Maya *et al.* (2003), who reported that by using a UV fluence of 1730 J/m² it was possible to inactivate up to 4 logs the trophozoites of *Acanthamoeba culbertsoni* and of an environmental *Acanthamoeba* strain (Maya *et al.* 2003). Nonetheless, the 1 log values were very similar (approximately 300 J/m²) (Maya *et al.* 2003). Another study, performed by Chang *et al.* (1985), reported a 1 log value of 380 J/m² for the cyst stage of an *A. castellanii* strain (Chang *et al.* 1985). In this case, our results are in agreement, especially for *Acanthamoeba* sp. 155 cysts, which had a 1 log value of 342 J/m². In addition, although the cysts of *A. castellanii* CCAP 1534/2 reported here were the most UV resistant, the 1 log value was just slightly higher, 454 J/m².

One of the most important objectives of the current study was to observe how the association of *Legionella* with FLA influences the effect of UV irradiation. The results obtained from the co-cultures of *L. pneumophila* sg.1 env and *Acanthamoeba* strains showed that *L. pneumophila* resistance was significantly higher compared to the inactivation pattern for the same strain in its

free-living state. Inactivation kinetics of *Legionella* associated with *Acanthamoeba* strains fit the same model described previously for bacteria and FLA. The fluences required for 1 log and 4 log reductions of *L. pneumophila* sg.1 env were 17 J/m² and 53 J/m², respectively, whereas it was necessary to increase the fluence to above 15 J/m² and above 109 J/m² to obtain the same results in the samples associated with *Acanthamoeba* strains.

The effectiveness of UV irradiation as a disinfection method against *Legionella* spp. and FLA has been shown in this study. However, it must be noted that the findings apply to microorganisms in suspension and not for those associated with biofilms.

Related to that, and considering the effectiveness shown for UV irradiation in inactivating many bacterial and specially *Legionella* species, several devices have been installed as disinfection systems for large buildings in the last years. Muraca *et al.* (1987) reported that a continuous UV irradiation, at 300 J/m², produced a 5 log decrease in the concentration of *L. pneumophila* within 20 min on a pilot scale system. However, no further *L. pneumophila* inactivation was observed after 20 min, from there on concentration remained stable at approximately 1x10² to 2x10² CFU/mL despite 6 h of continuous UV light exposure. Lin *et al.* (1998) analyzing different studies such as the one by Muraca *et al.* (1987) concluded that UV irradiation is unsuitable as a sole modality for an entire hospital because *Legionella* persist within biofilms in the dead ends and stagnant sections of the system.

In a study by Costa *et al.* (2009) they suggested that the installation of UV devices could be a good option to control *Legionella* colonization in smaller water circuits such as spas or hydrotherapy baths where the disinfection by using UV radiation does not alter physicochemical water properties. Taking in consideration the data reported in the current study, we could agree with Costa *et al.* (2009) that the UV device installed inactivate all *Legionellae* coming from the groundwater supplies and ensured a UV fluence high enough to damage cells avoiding the activation of dark repair mechanisms as well as photoreactivation in case of having open air water sections such as pools. So, as Knudson (1985) reported *Legionella* species analyzed have a very effective light-dependent DNA repair system.

The association with FLA is also a key factor to consider as demonstrated here. In that case, UV doses of 400 J/m² demanded for countries such as Austria or Germany, just achieved a 3 log inactivation for trophozoites of the *H. vermiformis* strains used in the current study. Trophozoites of both *Acanthamoeba* strains as well as cysts of *H. vermiformis* and *Acanthamoeba* spp strains analyzed were less than 3 logs reduced at this fluence suggesting a potential risk of recolonization. Finally, considering that no information about photoreactivation

or dark repair mechanisms of FLA has been found in the literature, this risk could be even underestimated.

It was necessary to use UV fluences of approximately 50 J/m^2 to obtain a 3 log reduction of *Legionella* spp. strains, whereas the same reduction in trophozoites of FLA strains ranged between $241\text{-}722 \text{ J/m}^2$ and cysts ranged between $537\text{-}992 \text{ J/m}^2$. The association of *L. pneumophila* with *Acanthamoeba* strains showed that the fluence had to be increased up to 100 J/m^2 for a 3 log reduction. Differences in the inactivation pattern between the different microorganisms investigated could be attributable to several factors, such as the microorganism type (amoeba or bacteria); physiological state observed between cysts and trophozoites on FLA inactivation; and strain diversity observed within *L. pneumophila* and FLA strains. Furthermore, this study highlights the fact that the microorganism ecology, such as FLA harboring pathogenic bacteria such as *Legionella* spp., is also a key factor to consider when using UV disinfection in water treatment.

CONCLUSIONS FINALS
FINAL CONCLUSIONS

CONCLUSIONS FINALS

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser conèixer l'eficàcia de tres desinfectants aplicats habitualment en aigües de consum en condicions semblants, clor, temperatura i radiació UV. Sota les mateixes condicions d'assaig es va analitzar la resistència de diferents soques de *Legionella* spp., d'amebes com *Acanthamoeba* spp. i *Hartmannella* en estat de trofozoït i cist i davant endosimbionts formats per *L. pneumophila* i *Acanthamoeba*. Les conclusions extretes d'aquest treball són:

1. Per l'estudi de l'eficàcia dels desinfectants sobre els diferents microorganismes utilitzats s'ha implementat un conjunt de tècniques:
 - a. El sistema de quantificació basat en el Número Més Probable, ha resultat ser una mètode molt útil i fàcilment reproducible per a la quantificació de la viabilitat de diferents soques d'amebes de vida lliure.
 - b. S'ha implementat una tècnica de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) com a eina per realitzar un seguiment dels co-cultius entre *L. pneumophila* i els trofozoïts d'ambdues soques d'*Acanthamoeba*.
 - c. La producció de co-cultius és una eina útil per a l'estudi de les interrelacions que es produeixen als ecosistemes aquàtics entre protozoous i bacteris.
 - d. S'han estandarditzat les condicions d'assaig per clor, la temperatura i la radiació UV.
2. Per tots els desinfectants utilitzats es van estimar models per descriure'n la cinètica d'inactivació. Mentre que per temperatura i radiació UV la majoria de microorganismes van seguir un model polinomial de primer ordre representat per una línia recta, la inactivació mitjançant el clor va seguir un model exponencial monofàsic.
3. L'eficàcia de cada tractament sobre *Legionella* spp. va variar en funció de les característiques pròpies de cada soca, independentment de l'espècie, el serogrup i el seu origen incloent (ambiental o soca de col·lecció).
 - a. L'eficàcia dels tractaments amb clor lliure aplicats sobre *Legionella*, 0.2 i 0.5 ppm, va resultar ser baixa especialment a 0.2 ppm. Només als tractaments amb 0.5 ppm de clor lliure es va aconseguir reduir 4 logs la concentració de *L. pneumophila* al cap de 6 min.
 - b. Pel que fa a l'eficàcia dels tractaments tèrmics sobre *Legionella* spp., aquesta va resultar ser elevada a temperatures superiors a 55°C. Els tractaments a 55°C durant 15 min o a 60°C durant 5 min van provocar la inactivació de 4 logaritmes de *Legionella* spp.

- c. Les cinc soques de *Legionella* spp. van mostrar ser sensibles a la radiació UV arribant a reduir 4 logs per fluxos superiors a 50 J/m².
 - d. D'entre els tractaments aplicats, l'efecte de la radiació UV va ser el més semblant entre les diferents soques de *Legionella* spp. al contrari que la temperatura que va donar resultats significativament diferents entre soques.
4. Les dues formes de vida d'amebes de vida lliure, trofozoït i cist, van mostrar sensibilitats significativament diferents als tractaments desinfectants aplicats, sent els trofozoïts més sensibles que els cists. La comparació entre gèneres d'amebes de vida lliure va determinar que les dues soques d'*H. vermiformis* presentaven una sensibilitat superior vers els tractaments desinfectants aplicats en comparació amb les dues soques d'*Acanthamoeba*. Fins i tot en alguns casos, els trofozoïts d'*Acanthamoeba* spp. van mostrar un resistència superior als desinfectants que els trofozoïts i els cists d'*H. vermiformis*.
- a. L'eficàcia dels tractaments amb clor lliure a una concentració de 1.2 i 2.5 ppm respectivament, aplicats sobre trofozoïts i cists d'*Acanthamoeba* va mostrar diferències significatives pels dos estats de vida. Mentre que a 1.2 ppm es van reduir 3 logs els trofozoïts d'*A. castellanii* CCAP 1534/2 i a 2.5 ppm es van reduir 3 logs d'ambdós trofozoïts *Acanthamoeba* sp. 155 i *A. castellanii* CCAP 1534/2.
 - b. L'eficàcia del clor lliure sobre els cists d'*Acanthamoeba* spp. va ser molt baixa, ja que no va aconseguir reduir més d'un logaritme de cap de les dues soques utilitzades.
 - c. L'eficàcia dels tractaments tèrmics a 50°C, 60°C i 70°C mostrà diferències significatives entre estats de vida i soques d'amebes de vida lliure especialment a temperatures superiors a 50°C. L'efecte de la temperatura com a biocida sobre trofozoïts i cists d'ambdues soques d'*H. vermiformis* s'observà a 60°C on les reduccions van ser superiors a 3 logs en temps d'exposició breus. En el cas de les soques d'*Acanthamoeba*, va ser necessari augmentar la temperatura fins a 70°C per reduir 3 logaritmes els cists d'*A. castellanii* CCAP 1534/2, sent la soca més resistent.
 - d. L'efecte de la radiació UV sobre amebes de vida lliure va ser molt variable. Els trofozoïts d'*H. vermiformis* es van mostrar significativament sensibles en comparació amb la resta, mentre que les soques de *Acanthamoeba* van ser les més resistents tant a nivell de trofozoïts com de cists.

5. L'associació entre *L. pneumophila* i els trofozoïts *Acanthamoeba* augmentà la resistència del bacteri davant l'exposició a clor lliure així com davant la radiació UV. Pel que fa a les associacions entre *L. pneumophila* i *Acanthamoeba* els resultats apunten a que hi ha diferències significatives entre els dos tipus d'associacions en funció de la soca amebiana utilitzada. Degut al mètode de quantificació utilitzat, aquestes resistències podrien ser inclús superiors a les descrites en aquest treball.
 - a. L'efecte del clor lliure a 0.5, 1.2 i 2.5 ppm no va arribar a reduir 4 logaritmes la concentració de *L. pneumophila* associada a *Acanthamoeba* després de 30 min d'exposició, per tant, l'associació amb amebes de vida lliure va disminuir la susceptibilitat de *L. pneumophila* pel tractaments amb clor lliure. L'efecte de l'associació amb *L. pneumophila* va augmentar la susceptibilitat dels trofozoïts d'*Acanthamoeba* davant el clor lliure, aquest efecte es va observar especialment en el cas d'*Acanthamoeba* sp. 155.
 - b. L'efecte del tractament tèrmic sobre *L. pneumophila* associada a *Acanthamoeba* va ser molt semblant a l'obtingut sobre *Legionella* spp. i amebes de vida lliure en condicions axèniques. L'associació entre *L. pneumophila* i els trofozoïts *Acanthamoeba* augmentà la resistència del bacteri a 50°C i 55°C. Tot i això, una exposició a 60°C durant 5 min va reduir la concentració de *L. pneumophila* associada a trofozoïts 4 logaritmes, al igual que *L. pneumophila* en condicions axèniques.
 - c. L'efecte de la radiació UV sobre *L. pneumophila* associada a *Acanthamoeba* va reduir la susceptibilitat del bacteri per la radiació UV. Tot i així, aquest es va reduir 4 logs a fluxos superiors a 200 J/m².
6. Finalment, per tots els desinfectants utilitzats exceptuant la temperatura, *Legionella* spp. resultà els microorganisme més sensible, i en contraposició els cists d'amebes de vida lliure van ser els més resistents. Mentre que la inactivació de *Legionella* va ser semblant per tots els tractaments, la variabilitat entre espècies d'amebes de vida lliure va resultar molt diferent, sent *Acanthamoeba* significativament més resistent que *H. vermiformis*. Pel que fa als co-cultius, per la majoria de tractaments amb desinfectant, aquests van augmentar la resistència de *Legionella*, demostrant així la importància de les interrelacions que s'estableixen als sistemes de distribució d'aigua de cara al control d'aquest bacteri oportunista. D'acord amb els resultats obtinguts, les normatives actuals sobre la desinfecció de l'aigua de consum respecte *Legionella* s'haurien de revisar.

FINAL CONCLUSIONS

The main objective of this study was to determine the effectiveness of three commonly used drinking water disinfectants, chlorine, temperature and UV radiation. Under the same test conditions, the susceptibility of different strains of *Legionella* spp., amoebae as *Acanthamoeba* spp. and *Hartmannella* either in trophozoite and cyst stages and endosymbionts formed by *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* in front the water disinfectants was analyzed. The conclusions of this work are:

1. To study the effectiveness on the different microorganisms of the three water disinfectants several techniques were implemented:
 - a. A quantification method based on the Most Probable Number technique, for the quantification of the viability of different strains of free-living amoebae was implemented. It has proven to be a useful and easily reproducible method.
 - b. We implemented a technique of FISH (fluorescent *in situ* hybridization) as a tool to monitor the co-cultures realized between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* spp. trophozoites.
 - c. Co-culture production is a useful tool for studying the interactions that occur in the aquatic environments between protozoa and bacteria.
 - d. Test conditions for chlorine, temperature and UV radiation disinfection were standardized.
2. For all disinfectants used, inactivation kinetics models were estimated. While for temperature and UV radiation effect most microorganisms followed a first-order polynomial model represented by a straight line, the inactivation effect of chlorine followed a monophasic exponential model.
3. The effectiveness of each treatment for *Legionella* spp. varied depending on strain characteristics, regardless of the specie, serogroup or origin (environmental or collection strain).
 - a. The effectiveness of chlorine treatments on *L. pneumophila*, at 0.2 and 0.5 ppm, was low, particularly at 0.2 ppm. Only treatments at 0.5 ppm of free chlorine reduced 4 logs *L. pneumophila* concentration after 6 min of exposure.
 - b. The effectiveness of thermal treatments on *Legionella* spp., was significant for temperatures above 55°C. Treatments at 55°C for 15 min or at 60°C for 5 min achieved a 4 log *Legionella* spp inactivation.
 - c. The five strains of *Legionella* spp. were sensitive to UV radiation reaching a 4 logs reduction for fluences higher than 50 J/m².

- d. Among the treatments applied, the effect of UV radiation was more similar between the different *Legionella* spp. strains whereas the effect of temperature was significantly different between strains.
4. The two amoeba life stages, trophozoite and cyst showed significantly different sensitivities to disinfectant treatments applied, being trophozoites more sensitive than cysts. The comparison between free-living amoebae genera showed that *H. vermiformis* strains had a higher sensitivity towards the treatments applied compared with the two *Acanthamoeba* strains. Even, in some of the cases, *Acanthamoeba* spp. trophozoites showed a greater resistance to disinfectants than trophozoites and cysts of *H. vermiformis*.
 - a. The effectiveness of free chlorine at 1.2 and 2.5 ppm , applied on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba* spp. showed significant differences between the two life stages. While at 1.2 ppm, 3 logs of *A. castellanii* CCAP 1534/2 trophozoites were reduced, at 2.5 ppm both *Acanthamoeba* spp trophozoites were 3 logs reduced.
 - b. The effectiveness of free chlorine on *Acanthamoeba* spp. cysts was very low, either at 1.2 and 2.5 ppm cysts were less than 1 log reduced .
 - c. The effectiveness of thermal treatments at 50°C, 60°C and 70°C showed significant differences between life stages and strains of free-living amoebae especially for temperatures above 50°C. The effect of temperature as a biocide on trophozoites and cysts of both *H. vermiformis* strains was observed at 60°C where cell reduction achieved greater than 3 logs at the shortest time stages. In the case of *Acanthamoeba* strains, it was necessary to increase the temperature to 70°C to obtain a 3 log reduction of *A. castellanii* CCAP 1534/2 cysts, being the most resistant strain.
 - d. The effect of UV radiation on free-living amoebae were highly variable. *H. vermiformis* trophozoites were significantly sensitive to UV radiation, while *Acanthamoeba* strains were the most resistant for both life stages trophozoites and cysts.
 5. The association between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* trophozoites increased bacteria resistance against chlorine and UV radiation. However, significant differences between the two types of associations depending on the amoebic strain used. Due to the quantification method used, bacterial resistance could be even higher than those described in this paper.

- a. The effect of free chlorine at 0.5, 1.2 and 2.5 ppm did not achieve a 4 log reduction of *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* after a 30 min exposure with free-chlorine. So, the association with *Acanthamoeba* trophozoites decreased *L. pneumophila* susceptibility to free chlorine. However, in the case of *Acanthamoeba* trophozoites, the simbiotic state increased its susceptibility to free chlorine, especially in the case of *Acanthamoeba* sp. 155.
 - b. The effect of thermal treatment on *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* was very similar to the effect showed for axenic *Legionella* spp. and free-living amoebae. The association between *L. pneumophila* and *Acanthamoeba* trophozoites increased the resistance of the bacteria at 50°C and 55°C. However, an exposure to 60°C for 5 min reduced 4 logs the concentration of *L. pneumophila* associated to trophozoites, as observed for axenic *L. pneumophila*.
 - c. The effect of UV radiation on *L. pneumophila* associated to *Acanthamoeba* reduced the susceptibility of bacteria to UV radiation. However, *L. pneumophila* was reduced 4 logs for fluences higher than 200 J/m².
6. Finally, among the disinfectants used except temperature, *Legionella* spp. was the most sensitive organism, in contrast to cysts of free-living amoebae which were the most resistant. While inactivation of *Legionella* was similar for all treatments, the variability between species of free-living amoebae varied significantly, being *Acanthamoeba* spp. significantly more resistant than *H. vermiformis*. Regarding the co-cultures, the association to *Acanthamoeba* strains increased *L. pneumophila* resistance to the disinfectants used. That fact demonstrates how important the relationships established between microorganisms are in order to control this opportunistic bacteria. According to the results obtained, the current regulations for the disinfection of *Legionella* from drinking water systems should be reviewed.

REFERÈNCIES
REFERENCES

REFERÈNCIES / REFERENCES

Abu Kwaik. Y., Gao. L.Y., Stone. B.J., Venkataraman. C. and Harb. O.S. (1998) Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 64. 3127-3133.

Adl. S.M., Simpson. A.G.B., Lane. C.E., Lukeš. J., Bass. D., Bowser. S.S., Brown. M.W., Burki. F., Dunthorn. M., Hampl. V., Heiss. A., Hoppenrath. M., Lara. E., Gall. L.L., Lynn. D.H., McManus. H., Mitchell. E.A.D., Mozley-Stanridge. S.E., Parfrey. L.W., Pawlowski. J., Rueckert. S., Shadwick. L., Schoch. C.L., Smirnov. A. and Spiegel. F.W. (2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59. 429-493.

Agulló-Barceló. M., Oliva. F. and Lucena. F. (2013) Alternative indicators for monitoring *Cryptosporidium* oocysts in reclaimed water. *Environmental Science and Pollution Research* 20. 4448-4454.

Ahearn. D.G. and Gabriel. M.M. (1997) Contact Lenses. Disinfectants. and *Acanthamoeba* Keratitis. In *Advances in Applied Microbiology* ed. Anonymous pp. 35-56: Academic Press.

Aksozek. A., McClellan. K., Howard. K., Niederkorn. J.Y. and Alizadeh. H. (2002) Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical. chemical. and radiological conditions. *J Parasitol* 88. 621-623.

Albert-Weissenberger. C., Cazalet. C. and Buchrieser. C. (2007) *Legionella pneumophila* - A human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* 64. 432-448.

Albinana-Gimenez. N., Clemente-Casares. P., Bofill-Mas. S., Hundesa. A., Ribas. F. and Girones. R. (2006) Distribution of human polyomaviruses. adenoviruses. and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. *Environmental Science and Technology* 40. 7416-7422.

Allegra. S., Grattard. F., Girardot. F., Riffard. S., Pozzetto. B. and Berthelot. P. (2011) Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against *Legionella* spp. in hospital water systems by using a flow cytometric assay. *Appl Environ Microbiol* 77. 1268-1275.

Altschul. S.F., Gish. W., Miller. W., Myers. E.W. and Lipman. D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215. 403-410.

Amann. R. and Kühl. M. (1998) In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Curr Opin Microbiol* 1. 352-358.

AMB <http://www.amb.cat/web/emma/aigua>. Àrea Metropolitana de Barcelona 2013.

Amer. A.O. and Swanson. M.S. (2005) Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 7. 765-778.

Anand. C.M., Skinner. A.R., Malic. A. and Kurtz. J.B. (1983) Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg* 91. 167-178.

Anonymous (2005) ISO 8199:2005. Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture. *ISO*.

Anonymous (2003) Drinking Water Chlorination. A Review of Disinfection Practices and Issues. *Canadian Chlorine Chemistry Council*.

Anonymous (1998) Water quality-Detection and enumeration of *Legionella*. *ISO 11731:1998*.

Antopol. S.C. and Ellner. P.D. (1979) Susceptibility of *Legionella pneumophila* to ultraviolet radiation. *Appl Environ Microbiol* 38. 347-348.

Aquafine Corporation (2011) <http://www.aquafineuv.com/UVTechnology/UVScience.aspx>. 2013.

Atlas. R.M. (1999) *Legionella*: From environmental habitats to disease pathology. detection and control. *Environ Microbiol* 1. 283-293.

Bargellini. A., Marchesi. I., Righi. E., Ferrari. A., Cencetti. S., Borella. P. and Rovesti. S. (2011) Parameters predictive of *Legionella* contamination in hot water systems: Association with trace elements and heterotrophic plate counts. *Water Res* 45. 2315-2321.

Barker. J. and Brown. M.R.W. (1994) Trojan Horses of the microbial world: Protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140. 1253-1259.

Barker. J., Brown. M.R.W., Collier. P.J., Farrell. I. and Gilbert. P. (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: Physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* 58. 2420-2425.

Barker. J., Lambert. P.A. and Brown. M.R.W. (1993) Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 61. 3503-3510.

Bartram. J., Chartier. Y., Lee. J.V., Pond. K. and Surman-Lee. S. (2007) *Legionella*, and the prevention of legionellosis. *World Health Organization*.

Baumgartner. M., Yapi. A., Gröbner-Ferreira. R. and Stetter. K.O. (2003) Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* n. sp., an extremely thermophilic amoeba thriving in hot springs. *Extremophiles* 7. 267-274.

Behets. J., Declerck. P., Delaedt. Y., Verelst. L. and Ollevier. F. (2007) A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Res* 41. 118-126.

Benson. R.F. and Fields. B.S. (1998) Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* 13. 90-99.

Bentham. R.H. and Broadbent. C.R. (1993) A model for autumn outbreaks of Legionnaires' disease associated with cooling towers. linked to system operation and size. *Epidemiol Infect* 111. 287-295.

Berk. S.G., Ting. R.S., Turner. G.W. and Ashburn. R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 64. 279-286.

- Birtles. R.J., Rowbotham. T.J., Raoult. D. and Harrison. T.G. (1996) Phylogenetic diversity of intra-amoebal *Legionellae* as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Microbiology* 142. 3525-3530.
- BOE (2003a) RD 865/2003 por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. *Boletín Oficial del Estado* 171.
- BOE (2003b) Real Decreto 140/2003. por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *Boletín Oficial del Estado* 45.
- Bofill-Mas. S., Rusinol. M., Fernandez-Cassi. X., Carratala. A., Hundesa. A. and Girones. R. (2013) Quantification of human and animal viruses to differentiate the origin of the fecal contamination present in environmental samples. *Biomed Res Int* 2013. 192089.
- Borella. P., Guerrieri. E., Marchesi. I., Bondi. M. and Messi. P. (2005a) Water ecology of *Legionella* and protozoan: Environmental and public health perspectives. *Biotechnology Annual Review* 11. 355-380.
- Borella. P., Montagna. M.T., Stampi. S., Stancanelli. G., Romano-Spica. V., Triassi. M., Marchesi. I., Bargellini. A., Tatò. D., Napoli. C., Zanetti. F., Leoni. E., Moro. M., Scaltriti. S., Ribera D'Alcalà. G., Santarpia. R. and Boccia. S. (2005c) *Legionella* contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol* 71. 5805-5813.
- Braunstein. J.L., Loge. F.J., Tchobanoglous. G. and Darby. J.L. (1996) Ultraviolet disinfection of filtered activated sludge effluent for reuse applications. *Water Environ Res* 68. 152-161.
- Burch. J.D. and Thomas. K.E. (1998) Water disinfection for developing countries and potential for solar thermal pasteurization. *Solar Energy* 64. 87-97.
- Buse. H.Y. and Ashbolt. N.J. (2012) Counting *Legionella* cells within single amoeba host cells. *Appl Environ Microbiol* 78. 2070-2072.
- Buse. H.Y., Lu. J., Struewing. I.T. and Ashbolt. N.J. (2013) Eukaryotic diversity in premise drinking water using 18S rDNA sequencing: Implications for health risks. *Environmental Science and Pollution Research* 20. 6351-6366.
- Buse. H.Y., Schoen. M.E. and Ashbolt. N.J. (2012) *Legionellae* in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure. *Water Res* 46. 921-933.
- Calgua. B., Fumian. T., Rusiñol. M., Rodriguez-Manzano. J., Mbayed. V.A., Bofill-Mas. S., Miagostovich. M. and Girones. R. (2013) Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water Res* 47. 2797-2810.
- Carter. A.M., Pacha. R.E., Clark. G.W. and Williams. E.A. (1987) Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. *Appl Environ Microbiol* 53. 523-526.
- Cervero-Aragó. S. (2009) Tècniques moleculars per a la detecció de *Legionella pneumophila* lliure o com a endosimbiont de protozoous. *Master Thesis* Universitat de Barcelona.

Chambers. R. and Reznikoff. P. (1926) Micrurgical Studies in Cell Physiology : I. the Action of the Chlorides of Na. K. Ca. and mg on the Protoplasm of *Amoeba Proteus*. *J Gen Physiol* 8. 369-401.

Chang. C.-., Hwang. Y.-., Cheng. W.-. and Chang. C.-. (2007) Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J Appl Microbiol* 102. 1636-1644.

Chang. J.C.H., Ossoff. S.F., Lobe. D.C., Dorfman. M.H., Dumais. C.M., Qualls. R.G. and Johnson. J.D. (1985) UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 49. 1361-1365.

Chang. S.L. (1978) Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol* 35. 368-375.

Chick. H. (1910) The Process of Disinfection by Chemical Agencies and Hot Water. *J Hyg (Lond)* 10. 237-286.

Chomicz. L., Padzik. M., Graczyk. Z., Starosciak. B., Graczyk. T.K., Naprawska. A., Oledzka. G. and Szostakowska. B. (2010) *Acanthamoeba castellanii*: In vitro effects of selected biological, physical and chemical factors. *Exp Parasitol* 126. 103-105.

Clancy. J.L., Marshall. M.M., Hargy. T.M. and Korich. D.G. (2004) Susceptibility of five strains of *Cryptosporidium parvum* oocysts to UV light. *J Am Water Works Assoc* 96. 84-93+12.

Cochran. W.L., McFeters. G.A. and Stewart. P.S. (2000) Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J Appl Microbiol* 88. 22-30.

Codony. F., Álvarez. J., Oliva. J.M., Ciurana. B., Company. M., Camps. N., Torres. J., Minguell. S., Jové. N., Cirera. E., Admetlla. T., Abós. R., Escofet. A., Pedrol. A., Grau. R., Badosa. I. and Vila. G. (2002) Factors promoting colonization by *Legionellae* in residential water distribution systems: An environmental case-control survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21. 717-721.

Consejo de la Unión Europea (1998) Directiva 98/83/CE del Consejo relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L 330/32.

Coohill. T.P. and Sagripanti. J.-. (2008) Overview of the inactivation by 254 nm ultraviolet radiation of bacteria with particular relevance to biodefense. *Photochem Photobiol* 84. 1084-1090.

Cooper. I.R. and Hanlon. G.W. (2010) Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. *J Hosp Infect* 74. 152-159.

Costa. J., da Costa. M.S. and Veríssimo. A. (2010) Colonization of a therapeutic spa with *Legionella* spp: a public health issue. *Res Microbiol* 161. 18-25.

Costán-Longares. A., Mocé-Llivina. L., Avellón. A., Jofre. J. and Lucena. F. (2008) Occurrence and distribution of culturable enteroviruses in wastewater and surface waters of north-eastern Spain. *J Appl Microbiol* 105. 1945-1955.

- Coulon. C., Collignon. A., McDonnell. G. and Thomas. V. (2010) Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol* 48. 2689-2697.
- Craik. S.A., Finch. G.R., Bolton. J.R. and Belosevic. M. (2000) Inactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. *Water Res* 34. 4325-4332.
- D'Auria. G., Jiménez-Hernández. N., Peris-Bondia. F., Moya. A. and Latorre. A. (2010) *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics* 11.
- Davey. K.R. (1990) Equilibrium temperature in a clump of bacteria heated in fluid. *Appl Environ Microbiol* 56. 566-568.
- de Abreu Corrêa. A., Carratala. A., Barardi. C.R.M., Calvo. M., Girones. R. and Bofill-Mas. S. (2012) Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl Environ Microbiol* 78. 6450-6457.
- De Jonckheere. J.F. (2006) Isolation and molecular identification of free-living amoebae of the genus *Naegleria* from Arctic and sub-Antarctic regions. *Eur J Protistol* 42. 115-123.
- De Roda Husman. A.M., Bijkerk. P., Lodder. W., Van Den Berg. H., Pribil. W., Cabaj. A., Gehringer. P., Sommer. R. and Duizer. E. (2004) Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. *Appl Environ Microbiol* 70. 5089-5093.
- Deborde. M. and von Gunten. U. (2008) Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Res* 42. 13-51.
- Declerck. P. (2010) Biofilms: The environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 12. 557-566.
- Declerck. P., Behets. J., Delaedt. Y., Margineanu. A., Lammertyn. E. and Ollevier. F. (2005) Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microb Ecol* 50. 536-549.
- Declerck. P., Behets. J., Margineanu. A., van Hoef. V., De Keersmaecker. B. and Ollevier. F. (2009) Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol Res* 164. 593-603.
- Declerck. P., Behets. J., van Hoef. V. and Ollevier. F. (2007) Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res* 41. 3159-3167.
- Declerck. P., Vanysacker. L., Hulsmans. A., Lambert. N., Liers. S. and Ollevier. F. (2010) Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. *Water Res* 44. 703-710.
- Dennis. P.J., Green. D. and Jones. B.P.C. (1984) A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *J Appl Bacteriol* 56. 349-350.

- Dennis. P.J. and Lee. J.V. (1988) Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J Appl Bacteriol* 65. 135-141.
- Dey. R., Bodennec. J., Mameri. M.O. and Pernin. P. (2009) Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* 290. 10-17.
- Diederén. B.M., de Jong. C.M., Aarts. I., Peeters. M.F. and van der Zee. A. (2007) Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in Dutch tap water installations. *J Water Health* 5. 375-383.
- Dizdaroglu. M. (1992) Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int J Radiat Biol* 61. 175-183.
- Donlan. R.M., Forster. T., Murga. R., Brown. E., Lucas. C., Carpenter. J. and Fields. B. (2005) *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling* 21. 1-7.
- Dupuy. M., Berne. F., Herbelin. P., Binet. M., Berthelot. N., Rodier. M.-., Soreau. S. and Héchar. Y. (2013) Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int J Hyg Environ Health*.
- Dupuy. M., Mazoua. S., Berne. F., Bodet. C., Garrec. N., Herbelin. P., Ménard-Szczebara. F., Oberti. S., Rodier. M.-., Soreau. S., Wallet. F. and Héchar. Y. (2011) Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res* 45. 1087-1094.
- DVGW (2006) UV-Geräte zur Desinfektion in der Wasserversorgung. *Deutsche Vereinigung für das Gas- und Wasserfach. Bonn. Germany* W 294 Teile 1-3.
- ECDC (2013) Legionnaire's disease in Europe 2011. *European Centre for Disease Prevention and Control*.
- Eichler. S., Christen. R., Hölzje. C., Westphal. P., Bötel. J., Brettar. I., Mehling. A. and Höfle. M.G. (2006) Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 72. 1858-1872.
- Feachem. R.G., Hogan. R.C. and Merson. M.H. (1983) Diarrhoeal disease control: Reviews of potential interventions. *Bull World Health Organ* 61. 637-640.
- Fields. B.S., Benson. R.F. and Besser. R.E. (2002) *Legionella* and legionnaires' disease: 25 Years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15. 506-526.
- Fields. B.S., Haupt. T., Davis. J.P., Arduino. M.J., Miller. P.H. and Butler. J.C. (2001) Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: Possible role of bacterial endotoxin. *J Infect Dis* 184. 1289-1292.
- Fisher. I., Kastl. G. and Sathasivan. A. (2012) A suitable model of combined effects of temperature and initial condition on chlorine bulk decay in water distribution systems. *Water Res* 46. 3293-3303.

- Franzin. L., Cabodi. D. and Fantino. C. (2002) Evaluation of the efficacy of ultraviolet irradiation for disinfection of hospital water contaminated by *Legionella*. *J Hosp Infect* 51. 269-274.
- Fritsche. T.R., Horn. M., Wagner. M., Herwig. R.P., Schleifer. K.-. and Gautom. R.K. (2000) Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 66. 2613-2619.
- Fry. N.K., Warwick. S., Saunders. N.A. and Embley. T.M. (1991) The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J Gen Microbiol* 137. 1215-1222.
- Fujita. M., Tanaka. K., Takahashi. H. and Amemura. A. (1994) Transcription of the principal sigma-factor genes. *rpoD* and *rpoS*. in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol Microbiol* 13. 1071-1077.
- Gao. L.-., Susa. M., Ticac. B. and Kwaik. Y.A. (1999) Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microb Pathog* 27. 273-287.
- García. M.T., Jones. S., Pelaz. C., Millar. R.D. and Abu Kwaik. Y. (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* 9. 1267-1277.
- García-Fulgueiras. A., Navarro. C., Fenoll. D., Garcia. J., González-Diego. P., Jiménez-Buñuales. T., Rodríguez. M., Lopez. R., Pacheco. F., Ruiz. J., Segovia. M., Baladrón. B. and Pelaz. C. (2003) Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 9. 915-921.
- Gelman. B.B., Rauf. S.J., Nader. R., Popov. V., Borkowski. J., Chaljub. G., Nauta. H.W. and Visvesvara. G.S. (2001) Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *J Am Med Assoc* 285. 2450-2451.
- Generalitat de Catalunya (2001) Guia per a la prevenció i el control de la legionel·losi. *Quaderns de Salut Pública* 16.
- Goosen. N. and Moolenaar. G.F. (2008) Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair* 7. 353-379.
- Green. P.N. (1993) Efficacy of biocides on laboratory-generated *Legionella* biofilms. *Lett Appl Microbiol* 17. 158-161.
- Greub. G. and Raoult. D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17. 413-433.
- Greub. G. and Raoult. D. (2003) Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmanella vermiformis*. *Res Microbiol* 154. 619-621.
- Griffin. J.L. (1972) Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science* 178. 869-870.

- Halliwell. B. (2007) Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem J* 401. 1-11.
- Harb. O.S., Gao. L.Y. and Abu Kwaik. Y. (2000) From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* 2. 251-265.
- Harm. W., ed. (1980) *Biological effects of ultraviolet radiation*.
- Harrison. T.G. and Taylor. A.G., eds. (1988a) *A Laboratory Manual for Legionella*.
- Harrison. T.G. and Taylor. A.G. (1988b) Timing of seroconversion in Legionnaires' disease. *Lancet* 2. 795.
- Hijnen. W.A.M., Beerendonk. E.F. and Medema. G.J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Res* 40. 3-22.
- Hrubá. L. (2009) The colonization of hot water systems by *Legionella*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 16. 115-119.
- Hsu. B.M., Huang. C.C., Chen. J.S., Chen. N.H. and Huang. J.T. (2011) Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res* 45. 5171-5183.
- Hurvich. C.M. and Tsai. C.L. (1989) Regression and timeseries model selection in small samples. *Biometrika* 76. 297-307.
- Hwang. T.S., Joon. Y.H., Jae. K.S., Reviglio. V.E., Spahr. H.T. and O'Brien. T.P. (2004) Disinfection capacity of PuriLens contact lens cleaning unit against *Acanthamoeba*. *Eye and Contact Lens* 30. 42-43.
- Isberg. R.R., O'Connor. T.J. and Heidtman. M. (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: Making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology* 7. 13-24.
- Jonas. D., Rosenbaum. A., Weyrich. S. and Bhakdi. S. (1995) Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of *Legionellae* in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol* 33. 1247-1252.
- Joseph. C.A., Ricketts. K.D., Yadav. R., Patel. S. and European Working Group for *Legionella* Infections (2010) Travel-associated Legionnaires disease in Europe in 2009. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 15. 19683.
- Khunkitti. W., Lloyd. D., Furr. J.R. and Russell. A.D. (1998) *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J Infect* 36. 43-48.
- Kilvington. S. and White. D.G. (1994) *Acanthamoeba*: Biology, ecology and human disease. *Rev Med Microbiol* 5. 12-20.
- Kim. B.R., Anderson. J.E., Mueller. S.A., Gaines. W.A. and Kendall. A.M. (2002) Literature review - Efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 36. 4433-4444.

- Kirschner. A.K.T., Rameder. A., Schrammel. B., Indra. A., Farnleitner. A.H. and Sommer. R. (2012) Development of a new CARD-FISH protocol for quantification of *Legionella pneumophila* and its application in two hospital cooling towers. *J Appl Microbiol* 112. 1244-1256.
- Knudson. G.B. (1985) Photoreactivation of UV-irradiated *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Appl Environ Microbiol* 49. 975-980.
- Kuchta. J.M., Navratil. J.S., Shepherd. M.E., Wadowsky. R.M., Dowling. J.N., States. S.J. and Yee. R.B. (1993) Impact of Chlorine and Heat on the Survival of *Hartmannella vermiformis* and Subsequent Growth of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 59. 4096-4100.
- Kuiper. M.W., Valster. R.M., Wullings. B.A., Boonstra. H., Smidt. H. and Van Der Kooij. D. (2006) Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 72. 5750-5756.
- Kuiper. M.W., Wullings. B.A., Akkermans. A.D.L., Beumer. R.R. and Van Der Kooij. D. (2004) Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol* 70. 6826-6833.
- Kusnetsov. J.M., Ottoila. E. and Martikainen. P.J. (1996) Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. *J Appl Bacteriol* 81. 341-347.
- Långmark. J., Storey. M.V., Ashbolt. N.J. and Stenström. T.-. (2007) The effects of UV disinfection on distribution pipe biofilm growth and pathogen incidence within the greater Stockholm area. Sweden. *Water Res* 41. 3327-3336.
- Lasheras. A., Boulestreau. H., Rogues. A.-., Ohayon-Courtes. C., Labadie. J.-. and Gachie. J.-. (2006) Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* 34. 520-525.
- Lau. H.Y. and Ashbolt. N.J. (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: Implications for drinking water. *J Appl Microbiol* 107. 368-378.
- LeChevallier. M.W. and Au. K. (2004) Water Treatment and Pathogen Control. Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water. *WHO. IWA Publishing*.
- Lifshitz. Z., Burstein. D., Peeri. M., Zusman. T., Schwartz. K., Shuman. H.A., Pupko. T. and Segal. G. (2013) Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110. E707-E715.
- Lin. Y.-E., Stout. J.E., Yu. V.L. and Vidic. R.D. (1998) Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Semin Respir Infect* 13. 147-159.
- Lindahl. T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362. 709-715.
- Liu. R., Yu. Z., Guo. H., Liu. M., Zhang. H. and Yang. M. (2012) Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. *Sci Total Environ* 435-436. 124-131.

- Liu. Z., Stout. J.E., Tedesco. L., Boldin. M., Hwang. C. and Yu. V.L. (1995) Efficacy of ultraviolet light in preventing *Legionella* colonization of a hospital water distribution system. *Water Res* 29. 2275-2280.
- Lloyd. D., Turner. N.A., Khunkitti. W., Hann. A.C., Furr. J.R. and Russell. A.D. (2001) Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: Development of biocide resistance. *J Eukaryot Microbiol* 48. 11-16.
- Lofrano. G. and Brown. J. (2010) Wastewater management through the ages: a history of mankind. *Sci Total Environ* 408. 5254-5264.
- López-Ochoterena. E. and Serrano-Limón. G. (1991) Manual de técnicas protozoológicas. *Universidad Autónoma de Tlaxcala*. 80.
- Lorenzo-Morales. J., Martín-Navarro. C.M., López-Arencibia. A., Arnalich-Montiel. F., Piñero. J.E. and Valladares. B. (2013) *Acanthamoeba* keratitis: An emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol* 29. 181-187.
- Loret. J.F. and Greub. G. (2010) Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health* 213. 167-175.
- Loret. J.F., Robert. S., Thomas. V., Cooper. A.J., McCoy. W.F. and Lévi. Y. (2005) Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *Journal of water and health*. 3. 423-433.
- Loy. A., Horn. M. and Wagner. M. (2003) ProbeBase: An online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 31. 514-516.
- Lück. P.C., Leupold. I., Hlawitschka. M., Helbig. J.H., Carmienke. I., Jatzwauk. L. and Guderitz. T. (1993) Prevalence of *Legionella* species, serogroups, and monoclonal subgroups in hot water systems in south-eastern Germany. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 193. 450-460.
- Ludwig. I.H., Meisler. D.M., Rutherford. I., Bican. F.E., Langston. R.H. and Visvesvara. G.S. (1986) Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27. 626-628.
- Maciver. S. <http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/amoebae.htm>.
- Marchesi. I., Marchegiano. P., Bargellini. A., Cencetti. S., Frezza. G., Miselli. M. and Borella. P. (2011) Effectiveness of different methods to control *Legionella* in the water supply: Ten-year experience in an Italian university hospital. *J Hosp Infect* 77. 47-51.
- Marciano-Cabral. F. (2003) Advances in Free-living Amebae Research 2003: Workshop Summary. *J Eukaryot Microbiol* 50. 507.
- Martinez. A.J. and Visvesvara. G.S. (1997) Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathology* 7. 583-598.
- Mathers. W.D., Sutphin. J.E., Folberg. R., Meier. P.A., Wenzel. R.P. and Elgin. R.G. (1996) Outbreak of keratitis presumed to be caused by *Acanthamoeba*. *Am J Ophthalmol* 121. 129-142.

- Maya. C., Beltrán. N., Jiménez. B. and Bonilla. P. (2003) Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoebae inactivation. *Water Science and Technology: Water Supply* 3. 285-291.
- Mercer. K. (2008) Beyond the scope of standardization: biofilm and *Acanthamoeba* contamination. *PDA J Pharm Sci Technol* 62. 82-4.
- Meulemans. C.C.E. (1986) BASIC PRINCIPLES OF UV-DISINFECTION OF WATER. *Ozone: Science and Engineering* 9.
- Miuetzner. S., Schwille. R.C., Farley. A., Wald. E.R., Ge. J.H., States. S.J., Libert. T. and Wadowsky. R.M. (1997) Efficacy of thermal treatment and copper-silver ionization for controlling *Legionella pneumophila* in high-volume hot water plumbing systems in hospitals. *Am J Infect Control* 25. 452-457.
- Moffat. J.F. and Tompkins. L.S. (1992) A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 60. 296-301.
- Mogoia. E., Bodet. C., Legube. B. and Héchard. Y. (2010) *Acanthamoeba castellanii*: Cellular changes induced by chlorination. *Exp Parasitol* 126. 97-102.
- Mogoia. E., Bodet. C., Morel. F., Rodier. M.-., Legube. B. and Héchard. Y. (2011) Cellular response of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* to chlorine. chlorine dioxide. and monochloramine treatments. *Appl Environ Microbiol* 77. 4974-4980.
- Molin. S. and Tolker-Nielsen. T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 14. 255-261.
- Molofsky. A.B. and Swanson. M.S. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* 53. 29-40.
- Mouchtouri. V., Velonakis. E., Tsakalof. A., Kapoula. C., Goutziana. G., Vatopoulos. A., Kremastinou. J. and Hadjichristodoulou. C. (2007) Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by *Legionella* species. *Appl Environ Microbiol* 73. 1489-1492.
- Müller. A., Hacker. J. and Brand. B.C. (1996) Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infect Immun* 64. 4900-4906.
- Munakata. T., Ishikawa. E., Kinoshita. I. and Kasuya. T. (1991) Scanning photoelectron spectromicroscope based on coherent vacuum ultraviolet radiation. *Rev Sci Instrum* 62. 2572-2578.
- Muraca. P., Stout. J.E. and Yu. V.L. (1987) Comparative assessment of chlorine. heat. ozone. and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol* 53. 447-453.
- Nguyen. T.M.N., Ilef. D., Jarraud. S., Rouil. L., Campese. C., Che. D., Haeghebaert. S., Ganiayre. F., Marcel. F., Etienne. J. and Desenclos. J.-. (2006) A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers - How far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis* 193. 102-111.

Niquette. P., Servais. P. and Savoie. R. (2001) Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Water Res* 35. 675-682.

Norton. C.D., LeChevallier. M.W. and Falkinham III. J.O. (2004) Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water Res* 38. 1457-1466.

Oguma. K., Katayama. H. and Ohgaki. S. (2004) Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp. *Water Res* 38. 2757-2763.

ÖNORM (2003) M 5873-2E . Plants for disinfection of water using ultraviolet radiation: requirements and testing. Part 2: Medium pressure mercury lamp plants. *Austrian National Standard. Vienna. Austria.*

ÖNORM (2001) M 5873-1 E. Plants for disinfection of water using ultraviolet radiation: requirements and testing. Part 1: Low pressure mercury lamp plants. *Austrian National Standard. Vienna. Austria.*

Patrizia. M., Annalisa. B., Immacolata. A., Isabella. M., De Niederhäusern. S. and Moreno. B. (2013) Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different serogroups. *Arch Microbiol* 195. 89-96.

Pereira. V.J., Marques. R., Marques. M., Benoliel. M.J. and Barreto Crespo. M.T. (2013) Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. *Water Res* 47. 517-523.

Pierce. B.A., ed. (2005) *Genetics: A Conceptual Approach.*

Poologanathan Keerthan. M.M. (2013) Thermal Performance of Composite Panels Under Fire Conditions Using Numerical Studies: Plasterboards. Rockwool. Glass Fibre and Cellulose Insulations. *Fire Technology* 49. 329-356.

Pumidonming. W., Koehsler. M. and Walochnik. J. (2010) *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitol Res* 106. 553-559.

Pussard. M. (1977) Taxonomy of free living amebae of medical interest. *G Mal Infect Parasit* 29. 668-679.

Qualls. R.G. and Donald Johnson. J. (1983) Bioassay and dose measurements in UV disinfection. *Appl Environ Microbiol* 45. 872-877.

Qvarnstrom. Y., Da Silva. A.J., Schuster. F.L., Gelman. B.B. and Visvesvara. G.S. (2009) Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 199. 1139-1142.

Qvarnstrom. Y., Visvesvara. G.S., Sriram. R. and da Silva. A.J. (2006) Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol* 44. 3589-3595.

Ramaley. R.F., Scanlan. P.L. and O'Dell. W.D. (2001) Presence of Thermophilic *Naegleria* Isolates in the Yellowstone and Gran Teton National Parks. In *Thermophiles: Biodiversity. Ecology and Evolution.* ed. Edited by Reysenbach et al. . New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- Rastogi. R.P., Richa. Kumar. A., Tyagi. M.B. and Sinha. R.P. (2010) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids* 2010.
- Regan. J.M., Harrington. G.W., Baribeau. H., De Leon. R. and Noguera. D.R. (2003) Diversity of nitrifying bacteria in full-scale chloraminated distribution systems. *Water Res* 37. 197-205.
- Richardson. S.D. and Ternes. T.A. (2005) Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 77. 3807-3838.
- Rodríguez. S. and Araujo. R. (2012) Effect of environmental parameters on the inactivation of the waterborne pathogen *Campylobacter* in a Mediterranean river. *Journal of Water and Health* 10. 100-107.
- Rodriguez-Zaragoza. S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 20. 225-241.
- Rohr. U., Weber. S., Michel. R., Selenka. F. and Wilhelm. M. (1998) Comparison of Free-Living Amoebae in Hot Water Systems of Hospitals with Isolates from Moist Sanitary Areas by Identifying Genera and Determining Temperature Tolerance. *Appl Environ Microbiol* 64. 1822-1824.
- Rowbotham. T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33. 1179-1183.
- Rusiñol. M., Carratalà. A., Hundesa. A., Bach. A., Kern. A., Vantarakis. A., Girones. R. and Bofill-Mas. S. (2013) Description of a novel viral tool to identify and quantify ovine faecal pollution in the environment. *Sci Total Environ* 458-460. 355-360.
- Sabria. M. and Yu. V.L. (2002) Hospital-acquired legionellosis: Solutions for a preventable infection. *Lancet Infectious Diseases* 2. 368-373.
- Saby. S., Vidal. A. and Suty. H. (2005) Resistance of *Legionella* to disinfection in hot water distribution systems. *Water Science and Technology* 52. 15-28.
- Sanden. G.N., Morrill. W.E., Fields. B.S., Breiman. R.F. and Barbaree. J.M. (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of *Legionellae* by the culture method. *Appl Environ Microbiol* 58. 2001-2004.
- Schmitz-Esser. S., Toenshoff. E.R., Haider. S., Heinz. E., Hoenninger. V.M., Wagner. M. and Horn. M. (2008) Diversity of bacterial endosymbionts of environmental *Acanthamoeba* isolates. *Appl Environ Microbiol* 74. 5822-5831.
- Schuster. F.L. and Visvesvara. G.S. (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34. 1001-1027.
- Schwartz. T., Hoffmann. S. and Obst. U. (2003) Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *J Appl Microbiol* 95. 591-601.
- Serrano-Suárez. A. (2009) Relación de *Legionella* spp. con parámetros microbiológicos y físicoquímicos en aguas. .

Serrano-Suarez. A., Dellunde. J., Salvado. H., Cervero-Arago. S., Mendez. J., Canals. O., Blanco. S., Arcas. A. and Araujo. R. (2013) Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. *Environ Sci Pollut Res Int* 20. 5534-5544.

Siddiqui. R., Ortega-Rivas. A. and Khan. N.A. (2008) *Balamuthia mandrillaris* resistance to hostile conditions. *J Med Microbiol* 57. 428-431.

Smirnov. A.V. and Michel. R. (1999) New data on the cyst structure of *Hartmannella vermiformis* Page. 1967 (Lobosea, Gymnamoebia). *Protistology* 1 (2). 82-85.

Snowball. M.R. and Hornsey. I.S., eds. (1988) *Purification of water supplies by using ultraviolet light*.

Sobsey. M.D. (2006) Drinking water and health research: a look to the future in the United States and globally. *J Water Health* 4 Suppl 1. 17-21.

Sommer. R., Cabaj. A., Hirschmann. G. and Haider. T. (2008) Disinfection of drinking water by UV irradiation: Basic principles - Specific requirements - International implementations. *Ozone: Science and Engineering* 30. 43-48.

Sommer. R., Cabaj. A., Schoenen. D., Gebel. J., Kolch. A., Havelaar. A.H. and Schets. F.M. (1995) Comparison of three laboratory devices for UV-inactivation of microorganisms. *Water Science and Technology* 31. 147-156.

Sommer. R., Lhotsky. M., Haider. T. and Cabaj. A. (2000) UV inactivation. liquid-holding recovery. and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. *J Food Prot* 63. 1015-1020.

Sommer. R., Weber. G., Cabaj. A., Wekerle. J., Keck. G. and Schauberge r. G. (1989) UV-Inactivation of microorganisms in water. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 189. 214-224.

Spinks. A.T., Dunstan. R.H., Harrison. T., Coombes. P. and Kuczera. G. (2006) Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Res* 40. 1326-1332.

Steele. T.W., Moore. C.V. and Sangster. N. (1990) Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *Legionellae* in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol* 56. 2984-2988.

Steinert. M., Hentschel. U. and Hacker. J. (2002) *Legionella pneumophila*: An aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* 26. 149-162.

Stewart. P.S., Rayner. J., Roe. F. and Rees. W.M. (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol* 91. 525-532.

Storey. M.V., Winiecka-Krusnell. J., Ashbolt. N.J. and Stenström. T.-. (2004a) The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* 36. 656-662.

Stothard. D.R., Schroeder-Diedrich. J.M., Awwad. M.H., Gast. R.J., Ledee. D.R., Rodriguez-Zaragoza. S., Dean. C.L., Fuerst. P.A. and Byers. T.J. (1998) The evolutionary history of the

genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 45. 45-54.

Stout. J.E., Best. M.G. and Yu. V.L. (1986) Susceptibility of members of the family *Legionellaceae* to thermal stress: Implications for heat eradication methods in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 52. 396-399.

Stout. J.E., Lin. Y.-E., Goetz. A.M. and Muder. R.R. (1998) Controlling *Legionella* in hospital water systems: Experience with the superheat-and-flush method and copper-silver ionization. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 19. 911-914.

Stout. J.E. and Yu. V.L. (1997) Legionellosis. *N Engl J Med* 337. 682-687.

Straus. W.L., Plouffe. J.F., File Jr., T.M., Lipman. H.B., Hackman. B.H., Salstrom. S.-, Benson. R.F. and Breiman. R.F. (1996) Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. *Arch Intern Med* 156. 1685-1692.

Swanson. M.S. and Hammer. B.K. (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: A fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology* 54. 567-613.

Szewzyk. U., Szewzyk. R., Manz. W. and Schleifer. K.-. (2000) Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology* 54. 81-127.

Taylor. M., Ross. K. and Bentham. R. (2009) *Legionella*, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* 58. 538-547.

Thomas. J.M. and Ashbolt. N.J. (2011) Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ Sci Technol* 45. 860-869.

Thomas. V., Bouchez. T., Nicolas. V., Robert. S., Loret. J.F. and Levi. Y. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* 97. 950-963.

Thomas. V., Herrera-Rimann. K., Blanc. D.S. and Greub. G. (2006a) Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* 72. 2428-2438.

Thomas. V., Loret. J.F., Jousset. M. and Greub. G. (2008) Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* 10. 2728-2745.

Thomas. V., McDonnell. G., Denyer. S.P. and Maillard. J.-. (2010) Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* 34. 231-259.

Trabelsi. H., Dendana. F., Sellami. A., Sellami. H., Cheikhrouhou. F., Neji. S., Makni. F. and Ayadi. A. (2012) Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie* 60. 399-405.

Turner. N.A., Russell. A.D., Furr. J.R. and Lloyd. D. (2000) Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Antimicrob Chemother* 46. 27-34.

Upadhyay. J.M., Crow. S. and Cox. A. (1984) The cyst wall composition of *Hartmannella glabra*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 175. 424-428.

USEPA (2009) Water on Tap. What you need to know. *US Environmental Protection Agency*.

USEPA (2007) Long-Term Effects of Disinfection Changes on Water Quality. *Awwa Research Foundation and USEPA*.

USEPA (2006) Ultraviolet Disinfection Guidance Manual for the Final Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule . *US Environmental Protection Agency*.

USEPA (2000) The History of Drinking Water Treatment. *US Environmental Protection Agency*.

USEPA. ed. (1989) *Drinking Water; National Primary Drinking Water Regulation; Final Rule*.

Valko. M., Rhodes. C.J., Moncol. J., Izakovic. M. and Mazur. M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160. 1-40.

Van Eys. G.J., Gravekamp. C., Gerritsen. M.J., Quint. W., Cornelissen. M.T., Schegget. J.T. and Terpstra. W.J. (1989) Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27. 2258-2262.

Vaz-Moreira. I., Egas. C., Nunes. O.C. and Manaia. C.M. (2013) Bacterial diversity from the source to the tap: a comparative study based on 16S rRNA gene-DGGE and culture-dependent methods. *FEMS Microbiol Ecol* 83. 361-374.

Velonakis. E.N., Kiouisi. I.M., Koutis. C., Papadogiannakis. E., Babatsikou. F. and Vatopoulos. A. (2010) First isolation of *Legionella* species, including *L. pneumophila* serogroup 1, in Greek potted soils: possible importance for public health. *Clin Microbiol Infect* 16. 763-766.

Visvesvara. G.S., Moura. H. and Schuster. F.L. (2007) Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50. 1-26.

Vuorinen. H.S., Juuti. P.S. and Katko. T.S. (2007) History of water and health from ancient civilizations to modern times. *Water Science and Technology: Water Supply* 7. 49-57.

Wadowsky. R.M., Yee. R.B., Mezmar. L., Wing. E.J. and Dowling. J.N. (1982) Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and nonhospital plumbing fixtures. *Appl Environ Microbiol* 43. 1104-1110.

Wagner. M., Hornt. M. and Daims. H. (2003) Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 6. 302-309.

Walochnik. J., Obwaller. A. and Aspöck. H. (2000) Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 66. 4408-4413.

Walochnik. J., Wylezich. C. and Michel. R. (2010) The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. *Exp Parasitol* 126. 4-13.

- WHO. ed. (2011) *Guidelines for drinking-water quality. fourth edition*. Geneva. Switzerland: World Health Organization.
- WHO (2008) Guidelines for Drinking-Water Quality. *World Health Organization* 3rd Edition.
- WHO (2006) Health Aspects of Plumbing. *World Health Organization and World Plumbing Council*.
- WHO and OECD (2003) Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Improving Approaches and Methods. *IWA Publishing*.
- Wimpenny. J., Manz. W. and Szewzyk. U. (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24. 661-671.
- Winiiecka-Krusnell. J. and Linder. E. (1999) Free-living amoebae protecting *Legionella* in water: the tip of an iceberg? *Scand J Infect Dis* 31. 383-385.
- Wright. J.B., Ruseska. I. and Costerton. J.W. (1991) Decreased biocide susceptibility of adherent *Legionella pneumophila*. *J Appl Bacteriol* 71. 531-538.
- Yabuchi. E., Wang. L., Yamayoshi. T., Arakawa. M. and Yano. I. (1995) Bactericidal effect of chlorine on strains of *Legionella* species. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 69. 151-157.
- Zeng. D.N., Fan. Z.Y., Chi. L., Wang. X., Qu. W.D. and Quan. Z.X. (2013) Analysis of the bacterial communities associated with different drinking water treatment processes. *World J Microbiol Biotechnol*.
- Zhang. Y. and Edwards. M. (2009) Accelerated chloramine decay and microbial growth by nitrification in premise plumbing. *J Am Water Works Assoc* 101. 51-62.

ANNEX

ANNEX, DETAILS OF REAGENTS AND MATERIAL USED
i. CULTURE MEDIA**- Legionella culture media**

- Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar medium supplemented with GVPC.

***Legionella* BCYE Agar Base** (Oxoid, Ref: CM0655)

Activated charcoal	2.0 g/L
Yeast extract	10.0 g/L
Agar	13.0 g/L

Suspend 12.5g of Legionella CYE Agar Base per 500 mL of distilled water and bring gently to the boil to dissolve completely. Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

***Legionella* BCYE Growth Supplement** (Oxoid, Ref: SRO110C)

Buffer/potassium hydroxide	5.0 g/500mL
Ferric pyrophosphate	0.125 g/500mL
L-cysteina HCl	0.20 g/500mL
α -ketoglutarate	0.50 g/500mL

Reconstitute one vial SR0110C with 100 mL of distilled water per 500mL medium, as directed. Allow medium to cool to 50°C and aseptically add the vial contents. Mix gently and pour into sterile Petri dishes. The final pH of the medium should be 6.9 ± 0.2 .

***Legionella* (GVPC) Selective Supplement** (Oxoid, Ref: SRO152E).

Glycine (Amonia free)	1.5 g/500mL
Polymyxin B SO ₄	40,000 IU
Vancomycina hydrochloride	0.5 mg/500mL
Cycloheximide	40.0 mg/500mL

Reconstitute one vial as directed; aseptically add the contents to 500 ml of sterile *Legionella* CYE Agar Base CM0655 to which one vial of *Legionella* BCYEa *Legionella* Growth Supplement SR0110C has been added cooled to approximately 50°C. Mix gently and pour into sterile Petri dishes.

- BCYE without L-cysteine

***Legionella* BCYE Growth Supplement without L-cysteine** (Oxoid, Ref: SR175A):

Reconstitute one vial SR0110C with 100 mL of distilled water per 500mL medium, as directed. Allow medium to cool to 50°C and aseptically add the vial contents. Mix gently and pour into sterile Petri dishes. The final pH of the medium should be 6.9 ± 0.2 .

- **FLA culture media**

- **Non-Nutrient Agar (NNA)**

NaCl	1.5 %	(5 g)
Agar	5%	(15 g)
Distilled water	1 L	

Sterilize by autoclave, plated and stored at 4°C for further uses.

- **Proteose Yeast Peptone Glucose media (PYG, ATCC 1034)**

Prepare, filter (syringe 0.22µm) and sterilize separately each of the following components:

0.4 M MgSO ₄ · 7H ₂ O	9.86 g/100mL
0.05 M CaCl ₂	0.56 g/100mL
0.1 M Sodium citrate · 2H ₂ O	2.94 g/100mL
0.005 M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	0.196 g/100mL
0.25 M Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	3.549 g/100mL
0.25 M KH ₂ PO ₄	3.402 g/100mL

Basal medium:

Peptone	20 g
Yeast extract	1 g
Distilled water	900 mL

Sterilized the basal medium at the autoclave and let it cool down. Once at room temperature add separately. Before autoclaved it again, adjust pH at 6.5.

0.4 M MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 mL
0.05 M CaCl ₂	8 mL
0.1 M Sodium citrate · 2H ₂ O	34 mL
0.005 M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	10 mL
0.25 M Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	10 mL
0.25 M KH ₂ PO ₄	10 mL

Store the final medium in small bottles with 95 mL. Before use add aseptically 5mL of glucose 2M (36 g/100mL) previously sterilized by filtration.

- **Other culture media used**

- o Nutrient Broth for *E. coli* cultures

Nutrient Broth N° 2b (Oxoid) 25 g

Lab-Lemco powder 10 g

Peptone 10 g

NaCl 5 g

Distilled water 1 L

Sterilize by autoclave and store at 4°C for further uses.

ii. DETAILS OF PROTOCOLS AND REAGENTS USED FOR MOLECULAR METHODS

- **Legionella detection by PCR and Semi-Nested PCR**

Details of the primers used for *Legionella* detection, orientation, sequence and amplicon size.

Table i.1. Characteristics of PCR primers used to perform PCR classic and "Semi-Nested" for the detection of *Legionella* spp (Jonas *et al.* 1995, Serrano-Suárez *et al.* 2013).

Primer	Orientation	Position	Sequence	Amplicon size
JRP	Rev.	836-817	5'-CCAACAGCTAGTTGACATCG-3'	386bp
JFP	Fwd.	451-470	5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3'	
ASR	Rev.	655-635	5'-TTCCACTACCCTCTCCATA-3'	234bp

- **Legionella PCR and Semi-Nested PCR Reagents**

Details of the reagents used, concentration and volumes.

Table i.2. Reagents and concentrations to perform *Legionella* spp. PCR and Semi-Nested PCR (Jonas *et al.* 1995, Serrano-Suárez *et al.* 2013).

Reagents	Initial concentration	Final concentration	Volume (μL)	
			Classic	Nested
Buffer II 10X Applied Biosystems	10X	1X	5	
MgCl₂ 25mM Applied Biosystems	2.5 mM	1.5 mM	3	
dNTPs 10mM Applied Biosystems	2 mM	0.2 mM	5	
Primers (10 μM) Biomers	10 μM	1 μM	5	
AmpliTaq DNA polymerase Applied Biosystems	5 U/ μL	2 U/ μL	0.40	
H₂O Ultrapure GIBCO™			16.6	25.6
Sample			10	1
Total Volume			50 μL	

- **Thermal program followed for Legionella PCR and Semi-Nested PCR**

Thermal profile of the reactions:

Classical PCR

- Initial denaturation 95°C 5 min
 - Denaturation 94°C 1 min
 - Hybridization 57°C 1.5 min
 - Elongation 72°C 1 min
- } 40 cycles
- Final extension 72°C 10 min
 - Hold 4°C

PCR reaction takes approximately 3h and 20 min.

Semi-Nested PCR

It follows the same thermocycler program as the classical PCR but with 35 cycles instead of 40. PCR reaction takes approximately 3h.

- **Legionella spp. quantification by qPCR**

Details of the primers and probe for the quantification of *Legionella* spp.

Table i.3. Characteristics of primers and probe used to perform a qPCR for the quantification of *Legionella* spp (Declerck *et al.* 2007).

Primer	Orient.	Sequence
Leg F	Fwd.	5'-CTAATTGGCTGATTGTCTTGAC-3'
Leg R	Rev.	5'-GGCGATGACCTACTTTTCG-3'
Leg-probe		5'-VIC-CGAACTCAGAAGTGAAAC-MGB-3'

- **Legionella spp. qPCR Reagents**

Details of the reagents used, concentration and volumes

Table i.4. Reagents and concentrations to perform *Legionella* spp. qPCR (Declerck *et al.* 2007, Cervero-Aragó 2009).

Reagents	Initial concentration	Concentració final	Volume (25µL)
Master Mix Applied Biosystems	2X	1X	12.5
Primer Mip-F1 Biomers	10µM	0.9µM	2.25
Primer Mip-R1 Biomers	10µM	0.9µM	2.25
Taqman probe Biomers	10µM	0.2µM	0.5
H ₂ O Ultrapure GIBCO™			2.5
Sample			5
Total volume			25 µL

- **Thermal profile Legionella spp. qPCR Reagents**

Thermal profile of the reactions:

- Uracil-DNA Glycosylase (UDG), 50°C 2 min
 - Initial denaturation 95°C 10 min
 - Denaturation 95°C 15 s
 - Hybridization 55°C 20 s
 - Elongation 60°C 40 s
- } 45 cycles

- **Legionella pneumophila quantification by qPCR**

Details of the primers and probe for the quantification of *L. pneumophila*.

Table i.4. Characteristics of primers and probe used to perform a qPCR for the quantification of *L. pneumophila* (Diederer *et al.* 2007, Cervero-Aragó 2009).

Primer	Orient.	Sequence
Mip-F1	Fwd.	5'-GCCAAGTGGTTTGCAATACCCC-3'
Mip-R1	Rev.	5'-CTCGACAGTGACTGTATCCGATTT-3'
Probe Lpn-mip		FAM-5'-TAATCAATGCTGGAAATGGTGTAAACCCG-3'-TAMRA

- **L. pneumophila qPCR Reagents**

Details of the reagents used, concentration and volumes

Table i.5. Reagents and concentrations to perform *L. pneumophila* qPCR (Diederer *et al.* 2007, Cervero-Aragó 2009).

Reagents	Initial concentration	Concentració final	Volume (25µL)
Master Mix Applied Biosystems	2X	1X	12.5
Primer Mip-F1 Biomers	10µM	0.2µM	0.5
Primer Mip-R1 Biomers	10µM	0.3µM	0.75
Taqman probe Biomers	1µM	0.15µM	3.75
H₂O Ultrapure GIBCO™			2.5
Sample			5
Total volume			25 µL

- **Thermal profile L. pneumophila qPCR Reagents**

Thermal profile of the reactions:

- Uracil-DNA Glycosylase (UDG), 50°C 2 min
 - Initial denaturation 95°C 10 min
 - Denaturation 95°C 15 s
 - Hybridization 57°C 30 s
 - Elongation 60°C 30 s
- } 50 cycles

- **Free-living amoeba PCR**

Details of the primers used for FLA detection, orientation, sequence and amplicon size.

Table i.5. Characteristics of PCR primers used for FLA detection (Thomas *et al.* 2006, Serrano-Suárez 2009).

Primer	Orientation	Sequence	Amplicon size
Ami6F1	Fwd	CCAGCTCCAATAGCGTATATT	
Ami6F2	Fwd	CCAGCTCCAAGAGTGTATATT	
Ami6-deg	Fwd	CCAGCTCCA A KAGYGTATATT	618 bp
Ami9R	Rev	GCGGCTTAATTTGACTCAAC	

- **FLA PCR Reagents**

Details of the reagents used, concentration and volumes.

Table i.6. Reagents and concentrations to perform FLA PCR (Thomas *et al.* 2006, Serrano-Suárez 2009).

Reagents	Initial concentration	Final concentration	Volume (µL)
Buffer II 10X Applied Biosystems	10X	1X	5
MgCl₂ 25mM Applied Biosystems	2.5mM	2mM	4
dNTPs 10mM Applied Biosystems	2mM	0.2mM	5
Primers (10 µM) Biomers	10µM	0.5µM	2.5
AmpliTaq DNA polymerase Applied Biosystems	5 U/µL	2.5 U/µL	0.5
H₂O Ultrapure GIBCO™			20.5
Sample			10
Total Volume			50 µL

- **Thermal program followed for FLA PCR**

Thermal profile of the reactions:

- Initial denaturation 94°C 5 min
 - Denaturation 94°C 1 min
 - Hybridization 55°C 30 s
 - Elongation 72°C 2 min
 - Final extension 72°C 10 min
 - Hold 4°C
- } 40 cycles

- **Visualization of PCR products**

Ten microliters of the amplified PCR product were run (100 V) on 2 % agarose gel and stained with ethidium bromide for 15 min.

- **Legionella and FLA DNA sequencing protocol**

The protocol followed for Legionella and FLA DNA sequencing were as follows.

Mix:

- 1 mL of Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit from Applied Biosystems (USA).
- 0.5 µL of primer (at an initial concentration of 1 µM)
- 1-3 µL of purified PCR product (depending on intensity observed in the band)
- The volume of water necessary to reach a final volume of 10 µl. Eg. in the case of adding 3 µL of purified product, 5.5 µL of water was added.

Conditions of the amplification reaction:

- Initial denaturation 96 °C 2 min
 - Denaturation 96 °C 10 s
 - Annealing 50 °C 5 s
 - Extension 60 °C 4 min
- } 25 cycles

The amplicons were then maintained at 4°C and sequenced by Genomic Unit at Serveis Científic-Tècnics of the Universitat de Barcelona (SCT-UB) located at the Parc Científic de Barcelona.

- **Other reagents used for Legionella and FLA identification by using molecular methods**

- TBE 10X

Tris Base 108 g

EDTA 9.3 g

Boric Acid 55 g

Distilled water 1 L

Sterilize by autoclave

- TBE 1X

TBE 10X 100 mL

Deionized water (sterile) 900 mL

- Elution Buffer (TE)

10mM Tris

0.1mM EDTA

- Agarose

“Agarose medium standard EEO”, Ecogen (Ref: AG-220)

- Molecular weight marker and Loading Buffer

The molecular weight marker used was (5 μ L) Φ X174DNA/HaeIII from Promega (Ref: G1761) and (3 μ L) of the loading buffer Blue/Orange 6X Loading Dye (Ref: G190A).

iii. **PROTOCOLS AND REAGENTS FOR DISINFECTION STUDIES**

- **Buffers for dialysis bags preparation**

- Washing Buffer

Na₂CO₃ 20 g

EDTA 0.2 M 5 mL

Distilled water 995 mL

Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes

- EDTA Buffer

EDTA 0.2 M 5 mL

Distilled water 995 mL

Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes

To ensure that all dialysis bags has an uniform pore size of 14 kDa, bags were boiled for 10 min with the Washing Buffer. Then, several washes were performed with distilled water and bags were boiled again for 10 min with the EDTA buffer. Bags were the stored with the same EDTA Buffer at 4°C for maximum of one month.

- **Other Buffers**

- Ringer ¼ (Scharlab)

Ringer powder 2.5 g

Distilled water 1L

Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

- Ringer 1/40

Ringer ¼ 100 mL

Distilled water 900 mL

Sterilise by autoclaving at 121°C for 15 minutes.