



Facultat de Biologia

Departament de Microbiologia

**Detecció i anàlisi de la persistència de les bifidobactèries en aigües per a la
determinació de l'origen de la contaminació fecal mitjançant tècniques de
cultiu i mètodes moleculars qualitatiu i quantitatiu**

Xavier Bonjoch Fornos

Tesis Doctoral

Barcelona, desembre 2004



Facultat de Biologia

Departament de Microbiologia

**Detecció i anàlisi de la persistència de les bifidobactèries en aigües per
a la determinació de l'origen de la contaminació fecal mitjançant
tècniques de cultiu i mètodes moleculars qualitatiu i quantitatiu**

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia (2001-2003)

Conformitat del Director de tesis,

Memòria presentada per Xavier
Bonjoch Fornos per optar al títol de
Doctor en Biologia.

Dr. Anicet R. Blanch i Gisbert

Xavier Bonjoch Fornos

Barcelona, desembre 2004

Una vegada finalitzada la memòria del treball realitzat durant aquests anys en el Departament de Microbiologia és el moment d'agrair a totes les persones que han ajudat a la realització d'aquesta tesi, que segur que sense la seva l'ajuda de tots ell no hagués pogut realitzar. En primer lloc, voldria agrair a la persona que ha estat en tot moment orientant-me en el camí de la experimentació científica, el Dr. Anicet Blanch. Gràcies per la dedicació i els ànims que sempre m'has donat, tant en la revisió de la memòria com en el dia a dia al laboratori. He treballat molt a gust tots aquests anys i sempre m'he sentit molt recolzat al teu costat. En aquest cas també voldria fer una menció especial al Dr. Francisco Lucena que ha col·laborat intensament en la realització dels darrers capítols de la tesi, muchas gracias por tener siempre un ratito para orientarme en el mundo de la ecología microbiana en aguas. Com no, també voldria agrair també profundament al Dr. Joan Jofre per la oportunitat que em va donar de continuar el meu aprenentatge al Departament de Microbiologia.

També voldria agrair a la Dra. Anna Maria Solanas per deixar-me utilitzar l'aparell de la DGGE i a la Dra. Maria Jose Prieto per deixar-me treballar al laboratori dos.

Tota realització d'un treball dins un grup no seria possible sense els bons moments passats en el laboratori, i com no, dels moments difícils, i en aquest cas no és una excepció. Per això voldria donar gràcies a totes les persones que m'han ajudat en tot moment, però en especial a la gent més pròxima al grup. En primer lloc donar les gràcies a la gran mestra que ha estat al meu costat, la Cristina Garcia, que en tot moment ha estat ensenyant-me tot el necessari per poder moure'm per un laboratori de microbiologia, i com no també la immensa paciència que ha tingut amb mi en tot moment. Sempre ens quedaran les hibridacions. Tampoc puc oblidar-me de la Yolanda Nebra perquè en tot moment ha estat disposada a donar-me un cop de mà en qualsevol qüestió i ha estat l'altra mestra del laboratori. I que dir d'en Xavi Vilanova, el noi més alegre del laboratori que sempre està disposat a ajudar a tothom, i jo no he estat la excepció. Gràcies per ajudar-me i fer-me les visites a les depuradores d'una manera molt alegre. Finalment queda la petita del grup, la Elisenda. La noia eixerida que sempre està treballant en qualsevol cosa, però que té qualsevol moment per ajudar.

Tampoc puc oblidar-me dels rosinots, els grans companys i amics amb els quals hem dinat cada dia junts en aquests anys. No oblidaré les grans conversacions metafísiques que hem tingut alhora de dinar, sobretot als estius. Al Carlos, el fiestero del grup i gran company de xerrades clandestines a 37°C; al Néstor sempre tant alegre i divertit, també t'haig d'agrair l'ajuda que m'has donat en la realització de les PCRs quantitatives. Al primer amic Etiop que he fet, Ayalke, el noi més servicial que he conegut amb les noies, i també amb els amics (encara que no ho reconegui). I com no les dues noies que posen seny dins el grup dels rosintots, la Pili, nunca olvidaré nuestro baile en Panamá's, i de la Sílvia, una veterana del Departament amb un gran esperit jove.

Fora del grup d'investigació també he trobat grans amics que m'han ajudat tan en el nivell professional com en el personal. La veritat, la cosa és complicada perquè hi ha tanta gent a qui agrair la seva ajuda, però som-hi. A la Laura Mocé que sempre i sempre m'ha ajudat a pensar i a solucionar problemes en el laboratori, i com no de les xerrades de germans al passadís. També al Marc Viñas que m'ha ajudat molt en el nivell professional, ja no en les DGGE sinó en una visió global de la microbiologia, meteorologia, gastronomia ...

També agrair als companys de laboratori, tot i les nostres "rencillas" amb les rampes, ha estat un plaer treballar amb tots vosaltres al costat. Al Michel, el noi que sempre sap a on estan les coses del laboratori, a l'Anna, la noia que dóna la alegria al grup, i a l'enigmàtic macho alfa, l'Andrey, que sempre et soluciona els dubtes teòrics de la microbiologia. I com no recordar al Javi Mendez que sempre t'ajuda en qualsevol cosa.

També donar les gràcies a les veïnes, que sempre que els hi hem demanat ajuda han respost. A la Maite, gràcies per l'ajuda rebuda; la Ruth per la seva alegria i somriure, la Cris, la Carolina, la Sandra, la Núria Q., i la Sara la fashion del departament i com la Laura per ajudar-me sempre, ja t'ho havia dit molts cops no? ☺.

I també a les noies del laboratori 6, que en aquest últim any s'han integrat al sopars de Departament, he passat molt bons moments amb elles, la Natalia la todo terreno del grupo, la Rocío la noia callada, però alhora alegre, la Sílvia R. la noia xerraire, i la resta de noies Maite, Sandra i Sílvia V.

I que dir dels amics que he fet al laboratori 2, a l'Óscar, el primer "freak" que vaig conèixer al Departament, ell sempre tan bondadós amb la gent; el Pere P. el pitxitxi del Micromachines i el de "guays" del Departament, però molt bona gent; al Cristian, un noi reservat, però molt afable; i a les noies: Cristina B., Núria Prim i Iulia.

En el laboratori 4 també he fet amistats tot i ser un grup molt reservat. A la Núria, la noia més tímida del Departament; a la Sonia R., haver si seguimos haciendo las partidas al Catan. I la resta de gent del laboratori Rosa, Nacho i Jorge.

En el laboratori 5 també he trobat molt bona gent, als màxims organitzadors d'actes socials, al Marc V i al Quim, un altre buenazo i futbolero del Departament que sempre està disposat a donar-te un cop de mà. Com l'hi he dit a la Sonia a veure si seguim fent les partides al Catan. I un record per al porter de Micromachines, el Jordi S.

I seguint el passadís trobem el laboratori 6, potser per a mi el més desconegut, tot i així fer una menció amb molt "carinyo" a la Mari: què hauria fet sense tu amb les PCR quantitatives?? I al "cachondo" del Lluís sempre tant rialler ell. I una salutació als veterans del laboratori, al Santi el líder de Micromachines en sus tiempos, encara recordo quan em vas portar a l'hospital amb el turmell trencat, moltes gràcies i al Xavi A.

Finalment queden els del laboratori 12, la Laura, que espero que nos sigamos viendo en el Catan i el Javi del Campo un altre freak del Departament.

Tampoc no voldria oblidar-me de la Susanna Calle, tot i les nostres "famoses" disputes, donar-li les gràcies per la dedicació que ha tingut i pels maldecaps estalviats gràcies a la seva feina. EH! Que falta la Rosario, que pensavas que me olvidaria de ti?? Una altra persona que sempre ajuda a tothom i que et dóna un cop de mà desinteressadament. I un record especial pels secretaris del Departament amb qui he tractat, la Macu i el Manolo.

Finalment voldria agrair de manera general a tota la gent pel tracte rebut al Departament que en tot moment ha estat immillorable (encara sempre també hi ha mals moments) i ha fet que en aquests anys m'hagi sentit molt a gust dins el Departament de Microbiologia.

I com no, un record molt especial al meus pares que m'han recolzat i m'han ajudat molt sempre. En aquesta tesi hi ha una petita part de vosaltres. Sense vosaltres segur que no ho hagués aconseguit. Finalment he arribat a bon port!

Finalment donar les gràcies a la Núria, tot i que fa poquet que estem junts, aquest últim any ha estat molt intents per a mi i he sigut més feliç que mai al teu costat. A més a més, al esperar-te totes les tardes amb tota la il·lusió del món has fet que la tesi l'hagi pogut acabar més d'hora del previst! Ens veiem al nostre piset.

Capítol 1. Introducció General.....	1
1.1. Importància de l'origen de la contaminació fecal.....	3
1.2. Detecció de la contaminació fecal.....	4
1.3. Indicadors de contaminació fecal.....	8
1.3.1. Indicadors de la càrrega de contaminació fecal.....	9
1.3.1.1. Coliformes totals i fecals.....	9
1.3.1.2. Enterococs fecals.....	10
1.3.1.3. Espores de clostridis sulfit-reductors de clostridis.....	10
1.3.1.4. Fags somàtics.....	11
1.3.2. Indicadors de l'origen de la contaminació fecal.....	12
1.3.2.1. Fags F-RNA i fags de <i>Bacteroides fragilis</i>	12
1.3.2.2. <i>Rhodococcus coprophilus</i>	13
1.3.2.3. Anàlisi de resistències a antibiòtics.....	13
1.3.2.4. Fenotipatge de poblacions de coliformes fecals i enterococs.....	14
1.3.2.5. <i>Bacteroides</i> spp.....	14
1.3.2.6. <i>Bifidobacterium</i> ssp.....	15
1.3.2.7. Indicadors químics.....	15
Esterols fecals.....	16
Agents blanquejants fluorescents (FWAs).....	16
Tripolifosfat sòdic (STP).....	16
Alcans-benzens de cadena llarga (LABs).....	17
Cafeïna.....	17
1.4. <i>Bifidobacterium</i> com a indicador de contaminació fecal.....	18
1.4.1. Història.....	18
1.4.2. Característiques del gènere <i>Bifidobacterium</i>	19
1.4.3. El gènere <i>Bifidobacterium</i> com a indicador de contaminació fecal.....	23
1.4.4. Detecció de <i>Bifidobacterium</i>	24
Gels d'electroforesi de camp pulsant (PFGE).....	27
Assaig d'amplificació a l'atzar d'ADN polimòrfic (RAPD).....	28

Assaig de ribotipatge.	28
Anàlisi de restricció d'ADN ribosomal amplificat (ARDRA).	29
Utilització de sondes i iniciadors dianes de l'ARN ribosomal.	30
Electroforesi de gels de gradients desnaturalitzants (DGGE) i electroforesi de gels de gradients de temperatura (TGGE).	33
Dot-blot hibridació i "Microarrays".	34
1.5. Objectius generals.....	35
Capítol 2. Enumeració de les poblacions de bifidobactèries amb medis selectius per a determinar l'origen de la contaminació fecal en aigües.....	37
2.1. Introducció.	39
2.2. Materials i Mètodes.....	47
2.2.1. Medis de cultiu, condicions de creixement i soques de referència.	47
2.2.2. Comparació de tres medis selectius per a la recuperació de <i>Bifidobacterium</i> en aigües residuals.	51
2.2.2.1. Enumeració de les diferents poblacions bacterianes.	51
2.2.2.2. Hibridació colonial amb la sonda Bif.	51
Transferència i lisi cel·lular.	52
Hibridació colonial.	53
Revelat de la hibridació amb la sonda Bif.	53
2.2.2.3. Presa de mostres d'aigües residuals urbanes i d'escorxadors.	55
2.2.2.4. Avaluació de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol mitjançant el medi selectiu i diferencial HBSA.	58
2.2.3. Determinació de la contaminació fecal mitjançant les diferents proporcions bacterianes en aigües residuals.	58
2.3. Resultats.....	61
2.3.1. Comparació dels tres medis selectius per a la recuperació de <i>Bifidobacterium</i> en aigües residuals.	61

2.3.1.1. Avaluació de les soques de bifidobactèries fermentadores de sorbitol.	66
2.3.2. Determinació de les diferents proporcions bacterianes en mostres d'aigües residuals.	66
2.4. Discussió	73

Capítol 3. Anàlisi del gen del 16S rRNA mitjançant PCR múltiple amb iniciadors específics de *Bifidobacterium* spp. per a la identificació de l'origen de la contaminació fecal 79

3.1. Introducció.	81
3.2. Materials i mètodes	87
3.2.1. Soques bacterianes i medis de cultiu.	87
3.2.2. Extracció de l'ADN dels cultius purs.	87
3.2.3. Extracció de l'ADN de les mostres ambientals.	88
3.2.3.1. Mètodes descrits per a l'extracció de l'ADN.	89
3.2.3.2. Extracció d'ADN de les mostres amb el "QIAamp DNA stool mini kit".	91
3.2.3.3. Extracció de l'ADN de les mostres amb el "QIAamp DNA blood mini kit".	93
3.2.4. Amplificació del gen del 16s rARN de <i>Bifidobacterium</i> per PCR amb iniciadors específics.	95
3.2.5. Selecció de les espècies de <i>Bifidobacterium</i> associades a la contaminació fecal d'origen humà.	96
3.2.6. Definició d'una PCR múltiple per <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> (PCR múltiple ADO-DEN).	98
3.2.7. Determinació de la sensibilitat de la PCR múltiple per <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> .	100
3.2.8. Avaluació de l'especificitat de la PCR múltiple per <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> .	100

3.2.9. Detecció de les espècies <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> en mostres ambientals.	101
3.3. Resultats.....	103
3.3.1. Extracció de l'ADN de les mostres ambientals.	103
3.3.2. Selecció de les espècies de <i>Bifidobacterium</i> associades a la contaminació fecal d'origen humà.	104
3.3.3. Definició d'una PCR múltiple per <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> (PCR-múltiple ADO-DEN).	105
3.3.4. Avaluació de l'especificitat de la PCR múltiple per <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i>	107
3.3.5. Detecció de les espècies <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> en mostres ambientals.	108
3. 4. Discussió.....	111
Capítol 4. Desenvolupament d'una PCR quantitativa en temps real per a l'enumeració de <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i>.....	117
4.1. Introducció.	119
4.1.1. PCR quantitativa en temps real.	121
4.1.2. PCR quantitativa en temps real aplicada al gènere <i>Bifidobacterium</i>	125
4.2. Materials i Mètodes.....	129
4.2.1. Medis de cultiu, condicions de creixement i soques tipus.	129
4.2.2. Desenvolupament de la tècnica de la PCR en temps real per <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i>	129
4.2.3. Enumeració de les espècies <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> per la tècnica de PCR en temps real en aigües residuals d'origen humà.	131
4.3. Resultats.....	133
4.3.1. Determinació de la recta patró per a la PCR en temps real de <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i>	133
4.3.2. Enumeració de les espècies <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> per la tècnica de PCR en temps real en aigües residuals d'origen humà.	140
4.4. Discussió.....	143

**Capítol 5. Inactivació natural “in situ” de diferents poblacions bacterianes en
aigua de riu: avaluació mitjançant diferents tècniques metodològiques.....¡Error!**

Marcador no definido.

5.1. Introducció.	149
5.1.1. Factors físics d’inactivació.	150
Temperatura.	150
Radiació solar.	151
Adsorció a sòlids suspesos.	152
5.1.2. Factors químics d’inactivació.	153
Oxigen dissolt en l’aigua (DO).	153
Potencial redox.	154
El pH i les sals.	155
Desinfectants.	156
Matèria orgànica.	156
5.1.3. Factors biològics d’inactivació.	157
5.1.4. Inactivació natural de <i>Bifidobacterium</i>	159
5.2. Materials i Mètodes.	161
5.2.1. Model experimental per a l’estudi de la persistència de <i>Bifidobacterium</i> i de les poblacions microbianes descrites com indicadores de contaminació fecal en aigua de riu “in situ”.	162
A) Anàlisi comparatiu de la persistència de <i>Bifidobacterium</i> amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal tradicionals “in situ” en aigua de riu.	165
B) Persistència de les soques tipus <i>B. adolescentis</i> DSM 20083T i <i>B. dentium</i> DSM 20084T “in situ” en aigua de riu.	166
C) Persistència de les soques tipus <i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ^T en aigua de riu autoclavada “in situ”.	167

5.2.2. Anàlisis estadístiques.	167
5.2.2.1 Càlcul de la T ₉₀ de les diferents poblacions bacterianes.....	167
5.2.2.2. Gràfiques d'inactivació de les poblacions bacterianes.	168
5.2.2.3. Proves estadístiques.	168
5.3. Resultats.....	173
5.3.1. Inactivació natural de les espècies de <i>B. adolescentis</i> i <i>B. dentium</i> “in situ” mitjançant tècniques moleculars i medis selectius.	173
A) Anàlisi comparatiu de la persistència del gènere de <i>Bifidobacterium</i> amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal tradicionals “in situ” en aigua de riu.	173
B) Persistència de les soques tipus <i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ^T i <i>B. dentium</i> DSM 20084 ^T “in situ” en aigua de riu.	182
C) Persistència de las soca tipus de <i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ^T en aigua de riu autoclavada“in situ”.	190
5.3.2. Resum final de les T ₉₀ de les cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes analitzades “in situ” en aigua de riu.	195
5.4. Discussió.....	197
Conclusions.....	209
Annex I.....	213
Annex II.....	223
Bibliografia.....	235

Llistat de abreviatures

ADN	àcid desoxiribonucleic
16S rADN	seqüència cromosòmica que codifica pel ARNr 16S
aprox.	aproximadament
ARN	àcid ribonucleic
rARN	ARN ribosòmic
16S rARN	ARN ribosòmic 16S
ATCC	American Type Culture Collection
cm	centímetre
CO ₂	dioxid de carboni
CSPD [®]	disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl) phenyl phosphate)
Ct	Cicle fraccionari d'amplificació de l'ADN
dNTP	desoxinucleòtid-trifosfat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EDTA	àcid etilen-diamino-tetraacètic
g	gram
G+C	guanina més citosina
h	hora
HSP	Proteïnes de xoc tèrmic
kb	kilobase
kDa	kilodaltons
l	litre
LMG	Laboratorium voor Microbiologie Gent
M	concentració molar
m ³	metres cúbics
mg	mil·ligram
min	minuts
mL	mil·lilitre
mm	mil·límetre
Mb	Megabases
µm	micrometre

mM	milimolar
N	normal
°C	graus Celsius
ON	<i>over night</i> : incubació durant una nit (14-18 hores)
p/v	relación peso/volumen
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
pH	$-\log_{10}$ de la concentració de ions de hidrogen
pb	parells de bases
pmol	picomol
r.p.m.	revolucions per minut
s	segons
SD	desviació estàndard
SDS	dodecil sulfat sòdic
SSC	tampó clorur sòdic-citrat sòdic
Taq	breviatura de <i>Termus aquaticus</i> , bactèria que posseeix l'enzim polimerasa termoestable utilitzada en la tècnica de la PCR
TBE	tampó tris-àcid bòric-EDTA
T _m	<i>melting temperature</i> : temperatura de desnaturalització del ADN
Tris	tris(hidrometil) aminometà
T ₉₀	Temps en reduir-se el 90% d'una població bacteriana
U	unitats
UCF	unitats formadores de colònia
ulog	unitats logarítmiques
UV	radiació ultravioleta
V	volts
µg	microgram
µl	microlitre
W	vats

*El arte de preguntar no es tan fácil como se piensa.
Es más el arte de los maestros que de los discípulos;
hay que haber aprendido ya muchas cosas
para saber preguntar lo que no se sabe.*

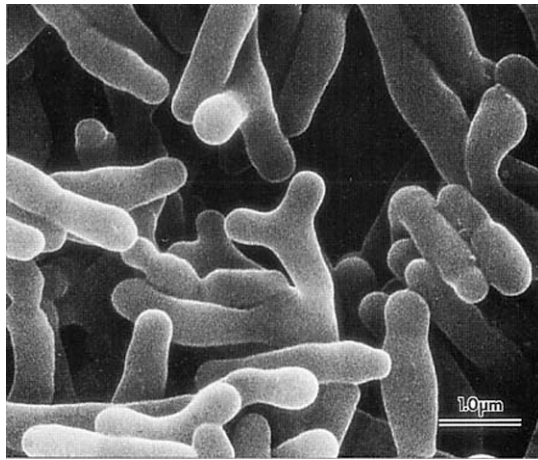
Rousseau

*Si uno empieza con certeza, acabará con dudas,
pero si se conforma con empezar con dudas,
conseguirá acabar con certezas.*

Bacon, Francis

Capítol 1

Introducció General



1.1. Importància de l'origen de la contaminació fecal

La contaminació fecal produïda pels homes i animals és una de les principals fonts del deteriorament de la qualitat de l'aigua, tant de les aigües superficials com de les aigües costaneres. Aquesta contaminació de les aigües superficials pot tenir diferents orígens, però el més comú és la pròpia matèria fecal produïda pels humans o pels animals domèstics i de granges. La contaminació fecal pot degradar els ambients aquàtics utilitzats per l'home tal com l'aqüicultura, zones recreatives com llacs, mars, etc. i zones d'abastament d'aigua potable. La causa d'aquesta degradació és la introducció de microorganismes patògens dins el cicle de l'aigua que poden causar malalties i epidèmies. Un exemple recent és l'epidèmia passada a Walkerton (Ontario) entre el maig i juny del 2000 on unes 2300 persones van estar afectades i set d'elles van morir per un brot enteropatogènic produït per una soca patogènica d'*Escherichia coli* O157 (Hrudey *et al.* 2003).

Tan la contaminació fecal humana com la animal constitueixen un gran risc per a la salut de l'home. Encara que hi ha una mancança d'estudis epidemiològics per determinar quina de les dues contaminacions fecals és més perillosa per a l'home. Aquest risc està determinat per dos factors. El primer factor és la gravetat de la malaltia produïda pel patogen i la segona causa és el nombre de microorganismes patògens necessaris per iniciar una infecció. Quan hi ha una contaminació fecal en l'aigua és necessari determinar el seu origen, per així intentar mitigar al màxim el risc per a la salut humana. En el material fecal excretat per l'home també poden alliberar-se microorganismes patògens com: *Salmonella thypi*, *Vibrio cholerae* i alguns virus (adenovirus, rotavirus, virus de Norwalk, virus de la hepatitis A). Els animals de sang calenta també poden excretar agents infecciosos per a l'home que poden produir grans epidèmies tal com *E. coli* O157, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, el virus de la hepatitis E.

Per tant, la identificació de la font de la contaminació fecal (humana i/o no humana) i la reducció d'aquesta pot ajudar a mitigar el costos de gestió i recuperació de les zones afectades. Aquestes zones podrien ser aigües de rec, àrees de cultius de mol·lusc i peixos, plantes potabilitzadores, zones de bany, plantes depuradores, etc.

1.2. Detecció de la contaminació fecal

Els primer treball on es va descriure una contaminació fecal en aigües va ser l'estudi realitzat per Snow i Budd l'any 1855 (Dufour *et al.* 1981). La primera referència d'un microorganisme indicador no es va realitzar fins trenta anys després, en què Escherich va observar que *Bacillus coli* (*Escherichia coli*) no només es trobava en grans quantitats en les femtes humanes sinó que també s'associava a malalties provocades per bacils tifoides (*Salmonella*) (Dufour *et al.* 1981). Ara bé, no va ser fins a principis del segle XX en què es va veure la necessitat de realitzar un control microbiològic de les aigües de consum humà. Avui en dia, aquestes anàlisis microbiològiques es realitzen de manera rutinària a partir de mostres d'aigua de diferents procedències, que són destinades al consum humà (fonts, rius, conduccions municipals, pous), aigües de bany i aigües residuals. La gran diversitat de malalties d'origen bacterià que es poden transmetre per l'aigua fa difícil o quasi impossible que en aquestes anàlisis rutinàries es pugin detectar tots els patògens que es transmeten per l'aigua. Per aquests motius, l'anàlisi microbiològica de les aigües és de gran importància sanitària. La presència de bacteries patògens en l'aigua destinada al consum humà és un risc sempre present, que s'incrementa en les àrees de major densitat humana, arribant a ser la causa d'un seguit de malalties infeccioses (febres tifoïdes, disenteria, còlera, etc.).

L'home i les seves activitats domèstiques, industrials, agrícoles i ramaderes generen una important contaminació fecal. Aquesta es dispersa per les aigües residuals. Les aigües residuals són aigües que han estat utilitzades i contenen residus diversos procedents de la indústria, de nuclis de poblacions humanes o d'activitats agropecuàries. Per tant, existeixen implicacions sanitàries i medi ambientals per tal de no abocar-les lliurement. Aquestes aigües residuals porten una gran càrrega de matèria orgànica, i en

menor quantitat matèria inorgànica que ha d'eliminar-se abans de ser abocades. Per aquests motius el tractament de les aigües residuals és un procés determinant a l'hora de reduir la contaminació, tant microbiològica com química. Quan aquest tractament es realitza degudament, fins i tot, ens pot plantejar la seva reutilització: aigües de rec, de recuperació de nivells freàtics, i tal com contemplen alguns països en circumstàncies d'emergència, el seu ús, després d'un procés de potabilització, per a la distribució en les xarxes de distribució d'aigua (Anderson 2001).

Els patògens humans que es transmeten per l'aigua inclouen bacteries, virus, protozous i helmints (Taula 1.1). Aquests microorganismes normalment es multipliquen en el tracte intestinal i abandonen el cos amb les femtes. Això fa que la contaminació fecal de l'aigua comporti un risc sanitari ja que el patògen pot penetrar en un altre hoste al consumir aquesta aigua contaminada. L'elevat ús d'aigua en moltes activitats humanes, facilita o pot incrementar el risc d'infecció encara que el patògen es trobi en una concentració baixa. Conseqüentment, resulta necessària la depuració de les aigües residuals per tal d'evitar la dispersió de patògens a través del cicle de l'aigua. Òbviament, és imprescindible el control dels patògens en el cicle de l'aigua abans de la distribució d'aquesta en xarxes de consum mitjançant els processos de potabilització.

Entre les bacteries patògens més importants que es transmeten per l'aigua hi ha *Salmonella typhi*, l'agent causal de la febre tifodea i *Vibrio cholerae*, l'agent causal del còlera. Més freqüent que la febre tifodea, però menys severa, és la salmonel·losis provocada per diferents *Salmonella* spp. També podem trobar casos de gastroenteritis provocats per *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp i *Yersinia* spp. Els bacteries entèrics són eficaçment eliminats durant la potabilització de l'aigua i per això no els hauríem de trobar mai presents en l'aigua tractada adequadament. Entre els virus transmesos per l'aigua s'inclouen els causants de la poliomièlitis (poliovirus) i altres virus entèrics, com l'hepatitis A, i el virus de Norwalk. Entre els protozous que es poden transmetre per l'aigua cal destacar *Giardia* i *Cryptosporidium* que poden produir diarrea i disenteria. Aquests han estat en els darrers temps motiu de preocupació en el proveïment d'aigües de consum sobretot en els països desenvolupats (Mackenzie *et al.* 1994; Roach *et al.* 1993).

Taula 1.1. Patògens associats a la contaminació fecal en l'aigua (Anònim, 2004a).

Patògens	Persistència a l'aigua	Infectivitat	Origen animal
Bactèries			
<i>Bukholderia pseudomallei</i>	Pot multiplicar-se	Baixa	No
<i>Campylobacter jejuni</i>	Moderada	Moderada	Si
<i>E. coli</i> enterohemorràgica	Moderada	Alta	Si
<i>E. coli</i> patogènica	Moderada	Moderada	Si
<i>Legionella</i> spp.	Es multiplica	Baixa	No
Micobacteria no tuberculosa	Es multiplica	Baixa	No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pot multiplicar-se	Baixa	No
<i>Salmonella typhy</i>	Moderada	Baixa	No
Altres salmoneles	Pot multiplicar-se	Moderada	Si
<i>Shigella</i> spp.	Curta	Baixa	No
<i>Vibrio cholera</i>	Curta	Baixa	No
<i>Yersinia enteocolítica</i>	Llarga	Baixa	Si
Virus			
Adenovirus	Llarga	Alta	No
Enterovirus	Llarga	Alta	No
Hepatitis A	Llarga	Alta	No
Hepatitis E	Llarga	Alta	Potencial
Norovirus	Llarga	Alta	Potencial
Rotavirus	Llarga	Alta	No
Protozous			
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Llarga	Alta	No
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Llarga	Alta	Si
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Llarga	Alta	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	Moderada	Alta	No
<i>Giardia intestinalis</i>	Moderada	Alta	Si
<i>Naegleria fowleri</i>	Pot multiplicar-se	Alta	No
<i>Toxoplasma gondii</i>	Llarga	Alta	Si
Helmints			
<i>Dracunculus medinensis</i>	Moderada	Alta	No
<i>Schistosoma</i> spp.	Curta	Alta	Si

Com s'ha comentat anteriorment, l'elevat nombre i la diversitat de microorganismes en l'aigua residual, sovint fan difícil i complicada la detecció d'un patogen microbià que habitualment no és la població dominant. Examinar cada un dels abastaments d'aigua i buscar-hi els patògens és una feina molt complexa, de costos econòmics molt elevats i es requereix de molt temps. La gran varietat de microorganismes patògens que es troben en les mostres d'aigua, així com la complexitat de la major part de les tècniques d'enriquiment i aïllament fa inviable el control rutinari de tots aquells microorganismes amb importància sanitària. Conseqüentment, en lloc de buscar els patògens el que es busca són els microorganismes indicadors. Aquests són microorganismes que estan associats al tracte intestinal, i la seva presència en l'aigua indica que hi hagut una contaminació d'origen intestinal (Sinton *et al.* 1998). Per tal d'utilitzar un microorganisme com a indicador fecal ha de reunir les següents característiques:

1. Estar associat amb la font del patogen, en aquest cas, a les femtes humanes i trobar-se absent en aigües no contaminades.
2. Ha de trobar-se en concentracions superiors a les del patogen en femtes d'individus infectats.
3. Ha d'existir una correlació entre indicador i patogen, de manera que en quantificar l'indicador es tingui una estimació del nombre de patògens.
4. Una vegada en el medi aquàtic extern, l'indicador ha de presentar un comportament similar al del patogen. O sigui, no ha de multiplicar-se en aigües o altres ambients i ha d'exhibir, com a mínim, igual resistència als processos d'inactivació i depuració medi ambientals que els patògens a controlar.
5. La metodologia per a la seva detecció ha de ser senzilla, ràpida i econòmica, amb la possibilitat d'aplicació a qualsevol tipus d'aigua.

6. El test emprat ha de ser específic per a la detecció de l'organisme indicador i no ha de donar falsos positius.
7. L'indicador no ha de ser patogen i no ha d'aportar cap risc per a la salut humana.

Actualment existeixen diferents directives europees que regulen els diferents tipus d'aigua. El Real Decreto 140/2003 (Anònim. 2004b) estableix els paràmetres i les anàlisis relatives a la qualitat de les aigües destinades al consum humà a Espanya en què està englobada la Directriu 98/83/CEE (Anònim. 1998). En ella es determinen els indicadors microbians establerts en l'àmbit europeu i els mètodes normalitzats per a mesurar-los. La Directriu 91/492/CEE (Anònim. 1991) i la del BOE n°74, 27/03/93 estableix els mateixos paràmetres per les aigües de zones de cultius de bivalves. També existeix una normativa pel control de les aigües de bany per part de la Comissió Europea amb la Directriu 2002/0254 (Anònim. 2002) que actualment està en revisió.

1.3. Indicadors de contaminació fecal

Els primers microorganismes els quals es van proposar com microorganismes indicadors van ser els coliformes, enterococs i les espores de clostridis sulfit-reductors de clostridis. Cal diferenciar dos tipus de microorganismes indicadors:

- Aquells que només estan pensats per a determinar la càrrega de la contaminació fecal: coliformes totals, coliformes fecals, enterococs, clostridis i fags somàtics.
- Aquells microorganismes que ens indiquen l'origen de la contaminació fecal.

1.3.1. Indicadors de la càrrega de contaminació fecal

1.3.1.1. Coliformes totals i fecals

Aquest grup forma part de la flora intestinal dels mamífers i de les aus, que compleixen les condicions abans esmentades. Són un grup de microorganismes pertanyents majoritàriament a la família de les Enterobacteriàcies. Aquests es defineixen com totes les bacteries en forma de bacil que són aeròbiques i aeròbiques facultatives, Gram negatives, que no formen espores i que fermenten la lactosa amb formació de gas en 48 hores a 37° C. Tots els coliformes poden existir com a sapròfits independents o com a microorganismes intestinals, excepte el gènere *Escherichia*, que només pot tenir origen fecal. Aquest fet diferencial, comporta distingir entre coliformes totals (grup que inclou a tots els coliformes de qualsevol origen) i coliformes fecals (que designa als coliformes d'origen exclusivament intestinal). Entre tots els coliformes només el gènere *Escherichia* i ocasionalment *Klebsiella* tenen la capacitat de fermentar la lactosa a 44,5°C a més de fermentar-la a 35-37°C com la resta de coliformes. Així la presència de coliformes fecals cultivats a 44,5°C ens confirma l'existència d'una contaminació microbiològica d'origen fecal, mentre que la presència de coliformes totals, cultivats a 37°C només ens indica l'existència de contaminació.

Ara bé, aquest grup s'ha observat que pot presentar una sèrie de limitacions com a indicador model, tot i que són el més utilitzats. S'ha vist que en certes zones tropicals on les temperatures són elevades hi ha un creixement extraentèric d'aquests en el medi aquàtic (Carrillo *et al.* 1985; Desmarais *et al.* 2002; Solo-Gabriele *et al.* 2000). Cal també tenir en compte que la persistència envers al processos d'inactivació natural i artificial és menor que en virus i paràsits (Calci *et al.* 1998). Això és degut al diferent comportament dels virus i dels diferents paràsits intestinals com *Giardia* i *Cryptosporidium* amb els coliformes fecals. Per tant, trobem unes certes limitacions amb aquest indicador bacterià si ens ha d'assegurar la no presència de paràsits i de virus en aigües (Payment i Franco 1993). A més a més, no ens indica l'origen de la contaminació fecal en aigües ja que els trobem tant en els intestins humans com en els d'animals de sang calenta.

1.3.1.2. Enterococs fecals

Un altre grup que forma part dels microorganismes indicadors tradicionals són els enterococs. Formen un subgrup dins del grup estreptococs fecals que inclouen més de 20 espècies reconegudes (Manero i Blanch 2002; Teixeira *et al.* 2001). Són cocs grampositius, generalment aeròbics facultatius que poden créixer a un pH de 9,6 amb 6,5 de NaCl, 40% de sals biliars i 0,1 de blau de metilè. No formen espores, són catalasa negatius i tenen capacitat d'hidrolitzar l'esculina. Es troben normalment a l'intestí dels mamífers i de les aus, i es desenvolupen a 35°C. Aquests ens serveixen com a indicadors complementaris de la contaminació fecal. Els enterococs moren més lentament en l'aigua respecte altres indicadors, com són *E. coli* i altres Enterobacteriàcies. Aquest fet permet la detecció de contaminacions antigues o intermitents en l'aigua (Devriese *et al.* 1991). Tot i això, cal no oblidar que algunes espècies o soques viuen lliurement en el sòl, vegetals o en productes làctics (Devriese *et al.* 1991; Leclerc *et al.* 1996). En investigacions realitzades en països tropicals es planteja que aquestes bacteries poden estar presents de forma natural en les corrents d'aigua i per tant no reflecteixen necessàriament el grau de contaminació d'aquestes aigües (Hardina i Fujioka 1991).

Tot i que la relació entre coliformes fecals respecte els enterococs fecals (Feachem 1975) ha estat descartada (Pourcher *et al.* 1991), altres estudis proposen les proporcions d'espècies d'enterococs entre diferents animals (Devriese *et al.* 1987) o els patrons de resistència a antibiòtics (Wiggins 1996) com a possibles metodologies per a utilitzar els enterococs com a indicadors de l'origen de la contaminació fecal.

1.3.1.3. Espores de clostridis sulfit-reductors de clostridis

Entre els microorganismes indicadors tradicionals més utilitzats també hi trobem les espores de clostridis sulfit-reductors de clostridis. Ens faciliten informació sobre una contaminació remota (en un temps passat). Són microorganismes anaeròbics estrictes, Gram positius, amb morfologia bacil·lar i formadors d'endospores. Aquestes espores presenten una gran resistència als tractaments de potabilització de l'aigua, fet que explica la importància de la seva anàlisi. Normalment els trobem en les femtes,

encara que en un número molt més baix que *E. coli*. L'avantatge més important de ser un bon microorganisme indicador és que les seves espores sobreviuen en l'aigua molt més temps que els microorganismes del grup coliformes i de la resta de microorganismes, i són més resistents a la desinfecció, fins el punt que poden ser detectats en algunes mostres d'aigua tractades, després d'haver rebut un procés de predesinfecció, floculació, sedimentació, filtració i desinfecció final (Payment 1991). Per aquestes raons, l'aïllament d'anaerobis sulfit reductors es va proposar per indicar el risc de supervivència d'agents patògens en certs ecosistemes exposats a una contaminació fecal remota. A més a més, les seves característiques morfològiques i la seva resistència a diversos mètodes de desinfecció, fan que puguin escapar als tractaments habitualment aplicats a l'aigua (Cho *et al.* 2000; Payment i Franco 1993). L'origen de les espores de clostridis sulfit-reductors no és exclusivament fecal, ja que aquestes poden procedir d'altres fonts ambientals com el sòl, sediments marins, vegetació en descomposició, ferides infectades d'homes i animals (Gesche *et al.* 2003) aigües superficials, com també en els aliments, especialment quan les condicions de higiene en la elaboració són deficientes.

1.3.1.4. Fags somàtics

Els fags són virus bacterians, constituïts per una molècula d'àcid nucleic (genoma) envoltada per una coberta proteica (càpside). La seva classificació es realitza principalment atenent a la morfologia de la càpside i de la naturalesa del genoma. Guelin l'any 1952 va ser el primer en postular aquests microorganismes com a indicadors de contaminació fecal. Actualment, hi ha tres tipus de fags que s'utilitzen habitualment com a indicadors de contaminació fecal en aigües. Els fags somàtics van ser els primers fags que es van descriure com a indicadors de contaminació fecal. Aquests infecten a *E. coli* i ens determinen la càrrega de la contaminació fecal en aigües. Ara bé, aquests presenten una major resistència a la inactivació natural i artificial que la resta de grups bacterians mencionats anteriorment (Gerba 1987).

1.3.2. Indicadors de l'origen de la contaminació fecal

En la detecció de la contaminació fecal, tant en aliments com en aigües, existeix una controvèrsia sobre quin és el microorganisme indicador ideal per tal de discernir l'origen d'aquesta contaminació, ja que els microorganismes indicadors descrits anteriorment només ens indiquen que hi ha una contaminació fecal, però no ens indiquen quin és l'origen d'aquesta. La distinció entre una contaminació fecal d'origen animal o humà és molt important tant a l'hora de fer estudis epidemiològics, per a la realització de plans sanitaris de prevenció, per determinar les causes de la contaminació i per a establir responsabilitats econòmiques. Una contaminació fecal d'origen humà comporta un major risc per la salut humana que l'exposició en aigües contaminades amb material fecal animal (Jagals i Grabow 1996; Sinton *et al.* 1998). Tot i això, no podem descartar les contaminacions d'origen animal que provoquen igualment grans epidèmies, com els microorganismes que provoquen zoonosis. Per aquest motiu alguns autors han proposat diferents microorganismes com indicadors de contaminació fecal diferents als descrits anteriorment:

1.3.2.1. Fags F-RNA i fags de *Bacteroides fragilis*

Posteriorment als fags somàtics d' *E. coli* es van descriure els fags F-RNA que són prevalents en aigües residuals, en femtes d'humans i d'animals (Havelaar *et al.* 1993). Aquests fags van ser classificats en 4 genotips (del I al IV) atenent a varies propietats biològiques i físico-químiques (Furuse *et al.* 1983). La classificació dels fags F-RNA en quatre grups pot ajudar a esbrinar la font de contaminació fecal, els genotips I i IV són majoritàriament d'origen animal i els genotips II i III són principalment d'origen humà (Schaper i Jofre 2000). Malgrat això, en diversos estudis realitzats s'han detectat excepcions, principalment amb els fags del genotip III. També, s'ha descrit els fags de *B. fragilis* que infecten a la soca que donen els hi dona nom (Jofre *et al.* 1989). Aquests últims solucionen els problemes de multiplicació en ambient que presenten els altres dos grups de fags, degut a què infecten una soca anaeròbia, però presenten el problema de la seva baixa concentració en l'ambient fa que sigui difícil la seva detecció. Aquests fags tenen l'avantatge de diferenciar l'origen de la contaminació fecal, per què infecten a l'espècie *B. fragilis* que es troba exclusivament en femtes humanes i no en

femtes animals (Grabow 1985; Tartera *et al.* 1989). Aquests dos grups també presenten una major resistència, com els fags somàtics, a la inactivació natural i artificial que els grups bacterians dels coliformes i dels enterococs.

1.3.2.2. *Rhodococcus coprophilus*

Aquest microorganisme Gram positiu i aeròbic pertany a la família dels actinomicets. Forma uns micelis semblants als dels fongs, però d'una mida molt més petita. L'any 1977 es va proposar *Rhodococcus coprophilus* com a indicador de contaminació fecal ja que es va observar que aquests microorganismes estaven presents en femtes d'animals herbívors (Rowbotham i Cross 1977). Posteriorment, altres estudis van destacar que aquests microorganismes no es trobaven en femtes humanes i per tant podien ser uns molt bons indicadors de contaminació fecal, ja que discriminaven l'origen d'aquesta i presentaven una llarga supervivència en ambients aquàtics (Oragui i Mara 1983). Tot i així, és té molt poca informació de la resistència d'aquests en processos de desinfecció naturals i artificials. En conseqüència no se sap si poden complir totes les característiques d'un indicador de contaminació fecal. Una altra limitació d'utilitzar *Rhodococcus coprophilus* és el període d'incubació, que és de 21 dies.

1.3.2.3. Anàlisi de resistències a antibiòtics

L'anàlisi dels diferents perfils de resistència d'antibiòtics d'una bactèria també s'ha proposat com a indicador de l'origen de la contaminació fecal (Hagedorn *et al.* 1999; Harwood *et al.* 2003). En aquest procediment s'utilitzen diferents patrons qualitius i/o quantitius de resistències d'antibiòtics principalment en enterococs, coliformes fecals i *E. coli* per a distingir les fonts de contaminació fecal. Aquests anàlisis es basen sobre la premissa que les bactèries fecals d'origen animal podrien tenir una resistència més alta a aquells antibiòtics utilitzats habitualment en la producció ramadera que no pas els microorganismes d'origen humà. Caldria esperar que les diferents espècies d'animals tinguessin una microbiota intestinal més resistent a aquells antibiòtics als quals l'espècie animal s'ha vist exposada. Això seria d'esperar sobretot per aquelles espècies d'animals utilitzades en sistemes intensius de producció animal.

Aquesta aproximació és limitant perquè és dependent d'una biblioteca de referència de perfils de resistència d'antibiòtics realitzada prèviament i que és específica de cada zona geogràfica. Per tant, la seva representativitat i universalitat i cost qüestionen profundament aquests mètodes basats en resistències.

1.3.2.4. Fenotipatge de poblacions de coliformes fecals i enterococs

L'anàlisi de fenotipatge de les diferents poblacions bacterianes de coliformes fecals i enterococs s'han proposat com a indicador de l'origen de la contaminació fecal. La utilització dels perfils de fermentació de sucres d'*Enterococcus* s'ha utilitzat per la determinació de l'origen de la contaminació fecal en aigües (Hagedorn *et al.* 2003). Aquests autors van utilitzar 30 dels 95 de les fonts de carboni de la Biolog GP2 MicroPlate TM per crear una llibreria de 365 aïllaments pel gènere *Enterococcus*. D'aquest aïllaments 105 provenien d'una font fecal humana i 260 aïllaments d'una font fecal no humana. Posteriorment a partir d'aquesta llibreria van identificar la font de la contaminació fecal mitjançant els diferents patrons de fermentació de sucres. Aquesta tècnica també és limitant perquè és dependent d'una biblioteca i no es pot aplicar aquesta metodologia a nivell mundial.

1.3.2.5. *Bacteroides* spp

El gènere de *Bacteroides* també s'ha suggerit com a possible microorganisme indicador de la contaminació fecal per varies raons. És una de les espècies predominants de les femtes humanes, representa un 30% de la microbiota total que oscil·la entre 10^8 - 10^{10} cèl·lules/gr de femtes. Al ser microorganismes anaerobis estrictes presenten una supervivència en l'ambient baixa. A més a més, existeixen certes espècies de *Bacteroides* que són exclusives dels humans com *B. vulgatus*, *B. distasonis* i *B. thetaiotaomicron* que ens podrien determinar l'origen de la contaminació fecal (Allsop i Strickler 1985; Bernhard i Field 2000). Recentment, s'han desenvolupat iniciadors específics pel grup bacteriodetes (*Bacteroides-Prevotella*) que mostren una bona especificitat fins al moment per a diferenciar contaminació fecal d'origen humà de la contaminació fecal d'origen boví (Bernhard i Field 2000).

1.3.2.6. *Bifidobacterium* ssp

El gènere de *Bifidobacterium* és una de les principals bactèries que es troben en els intestins del humans i d'alguns dels animals de sang calenta. Aquest gènere s'ha examinat com a candidat d'indicador de la contaminació fecal humana (Bahaka *et al.* 1993; Beerens 1998; Lynch *et al.* 2002; Mara i Oragui 1983; Mossel 1982; Nebra *et al.* 2003; Resnick i Levin 1981a; Sinton *et al.* 1998). La distribució de les espècies de *Bifidobacterium* és molt variable: algunes estan associades exclusivament a un origen humà mentre que d'altres només tenen un origen animal (Biavati *et al.* 1992; Scardovi i Crociani 1974). Per exemple, la espècie de *B. thermophilum* s'ha descrit com a indicadora de contaminació fecal d'origen animal (Gavini i Beerens 1999) i les espècies de *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. dentium*, *B. angulatum*, *B. catenulatum* (Ballongue 1998; Matsuki *et al.* 1999; Nebra *et al.* 2003) com espècies associades a un origen humà. Atenent aquestes característiques, la detecció d'espècies de *Bifidobacterium* exclusives d'origen humà o animal pot determinar l'origen de la contaminació fecal. Les limitacions de detecció de les espècies d'aquest gènere ha estat la falta de medis suficientment selectius per a l'aïllament de *Bifidobacterium* en mostres ambientals (Beerens 1990; Mara i Oragui 1983; Nebra i Blanch 1999; Resnick i Levin 1981a). No obstant, l'ús de les tècniques moleculars en aquests últims anys ha estimulat un gran avenç en l'anàlisi, i a l'estudi més profund d'aquest gènere, i així trobar altres aproximacions metodològiques a aquelles que depenen dels seu creixement en medis selectius.

1.3.2.7. Indicadors químics

Els components químics utilitzats per a la discriminació de l'origen de la contaminació fecal en aigües es poden diferenciar en dos grups diferents, segons el seu origen: els que tenen un origen fecal (esterols i estanols fecals) i els que tenen un origen no fecal, però que es troben de manera sistemàtica en aigües residuals i ambientals: els agents blanquejants fluorescents (FWAs), el tripolifosfat sòdic (STP) present en els detergents en pols i els alquins-benzens de cadena llarga (LABs) utilitzats per a l'elaboració de detergents (Sinton *et al.* 1998).

Esterols fecals

Tota matèria fecal conté esterols i en la seva degradació es produeixen els estanols. Aquests es produeixen de diferent manera segons l'origen de degradació. El colesterol és reduït a coproestanol en els intestins dels humans i a epicoproestanol en els intestins dels animals, i en el medi ambient a colestanol (Leeming *et al.* 1998). Ara bé, per a la identificació de l'origen de contaminació fecal es determina la proporció de tots dos esterols (coproestanol i epicoproestanol), ja que el coproestanol és un bon indicador de l'origen de la contaminació fecal, però no és exclusiu de les femtes dels humans (Gilpin *et al.* 2003; Leeming *et al.* 1998).

La persistència dels esterols fecals és molt elevada en aigües ja que s'han detectat en afluents contaminats on la presència de coliformes fecals va ser nul·la, aquests s'havien eliminat per processos de cloració i tractaments per calor (Tabak *et al.* 1972).

Agents blanquejants fluorescents (FWAs)

Els agents blanquejants fluorescents (FWAs) són compostos que estan presents en els detergents en pols. Alguns d'aquests compostos s'alliberen en els emissors urbans i en conseqüència poden ser utilitzats com a indicadors potencials de contaminació humana (Sinton *et al.* 1998). No obstant, les diferents interferències de compostos orgànics fluorescents i els pocs estudis realitzats en els FWAs limiten la utilitat d'aquests agents com indicadors químics en aigües.

Tripolifosfat sòdic (STP)

El tripolifosfat sòdic (STP) és un component bàsic dels detergents en pols i per tant es suposa que està associat a la contaminació humana. No està present en fertilitzants i es troba normalment en ambients no contaminats (Close *et al.* 1989). El tripolifosfat sòdic és hidrolitzat fàcilment en aigües de superfície i en conseqüència s'adsorbeix als sediments. Les baixes concentracions en les que es troba el tripolifosfat sòdic dificulta el seu anàlisi per a utilitzar-se com un compost indicador de contaminació.

Alcans-benzens de cadena llarga (LABs)

Els alcans-benzens de cadena llarga (LABs) són hidrocarburs sintètics. S'utilitzen en la producció d'alcans-benzens lineals sulfatats, que són agents actius dels detergents. Aquests composts han estat associats a aigües residuals municipals que provenen de llots activats. Presenten una llarga persistència en l'ambient. S'han considerat indicadors complementaris als esterols fecals com a marcadors específics de contaminació humana (Sinton *et al.* 1998).

Cafeïna

La cafeïna és un compost que es consumeix amb freqüència pels humans. Aquest compost és absorbit a l'intestí humà, s'elimina per l'orina i finalment va a parar a les aigües residuals urbanes. Per això, s'ha postulat com a un indicador químic útil. Tanmateix, l'assaig per a aquest compost és car. A més a més, la cafeïna és present en nivells alts en algunes plantes i per tant no és d'origen exclusiu humà. Cal tenir en compte que es degradada fàcilment per certs microorganismes i la seva persistència en el medi ambient és limitada. En conseqüència, presenta desavantatges seriosos com a indicador de contaminació fecal humana (Sinton *et al.* 1998).

1.4. *Bifidobacterium* com a indicador de contaminació fecal

1.4.1. Història

En 1899, en el Institut Pasteur, Tissier va observar i aïllar a partir de femtes de nens una bactèria amb una forma molt peculiar i desconeguda fins al moment. En aquells temps, la taxonomia estava basada totalment en els criteris morfològics, i Tissier va anomenar aquella bactèria amb el nom de *Bacillus bifidu communis* (Tissier 1900). Casi al mateix temps, però en Itàlia, Moro va descobrir en condicions similars una bactèria que va reconèixer com a diferent a la que havia descrit Tissier i que la va classificar dins el gènere *Lactobacillus* (Moro 1900). Obstant de les diferències entre les dues bactèries, Holland en 1920 va proposar un nom comú per elles: *Lactobacillus bifidus* (Holland 1920).

Orla-Jensen (1924), usant noves tecnologies, va ser el responsable d'un canvi decisiu en la direcció de la història de la taxonomia. La classificació i identificació dels microorganismes que fins al moment s'havia basat totalment en la morfologia, es va canviar en nous criteris: la fisiologia, els requeriments nutricionals, característiques metabòliques i enzimàtiques de la bactèria (Orla-Jensen 1924). En 1967, DeVries i Stouthamer van demostrar la presència en les bifidobactèries de l'enzim fructosa6-fosfat fosfoacetolasa (F6PPK) i l'absència dels enzims aldolasa i glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, dos enzims presents en els *Lactobacillus*. En conseqüència aquests autors van concloure que la classificació de les bifidobactèries dins del gènere *Lactobacillus* era errònia (De Vries i Stouthamer 1967). A partir d'aquest moment es van distingir dos tendències: l'escola francesa que estava a favor de la separació dels dos gèneres i de la unificació de totes les bifidobactèries sota el nom de *B. bifidum*, i l'escola anglosaxona que preferia integrar les bifidobactèries dins el gènere *Lactobacillus* (Ballongue 1998). No va ser fins el 1965 i amb el progrés de la genètica molecular que Sebald i col·laboradors i Werner i col·laboradors demostrassin que el percentatge de G+C en l'ADN de *Bifidobacterium* era diferent al dels gèneres *Lactobacillus*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium* (Sebald *et al.* 1965; Werner *et al.* 1966). En l'any 1970 es va aplicar la hibridació d'ADN-ADN per a confirmar la validesa de les espècies prèviament descrites i per a classificar les diferents espècies

segons la homologia del seu ADN a partir de les soques aïllades de diferents hàbitats ecològics (femtes humanes i animals, del rúmen de vaques, d'aigua residual, vagina humana, caries dental, intestí d'abelles) (Scardovi *et al.* 1971).

L'any 1974 en l'octava edició del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology es va reconèixer *Bifidobacterium* com a gènere en el qual estaven incloses 11 espècies (Rogosa 1974). Actualment, aquest gènere, que pertany al grup *Actinomycetaceae*, inclou 33 espècies (Ventura *et al.* 2004).

1.4.2. Característiques del gènere *Bifidobacterium*

Les bacteries pertanyents al gènere *Bifidobacterium* són bacils Grampositius, no mòbils, no esporulats i catalasa negatius (amb algunes excepcions com les espècies *B. indicum* i *B. asteroides* que són catalasa positius). Aquestes bacteries a part de presentar una forma bacil·lar regular poden presentar formes bifurcades, en forma de Y o V (Scardovi 1986). Sembla ser que l'aparició de formes bacil·lars irregulars no es deguda a la degeneració de les bacteries sinó que depèn de la composició del medi (Glick *et al.* 1960; Kojima *et al.* 1968; Kojima *et al.* 1970).

Les bifidobactèries són microorganismes anaerobis estrictes, però la sensibilitat a l'oxigen varia segons les espècies i les diferents soques de cada una de les espècies. El mecanisme amb què certes espècies poden tolerar l'oxigen és desconegut (De Vries i Stouthamer 1969). La temperatura òptima de creixement està entre els 37-41°C, mentre que no hi ha cap tipus de creixement per sota de 20°C ni per sobre de 46°C amb l'excepció de *B. thermacidophilum*, el qual pot créixer a 49,5°C (Dong *et al.* 2000b). Sembla haver-hi una correlació entre les soques de diferents hàbitats i el creixement d'aquests en certes temperatures. Les soques d'origen animal tenen el seu òptim de creixement a 45°C mentre que les soques d'origen humà no poden créixer en aquesta temperatura (Gavini *et al.* 1991).

El rang de pH òptim de creixement és de 6,5 i 7,0. Per sota d'un pH de 4,5 no es produeix creixement ni per sobre de 8,5, amb la excepció de *B. thermacidophilum* que pot créixer a un pH de 4,0 (Dong *et al.* 2000b). Les bifidobactèries són tolerants a ambients àcids.

Els microorganismes del gènere *Bifidobacterium* posseeixen una via característica i exclusiva de degradació de les hexoses, la via de la fructosa-6-fosfat fosfocetolasa (Scardovi i Trovatelli 1965). La clau d'aquesta degradació és l'enzim fructosa-6-fosfat fosfocetolasa (De Vries i Stouthamer 1967) que només es troba en el gènere *Bifidobacterium* i no en altres gèneres de bacteries anaeròbies que morfològicament es podrien confondre com els gèneres *Lactobacillus*, *Arthobacter*, *Propionibacterium* i *Corynebacterium* (Scardovi i Trovatelli 1965). Però, recentment, s'ha detectat aquest enzim en la espècie *Gardnella vaginalis* i per aquesta raó alguns autors han proposat la seva integració en el gènere *Bifidobacterium* basant-se en les proves moleculars (Leblond-Bourget *et al.* 1996; Miyake *et al.* 1998).

Les bifidobactèries són bacteries sacarolítiques. Existeixen diferències entre les diferents espècies i soques en la fermentació de sucres i alcohols (Scardovi 1986). En la Taula 1.2 es mostren les característiques fermentatives d'algunes de les espècies del gènere *Bifidobacterium* (Biavati *et al.* 1992).

Els productes finals de la fermentació de la glucosa mitjançant la via de la fructosa-6-fosfat fosfocetolasa són l'àcid acètic i l'àcid L-(+)-làctic, generalment en una relació molar de 3:2, respectivament. També es produeixen petites quantitats d'àcid fòrmic, d'etanol i d'àcid succínic. No hi ha producció de CO₂ (excepte en el cas de la fermentació del gluconat per les soques presents en els intestins de les abelles), d'àcid butíric o d'àcid propiònic (Scardovi 1986).

Taula.1.2 Xilosa D-Manosa D-Fructosa Galactosa Sucrosa Maltosa Trehalosa Melobiosa Manitol Salicin Sorbitol Arabinosa Rafinosa Ribosa Midó Lactosa Inulina Cellobiosa MelecitosaGluconat

1. <i>B. bifidum</i>	-	-	+ ^b	+	v ^c	- ^d	-	v	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2. <i>B. longum</i>	v	v	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
3. <i>B. infantis</i>	v	v	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	v	v	v	-
4. <i>B. breve</i>	-	+	+	+	+	+	v	+	v	+	v	-	+	+	-	+	v	-	-	-
5. <i>B. adolescentis</i>	+	v	+	+	+	+	v	+	v	+	v	+	+	+	+	+	v	+	+	+
6. <i>B. angulatum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	v	+	+	+	+	+	+	-	-	v
7. <i>B. catenulatum</i>	+	-	+	+	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+	-	+	v	+	-	v
8. <i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+	+	+	+	+	v	+	-	+	v	+	+	+	+	+	-	v	-	v
9. <i>B. gallicum</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+ ^g	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
10. <i>B. dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
11. <i>B. denticolens</i>	-	-	+	+	+	+	v	+	-	+	nd	v	+	+	+	+	+	+	-	-
12. <i>B. inopinatum</i>	+	-	+	-	+	+	-	+ ^b	-	v	nd	-	+ ^b	+	+	v	v	-	v	-
13. <i>B. pseudolongum</i>																				
subsp. <i>pseudolongum</i>	+	+ ^g	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	v	-	v	v	-
subsp. <i>globosum</i>	v	-	+ ^g	+	+	+	-	+	-	-	f	-	v	+	+	+	-	-	-	-
14. <i>B. cuniculi</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15. <i>B. choerinum</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
16. <i>B. animalis</i>	+	v	+	+	+	+	v	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	v	v	-
17. <i>B. lactis</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
18. <i>B. thermophilum</i>	-	- ^h	+	+	+	+	v	+	-	v	-	-	+	-	+	v	v	v	v	-
19. <i>B. thermoacidophilum</i>	- ^d	-	+	+	+	nd	-	+	-	- ^d	+	+ ⁱ	+	+ ⁱ	v	- ^d	-	nd	v	- ^j
20. <i>B. boum</i>	-	-	-	+ ⁱ	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	v	+	-	-	-
21. <i>B. merycicum</i>	+	-	+ ⁱ	+	+	+	-	+	-	+ ⁱ	-	+	+	+	+	+	-	v	-	-
22. <i>B. ruminantium</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+ ⁱ	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
23. <i>B. magnum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
24. <i>B. pullorum</i>	+	+	+	+ ^g	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
25. <i>B. gallinarum</i>	+	v	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	v	v	nd
26. <i>B. saeculare</i>	+	+ ^b	+	+ ^g	+	+ ^b	+	+	-	v	- ^d	+	+	+	-	+ ^g	+	-	+	-
27. <i>B. suis</i>	+	v ^j	v ^j	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
28. <i>B. minimum</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
29. <i>B. subtile</i>	-	-	+	+	+	+	v	+	-	v	+	-	+	+	-	v	-	+	+	+
30. <i>B. coryneforme</i>	+	-	+	nd	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	nd	+	-	+
31. <i>B. asteroides^k</i>	+ ^l	- ^d	+	v	+	v	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
32. <i>B. indicum^k</i>	-	v	+	v	+	v	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+

Símbols : +, 90% o més de soques positives, -, 90% o més de soques negatives, v, 11-89 % de les soques són positives, i nd, no determinat.^a Totes les soques testades fermenten la glucosa, però no el glicerol, lactat i ramnosa.^b Algunes soques no fermenten aquest sucre.^c Poca fermentació.^d Algunes soques fermenten aquest sucre.^e Algunes soques eren negatives sobretot les d'origen de rata i conill.^f Algunes soques es produeix una fermentació débil.^g Generalment hi ha poca fermentació.^h Algunes soques d'aigua residual fermenten aquest sucre.ⁱ Poca fermentació.^j Descrit que algunes vegades no es produeix fermentació.^k Resultats erràtics de la fermentació d'aquest sucre.^l Algunes soques no fermenten les pentoses. No estan incloses les espècies *B. gallicum*, *B. lactis*, *B. thermoacidophilum*, *B. gallinarum* (Biavati et al. 1992).

1.4.3. El gènere *Bifidobacterium* com a indicador de contaminació fecal

Aquest gènere adquireix una gran importància com a microorganisme indicador de contaminació fecal, a mida que es coneix la seva abundància en la microbiota intestinal i es disposen de les tècniques d'aïllament i de cultiu. És un dels gèneres predominants en la microbiota intestinal humana i d'alguns animals de sang calenta arribant a unes concentracions entre 10^9 i 10^{10} cèl·lules/g de femta (Chevalier *et al.* 1991; Hartemink *et al.* 1996; Mitsuoka 1990; Tannock 1997). La fisiologia anaeròbia, els requeriments nutricionals complexos i la seva incapacitat de multiplicar-se per sota dels 30°C, fan que *Bifidobacterium* no pugi replicar-se a nivell extraentèric (Sinton *et al.* 1998) conferint-li les característiques per a ser un bon indicador microbià en aigües. També s'ha proposat la utilització d'aquest gènere com a indicador de contaminació fecal en mostres d'aliments càrnics, de llet i derivats (Beerens 1998; Beerens *et al.* 2000a; Gavini i Beerens 1999).

Ara bé, existeixen una sèrie d'inconvenients alhora de treballar amb el gènere de *Bifidobacterium*. Al ser un microorganisme anaerobi, de requeriments nutricionals diversos i de presentar un creixement lent, es necessiten d'unes condicions de treball adequades i sovint més complexes que per altres grups bacterians. A més a més, de posseir una fisiologia de creixement complexa, la gran diversitat d'espècies amb les diferents característiques fisiològiques complica l'anàlisi general del grup. El principal problema alhora d'aplicar aquest gènere a nivell rutinari com indicador de contaminació fecal és la falta d'una metodologia de treball ràpida i senzilla que permeti obtenir resultats fiables en poc temps. Això implica la necessitat de medis selectius que permetin la recuperació i enumeració de les bifidobàcteries presents en les mostres ambientals. Tot i que s'han descrit molts medis selectius, no s'ha descrit encara un medi totalment selectiu. Tot plegat fa que sigui molt complicat utilitzar el gènere *Bifidobacterium* en estudis ambientals.

1.4.4. Detecció de *Bifidobacterium*

L'enumeració de *Bifidobacterium* spp. en mostres fecals humanes recentment s'ha vist potenciada en el sector alimentari per les propietats beneficioses que presenten aquests i per què poden utilitzar-se com a probiòtics en diferents aliments (Arunachalam 1999; Charteris *et al.* 1997; Roy *et al.* 1995; Rybka i Kailasapathy 1996). La presència de *Bifidobacterium* en la microbiota del tracte intestinal té uns efectes beneficiosos en l'estat de salut. S'ha descrit que les bifidobactèries protegeixen de la colonització de l'intestí per part de microorganismes patògens (Hughes *et al.* 1995). Aquesta protecció es deu a la secreció per part de les bifidobactèries de substàncies antimicrobianes, d'àcid làctic i d'àcid acètic. També s'ha observat que l'adhesió d'aquest microorganisme a les parets intestinals té efectes positius sobre la mobilitat intestinal i per tant facilita el control del restrenyiment (Arunachalam 1999). Les bactèries presents en els productes fermentats són una font d'antígens que poden induir una resposta immunològica per part de l'hoste, estimulant el sistema immune (Arunachalam 1999). D'altra banda s'ha apuntat que aquests microorganismes posseeixen un potencial anticancerigen, amb un efecte antitumoral. Fins el moment aquest efecte només s'ha provat en animals en experimentació. Aquest efecte antitumoral sembla provocat per una acció directa sobre els productes cancerígens (Hosono *et al.* 1990; Mitsuoka 1990). Per aquests motius, les espècies de *Bifidobacterium* estan entre les més comunes en les preparacions probiòtiques (Michel *et al.* 1998).

Els mecanisme de detecció i enumeració de *Bifidobacterium* s'ha basat en el recompte en placa utilitzant medis selectius i diferencials. Hi ha una gran varietat de medis selectius descrits per *Bifidobacterium* (Mara i Oragui 1983; Nebra i Blanch 1999). Molts d'aquests medis contenen antibiòtics, però no ens serveixen per a totes les espècies de *Bifidobacterium* (Muñoa i Pares 1988). El desenvolupament de medis selectius i efectius pel gènere *Bifidobacterium* s'ha vist sempre limitat per la complexa fisiologia de creixement del grup. Necessita de molts factors de creixement, i d'algunes vitamines per tal de poder ser cultivat en placa. Els requeriments nutritius per cada una de les 33 espècies de *Bifidobacterium* descrites fins el moment varien molt, i és molt complicat dissenyar un medi selectiu per a aquest gènere (Ballongue 1998). La majoria de medis descrits fins el moment han estat dissenyats per a la recuperació de les

cèl·lules de *Bifidobacterium* en productes làctics fermentats (Charteris *et al.* 1997) per l'ús d'aquest a la indústria alimentària com a agent probiòtic. Per tal que *Bifidobacterium* pugui tenir una funció probiòtica la concentració ha d'estar en 10^6 cèl·lules viables/g del producte en el moment del seu consum (Arunachalam 1999). Aquestes concentracions elevades faciliten la seva detecció en medis selectius conjuntament amb la seva presència com a població dominant.

No obstant, també s'han anat definint diferents medis selectius per a la detecció de *Bifidobacterium* en mostres ambientals (Beerens 1990; Mara i Oragui 1983; Muñoa i Pares 1988; Nebra i Blanch 1999; Resnick i Levin 1981a) on normalment hi tenim una elevada heterogeneïtat de poblacions bacterianes i unes concentracions de bifidobactèries més baixes que en les mostres de productes alimentaris amb caràcter probiòtic. S'han buscat nous agents selectius que inhibeixin la flora acompanyant, però aquesta inhibició també pot afectar a les pròpies bifidobactèries (Tanaka i Mutai 1980). S'ha de trobar un equilibri entre el nivell de recuperació de les bifidobactèries (Muñoa i Pares 1988) i el nivell d'inhibició de la flora acompanyant (Resnick i Levin 1981b).

Degut a les limitacions dels medis selectius per a la detecció de *Bifidobacterium* en mostres ambientals descrites s'han valorat noves metodologies moleculars per a la detecció, identificació i enumeració de *Bifidobacterium*. L'arribada de les eines moleculars en el camp de la microbiologia ambiental ha expandit la capacitat d'identificar soques d'una manera específica i poder avaluar les proporcions relatives entre les diferents espècies. S'han desenvolupat diferents tècniques moleculars que s'utilitzen per a la detecció, enumeració, i classificació de *Bifidobacterium*. Cada una d'elles té els seus avantatges i els seus inconvenients. En la Taula 1.3 es presenta un resum d'aquestes. I continuació es comenta breument cadascuna d'elles.

Taula 3.1. Tècniques moleculars utilitzades per a la detecció de *Bifidobacterium* (Ventura *et al.* 2004).

Tècniques moleculars	Identificació d'espècie	Identificació de soca	Avantatges	Desavantatges
Gels d'electroforesi de camp pulsat (PFGE)	+	+	Alta reproducibilitat.	Laboriós i lent.
Assaigs d'amplificació a l'atzar d'ADN polimòrfic (RAPD)	+	+	Ràpida prospecció de la diversitat.	Baixa reproducibilitat.
Assaigs de ribotipatge	+	+	Alta reproducibilitat.	Laboriós i lent.
Anàlisi de restricció d'ADN ribosomal amplificat (ARDRA)	+	-	Treballar amb moltes mostres alhora.	Requereix del cultiu i aïllament dels bacteries.
Utilització de sondes i iniciadors dianes del rRNA	+	-	Identificació i seqüenciació.	Difícil de treballar a gran escala.
Electroforesi de gels de gradients desnaturalitzants (DGGE)	+	-	Ràpida prospecció de diversitat i anàlisi comparatius.	Necessitat de seqüenciar les bandes.
Electroforesi de gels de gradients de temperatura (TGGE)	+	-	Ràpida prospecció de diversitat i anàlisi comparatius.	Necessitat de seqüenciar les bandes.
Dot-blot hibridació	+	-	Relativa quantificació sense cultiu.	Validació de sondes.
"Microarrays"	+	+	Procés automàtic i anàlisi de moltes mostres.	Laboriós i complicat.

Gels d'electroforesi de camp pulsant (PFGE)

El gels d'electroforesi de camp pulsant (PFGE, Pulsed field gel electrophoresis) és una de les tècniques moleculars més utilitzades en l'anàlisi de soques bacterianes. Aquesta tècnica consisteix en l'amplificació de l'ADN de la soca analitzada i posteriorment aquest ADN amplificat es talla amb enzims de restricció donant així un patró de bandes característic de cada soca. Els enzims de restricció utilitzats en els anàlisis de soques per PFGE generalment es seleccionen segons l'ADN cromosòmic.

En el cas del gènere *Bifidobacterium* on el contingut de G+C és elevat, s'utilitzen els enzims que reconeixen regions nucleotídiques riques en A i T com *SpeI* (ACTAGT) o *XbaI* (TCTAGA) (Roy *et al.* 1996). Les soques analitzades digerides pels enzims de restricció es separen en gels d'agarosa i es sotmeten a una electroforesi en un aparell en el qual la polaritat del corrent es canvia a intervals predeterminats. El PFGE de soques de *Bifidobacterium* permet una separació clara de fragments molt grans d'ADN, que tenen una llargada molecular de 18 a 625 kb (Roy *et al.* 1996). La tècnica de PFGE ha estat una eina molt utilitzada per a determinar la mida dels genomes de les bifidobactèries. Les mides del genomes de les espècies *B. breve*, *B. infantis* i *B. longum* s'han estimat d'una manera aproximada entre 1.1 i 2.0 Mb, mentre que la soca *B. bifidum* presenta una mida del genoma més alta, entre 1.3 i 2.2 Mb (Roy *et al.* 1996).

L'anàlisi de fragments de patrons de restricció per la tècnica PFGE és altament discriminatòria i altament reproduïble com a eina de tipatge de soques, però la laboriositat del mètode provoca unes limitacions en l'estudi d'un nombre elevat de soques que es poden analitzar. Si aquest mètode és proposat per a la determinació de l'origen de la contaminació fecal, caldrà desenvolupar bases de dades de perfils de restricció associats a diferents tipus de mostres. Posteriorment, aquestes bases de dades s'utilitzarien per comprovar el perfil de restricció d'una mostra problema. Aquests tipus d'aproximació metodològica forma part de les tècniques anomenades "library depending" (dependents de biblioteques) dins de les propostes que s'han realitzat en els darrers temps per a identificar l'origen de la contaminació fecal (Simpson *et al.* 2002).

Assaig d'amplificació a l'atzar d'ADN polimòrfic (RAPD)

L'assaig d'amplificació a l'atzar d'ADN polimòrfic (RAPD Random amplified polymorphic DNA), també es coneix com AP-PCR (Amplified polymorphic-Polymerase Chain Reaction), es basa en l'ús d'iniciadors curts de seqüències triades a l'atzar, de 9 a 10 bases de llargada, que hibriden amb seqüències complementàries o parcialment complementàries de l'ADN cromosòmic. En aquesta tècnica es treballa a temperatures baixes on la unió dels iniciadors és inespecífica i a l'atzar, amplificant diferents regions del genoma bacterià. El nombre i localització d'aquests llocs d'unio varia segons les diferents soques, fins i tot per a soques d'una mateixa espècie bacteriana. Així, la separació dels diferents productes d'amplificació es visualitza per electroforesi en gel d'agarosa, i se'ns dibuixa un patró de bandes característic de cada soca bacteriana.

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per a la caracterització de soques de *Bifidobacterium* procedents d'intestins de rates (Fanedl *et al.* 1998) i per a la diferenciació de les soques *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* i *B. longum* (Vincent *et al.* 1998). No obstant, s'han detectat molts problemes en aquests assaigs RAPD que han contribuït a una poca reproduïbilitat i una falta d'estandardització del mètode. Aquesta metodologia també queda inclosa en el grup de tècniques "library depending" pel que fa al seu ús en la determinació de l'origen de la contaminació fecal en aigües.

Assaig de ribotipatge

El ribotipatge és una variació de la tècnica de l'anàlisi de polimorfisme de fragment de restricció llargs de l'ADN genòmic (RFLP, Restriction fragment length polymorphism). En el ribotipatge, el patró de bandes consta de fragments d'ADN cromosòmics que s'obtenen de l'operó del rADN que hibriden amb les sondes de rADN. L'ADN genòmic es trenca per enzims de restricció i els fragments que resulten es separen en una electroforesi de gel d'agarosa. Els fragments es transfereixen posteriorment a una membrana i s'hibriden amb fragments de rADN (Rodtong i Tannock 1993). Les sondes utilitzades en ribotipatge varien des de seqüències parcials dels gens de rADN fins a regions completes de l'operó del rADN. Si la sonda conté

regions conservades del rADN, es pot utilitzar per a analitzar una gamma àmplia de bacteries, fins i tot aquells, que són filogenèticament molt distants. Així, el poder discriminatori d'aquesta eina depèn de l'especificitat, de la mida de la sonda, i de l'enzim de restricció utilitzat.

Utilitzant aquesta aproximació es van caracteritzar les soques de *B. longum*, *B. infantis* i *B. suis*. Es va demostrar que les diferències de ribotipatge entre aquestes soques diferents eren molt limitades, corroborant així els resultats de reassociació d'ADN-ADN, i permetent una unificació d'aquests taxons en una única espècie (Sakata *et al.* 2002). La tècnica del ribotipatge també es va utilitzar per a la diferenciació de soques de bifidobacteries a nivell d'espècie (Mangin *et al.* 1999; McCartney *et al.* 1996; Sakata *et al.* 2002). Mangin i col·laboradors van investigar la diversitat de soques de *Bifidobacterium* en quatre voluntaris després d'un tractament amb penicil·lina. La utilització d'una sonda basada en el gen del 23S rADN i la digestió de l'ADN cromosòmic amb l'enzim de restricció d'*EcoRV* van mostrar una elevada variabilitat dintre del gènere *Bifidobacterium*, sobretot en les soques de *B. longum* i *B. adolescentis* presents en diferents individus. Ara bé, dins dels mateixos d'individus es va veure que la microbiota de *Bifidobacterium* romanía relativament estable en la seva composició. El ribotipatge de soques també és una tècnica del tipus "library depending".

Anàlisi de restricció d'ADN ribosomal amplificat (ARDRA)

L'anàlisi de restricció d'ADN ribosomal amplificat (ARDRA, Amplified ribosomal DNA restriction analysis) és essencialment un anàlisi de fragments de restricció del polimorfisme dels gens del rARN amplificats. Algunes parts o la totalitat del gen del rARN són amplificats per PCR, i posteriorment es talla amb diferents enzims de restricció. El nombre i mida de fragments d'ADN que resulten varia segons els llocs de restricció dins d'aquestes seqüències de rADN específiques i així es produeixen uns patrons de fragments específics de seqüència.

L'elecció de l'enzim de restricció *HaeIII*, que reconeix seqüències GGCC, s'ha vist que generen un RFLP característic per al gènere de *Bifidobacterium* (Kullen *et al.* 1997). Es va dissenyar un mètode d'ARDRA basat en el 16S rADN que permetia la

discriminació de 14 de les 16 espècies analitzades de *Bifidobacterium* (Ventura *et al.* 2001a), relacionant-se amb diferents ambients microecològics. La detecció d'aquestes espècies es va realitzar d'una manera fiable, ràpida i acurada, utilitzant els enzims de restricció *Bam*HI i *Sau*3AI. Tanmateix, el grup d'espècies relacionades *B. animalis*- *B. lactis* i *B. longum*- *B. suis* no es van poder distingir entre els diferents taxons obtinguts amb aquest mètode. Altres protocols d'ARDRA han estat descrits últimament (Roy i Sirois 2000; Venema i Maathuis 2003) per a la identificació de bifidobactèries. Desafortunadament, el nombre gran d'enzims de restricció utilitzats fa aquest protocol sigui molt laboriós i intensiu, i això fa que l'anàlisi d'un gran nombre de soques no sigui viable.

Utilització de sondes i iniciadors dianes de l'ARN ribosomal

El rARN constitueix un 80% del ARN cel·lular total i té la propietat de ser metabòlicament estable. Aquesta estabilitat és indispensable per al funcionament del ribosoma, que està incrementada per la seva estreta relació amb les proteïnes ribosòmiques.

La molècula de 16S rARN és un component essencial de la subunitat ribosomal petita. Té aproximadament 1500 ribonucleòtids. La seqüència de 16S rARN és altament conservada en tots els organismes a causa de la seva importància metabòlica en el procés de síntesi de proteïnes que fa que sigui una molècula vital pels organismes. Això fa que el 16S rARN sigui una molècula excel·lent per a discernir relacions evolutives entre els microorganismes procariotes. Aquestes molècules són antigues en el temps, funcionalment constants, universalment distribuïdes, i moderadament ben conservades. Hi ha diverses regions dins del gen del 16S rARN que canvien en petites proporcions pel fet que aquesta molècula està implicada en el procés de biosíntesi de les proteïnes, i en diferents interaccions al ribosoma. Això permet una certa variabilitat de la seqüència del 16S rARN.

En els ribosomes bacterians es poden diferenciar tres àcids ribonucleics: el 5S rARN, el 16S rARN i el 23SrARN. Les seves seqüències presenten regions conservades i regions variables. En el 16S rARN hi trobem nou segments variables que s'anomenen correlativament de V1 a V9 (Lane 1991).

L'ús d'aquesta molècula en estudis d'ecologia i taxonomia bacteriana ha experimentat un gran avenç en aquests últims anys (Lane 1991; Matsuki *et al.* 2003). El 16S rARN s'ha emprat per a la síntesi de sondes d'àcid nucleic específiques de grups taxonòmics i síntesi d'iniciadors. Les regions variables del gen 16S rARN contenen seqüències específiques per al gènere *Bifidobacterium*, que s'ha demostrat que és aplicable com a diana de sondes d'oligonucleòtids (Langendijk *et al.* 1995). La regió V9 del 16S rARN ha estat una de les zones més utilitzades per a la detecció d'iniciadors o sondes específiques per al gènere de *Bifidobacterium* (Kaufmann *et al.* 1997; Ventura *et al.* 2001b; Ventura i Zink 2002). Aquests han permès la realització de PCR específiques que serveixen per a la identificació d'espècies de *Bifidobacterium* en mostres de femtes d'humans (Dong *et al.* 2000a; Langendijk *et al.* 1995; Matsuki *et al.* 1999; Matsuki *et al.* 2003; Ventura *et al.* 2001b), en iogurts (Ventura *et al.* 2001b) o en femtes d'animals (Scardovi 1986).

Una limitació de la detecció específica per PCR en els estudis de diversitat poblacional és el nombre d'amplificacions diferents que s'han de realitzar i més en estudis ambientals on les poblacions microbianes són molt complexes i es requereix analitzar un nombre elevat de mostres. Per a evitar aquest problema s'han estudiat algunes estratègies com és l'ús de diferents iniciadors específics per a diferents espècies en les mateixes reaccions de PCR, donant lloc a la tècnica de la PCR múltiple. Dong i col·laboradors l'any 2000 van dissenyar una PCR múltiple per *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. longum* i *B. breve*. Els cinc iniciadors específics d'espècie tenen les seves dianes en llocs diferents del gen del 16S rARN i a més es combinen amb uns iniciadors genèrics de *Bifidobacterium* (Kaufmann *et al.* 1997). Aquesta aproximació permet identificar simultàniament les cinc espècies de *Bifidobacterium* tant en cultius purs com en poblacions mixtes (Dong *et al.* 2000a).

En l'estudi de poblacions mixtes complexes amb la utilització del gen del 16S rARN també s'han utilitzat sondes d'oligonucleòtids realitzant hibridacions fluorescents "in situ" com a mètode independent de cultiu de les bifidobactèries (Franks *et al.* 1998; Langendijk *et al.* 1995).

Una altra zona d'estudi de seqüències d'ADN ha estat l'anàlisi de seqüències de l'espai transcrit intermedi (ITS) entre els gens del 16S rARN i del 23S rARN (Leblond-Bourget *et al.* 1996) com a eina per a estudis filogenètics de *Bifidobacterium*. De fet, la comparació d'un dendograma realitzat amb les seqüències del ITS amb les del gen del 16S rARN presenten arbres filogenètics molt similars. Tanmateix, mentre que les seqüències de 16S rARN són una eina vàlida per a inferir lligams interespecífics, les seqüències del ITS permeten la determinació d'algunes relacions intraespecífiques (Leblond-Bourget *et al.* 1996). També s'han analitzat les relacions filogenètiques mitjançant les seqüències ITS del gènere *Bifidobacterium* i es va trobar que espècies molt relacionades entre elles *B. animalis* i *B. lactis* mostraven una separació molt clara d'aquestes bactèries en dos grups ben diferenciats. Van trobar dues insercions grans en les seqüències ITS en les soques de *B. animalis* que no es trobaven en *B. lactis* i per tant es podia realitzar una separació ràpida d'aquestes espècies (Ventura i Zink 2002).

S'han dissenyat iniciadors específics que tenen com a diana gens que codifiquen per algunes proteïnes de *Bifidobacterium*. Les bifidobactèries produeixen com a mínim 15 tipus de transaldolases diferents que poden ser detectades per electroforesi de proteïnes i immunodetecció (Scardovi 1986). Aquest fet va suggerir que la detecció d'aquestes proteïnes podria utilitzar-se com a eina per a la diferenciació de diferents espècies de *Bifidobacterium* (Requena *et al.* 2002). S'ha demostrat que l'amplificació per PCR de 301 pb de la seqüència del gen de la transaldolasa i la següent comparació de les migracions relatives dels fragments d'ADN amb la tècnica DGGE permet la identificació de dos subtipus de l'espècie de *B. longum*, cinc subtipus de *B. adolescentis*, i dos subtipus de *B. angulatum*. Els iniciadors específics d'aquests gens també s'han utilitzat en la tècnica de la PCR quantitativa en temps real. S'ha realitzat una quantificació de les bifidobactèries en mostres fecals mitjançant iniciadors específics definits en base a les seqüències de gens de transaldolases (Requena *et al.* 2002).

Un altre tipus de gens utilitzats en la identificació de bifidobactèries són els gens de les proteïnes 60 kDa heat-shock (HSP60). Amb l'estudi aquests gens s'han realitzat arbres filogenètics de *Bifidobacterium* (Jian *et al.* 2001). El dendograma construït amb aquestes seqüències de HSP60 és molt similar al realitzat amb les seqüències del gen del 16S rARN. Ara bé, una avantatge de realitzar aquest estudi filogenètic amb les seqüències de HSP60 és que *G. vaginalis* i *Bifidobacterium* que es troben en el mateix grup en l'estudi del 16S rADN, es separen en dos taxons diferents. A més a més, l'anàlisi de seqüència de HSP60 ha indicat que les espècies de *B. denticolens* i *B. inopinatum* s'han d'excloure del gènere *Bifidobacterium* formant així dos gèneres nous: *Scardovia* i *Parascardovia* dins la família Bifidobacteriaceae (Jian i Dong 2002).

Electroforesi de gels de gradients desnaturalitzants (DGGE) i electroforesi de gels de gradients de temperatura (TGGE)

L'heterogeneïtat del rARN entre les espècie bacterianes es pot utilitzar per a l'anàlisi de les espècies constituents de les comunitats bacterianes. Els fragments del gen del 16S rARN de les bactèries es poden amplificar de les mostres ambientals utilitzant iniciadors específics o genèrics de les zones conservades d'aquests gens. Aquests amplificats, tots tenen la mateixa mida, però tenen una variabilitat de la seqüència amplificada que ens permet separar-les per tècniques electroforètiques específiques, com l'electroforesi de gel de gradients de temperatura (TGGE) (Zoetendal *et al.* 1998) o bé l'electroforesi de gel de gradient desnaturalitzant (DGGE). Durant l'electroforesi els amplicons migren en un gradient creixent de productes químics en la DGGE o de temperatura en la TGGE que fan que gradualment es dissociï l'ADN segons les diferents seqüències del fragment amplificat, la dissociació parcial de l'ADN redueix la seva mobilitat en el gel de poliacrilamida. Els fragments aturen la migració en el gel de TGGE-DGGE quan arriben en un punt on la mida del fragment ja no pot passar pel porus del gel de poliacrilamida. Així els fragments amplificats amb seqüències diferents tenen comportaments de fusió diferents i en conseqüència migren a distàncies diferents.

Les tècniques de la TGGE i de la DGGE del gen del 16S rARN han estat àmpliament utilitzades en estudis ecològics moleculars per a avaluar la dinàmica de comunitats de *Bifidobacterium* en mostres fècals (Satokari *et al.* 2001) o en productes alimentaris (Fasoli *et al.* 2003). No obstant això, totes dues tècniques tenen algunes limitacions. Cal destacar la formació d'artefactes com molècules quimeres i d'heteroduplex quan s'amplifica un gen particular des d'una comunitat mixta d'ADN. No es pot menys tenir que els fragments del gen 16S rARN amb seqüències diferents poden tenir comportament de fusió similar i emigrar a la mateixa posició en el gel.

Dot-blot hibridació i “Microarrays”

La tècnica dot-blot s'ha utilitzat per a la detecció simultània de diferents espècies bacterianes. Un exemple és la determinació simultània de diverses espècies de bacteries d'àcid làctic en productes alimentaris fermentats (Ehrmann *et al.* 1994). Aquests autors van sotmetre la mostra a una PCR no específica del gen 16S rARN i posteriorment els productes de la PCR els van hibridar en membranes de filtre amb sondes específiques d'espècie. Aquesta tècnica també es va aplicar per a realitzar un seguiment de *B. dentium* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal en aigües (Nebra *et al.* 2003).

Un altre tipus de tècniques en què s'utilitza la hibridació és el desenvolupament de xips d'ADN, també anomenats “microarrays” d'ADN. Amb aquesta tècnica es poden utilitzar moltes sondes simultàniament per analitzar una sola mostra de poblacions mixtes. Les diferents emissions de fluorescència són detectades mitjançant un làser. S'ha utilitzat la tècnica dels “microarrays” d'ADN utilitzant 20 sondes del gen del 16S rARN per a diferents espècies bacterianes anaeròbies intestinals predominants en mostres fècals humanes entre elles les espècies de *Bifidobacterium*: *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* (Wang *et al.* 2002).

1.5. Objectius generals

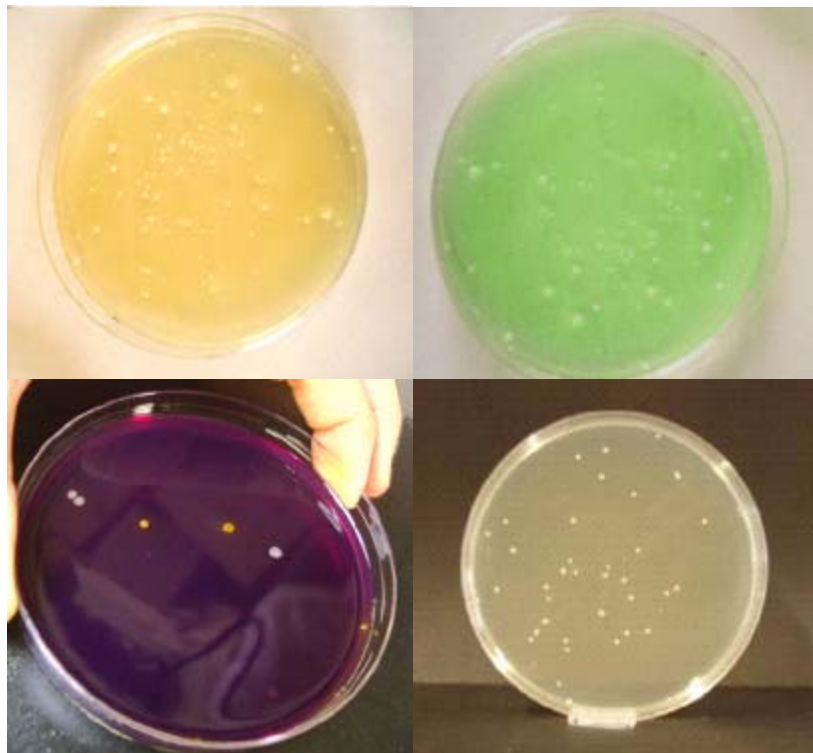
L'objectiu d'aquesta tesi ha estat la optimització de les tècniques presents per a la detecció de *Bifidobacterium* spp. en mostres d'aigua residual per a la possible utilització de certes espècies d'aquest gènere bacterià com a indicadors de la contaminació fecal i determinar l'origen d'aquesta. Els objectius específics de l'estudi han estat:

1. Avaluar l'enumeració de *Bifidobacterium* spp. en tres medis selectius diferents, i comparar les diferents poblacions bacterianes de *Bifidobacterium* analitzades amb altres indicadors microbians en aigües (anaerobis totals, coliformes fecals, enterococs i espores de clostridis sulfit-reductors)
2. Definir proporcions entre les diferents poblacions d'indicadors i les bifidobactèries que permetin diferenciar l'origen humà o animal de la contaminació fecal en aigües.
3. Determinar quines espècies de *Bifidobacterium*, que s'han associat prèviament com exclusives dels humans, es troben només en aigües residuals urbanes. S'analitza la presència d'aquestes espècies en aigües residuals municipals (mostres d'origen principalment humà) i aigües residuals d'escorxadors d'animals (mostres principalment d'origen animal).
4. Desenvolupar una tècnica molecular per a la detecció de les espècies de *Bifidobacterium* associades exclusivament a aigües residuals d'origen humà i avaluar aquesta tècnica molecular amb mostres d'aigües residuals de diferents orígens per tal de poder determinar l'origen de la contaminació fecal.

5. Analitzar l'ús combinat d'aquest nou mètode molecular amb la proporció de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol i de les bifidobactèries totals en el medi selectiu HBSA.
6. Desenvolupar una PCR quantitativa en temps real per a la detecció de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium*.
7. Comparar les dues tècniques moleculars desenvolupades en aquesta memòria, PCR múltiple ADO-DEN i PCR quantitativa en temps real en aigües residuals d'origen humà.
8. Comparar la persistència de les poblacions descrites com a indicadores de contaminació fecal en aigües juntament amb el gènere *Bifidobacterium* en aigua de riu "in situ" mitjançant diferents metodologies, tant moleculars com tècniques de cultiu:
 - Comparar la inactivació natural de les soques tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* 20084^T amb les poblacions de bifidobactèries naturals en aigua de riu "in situ" mitjançant metodologies moleculars i de cultiu.
 - Comparar la inactivació natural de la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T en condicions naturals i en aigua de riu autoclavada "in situ" mitjançant metodologies moleculars i de cultiu.

Capítol 2

**Enumeració de les poblacions de bifidobactèries
amb medis selectius per a determinar l'origen de
la contaminació fecal en aigües**



2.1. Introducció

Actualment, es desenvolupa una gran activitat en la recerca metodològica i de microorganismes indicadors en la microbiologia ambiental per a poder determinar l'origen de la contaminació fecal a les aigües. Les eines que posseïm amb els microorganismes indicadors tradicionals de contaminació fecal no ens permeten discernir l'origen de la contaminació fecal, si és d'origen humà, o bé, si és d'origen animal. Aquesta distinció és molt important a l'hora de determinar responsabilitats jurídiques o bé per poder determinar riscos sanitaris. Tal i com ja s'ha indicat en la introducció general, no és el mateix una contaminació fecal humana que una d'origen animal des d'un punt de vista de risc sanitari.

Des dels inicis de la microbiologia ambiental els diferents investigadors han anat descrivint metodologies basades en el recompte de diferents poblacions bacterianes en medis rics i selectius per poder discernir l'origen de la contaminació fecal.

La proporció més estudiada per a determinar l'origen de la contaminació fecal ha estat l'estudi de les diferents poblacions bacterianes de coliformes fecals i estreptococs fecals en mostres d'aigües residuals. Es va proposar que un valor per sota de 0.7 entre els coliformes fecals i estreptococs fecals ens indicaria una contaminació fecal d'origen animal, mentre que si el valor era superior a 4 significaria que una contaminació fecal és d'origen humà (Feachem 1975). Aquesta proposta ha anat perdent força en el temps ja que diferents estudis han demostrat que aquesta relació es perd, degut principalment a la diferent persistència d'aquestes poblacions microbianes en l'entorn natural (Jagals i Grabow 1996; Scott *et al.* 2002; Sinton *et al.* 1998).

S'han estudiat altres aproximacions amb altres gèneres bacterians com l'anàlisi de les proporcions entre *Pseudomonas* i coliformes fecals per a determinar l'origen de la contaminació fecal (Cabelli *et al.* 1976). Les Pseudomonadàcies es troben en una baixa concentració en els intestins dels humans i tenen una baixa supervivència en l'ambient. Per aquests motius aquests microorganismes no poden ser un bon indicador de contaminació fecal humana. Un altre exemple el trobem en l'estudi de les proporcions

de *Rhodococcus coprophilus* amb alguns actinomicets (*Micromonospora* spp. *Streptomyces*) i *Streptococcus bovis* (Rowbotham i Cross 1977). La gran supervivència de *R. coprophilus* fa inviable aquesta proporció perquè depèn molt de l'estat de la mostra i les proporcions dels diferents microorganismes que varien molt segons el temps degut a les diferents persistències en l'ambient. Altres estudis van proposar la distinció d'orígens de contaminació fecal determinant la proporció de *Bacteroides* spp. i *E. coli*, la qual en animals herbívors va ser molt més baixa que no en els animals no herbívors (Allsop i Strickler 1985).

Altres proporcions per a determinar l'origen de la contaminació fecal estan relacionades amb les bifidobactèries. Les diferents proporcions de coliformes fecals, enterococs i bifidobactèries es van calcular en rius per a determinar la supervivència de les bifidobactèries (Gylleberg *et al.* 1960). Altres estudis també han analitzat diferents rius, en aquest cas rius tropicals. En els climes tropicals es precisament on els indicadors bacterians tradicionals presenten una major problemàtica degut a les altes temperatures que afavoreixen la multiplicació d'aquests en l'aigua. Van calcular les diferents proporcions entre: bifidobactèries / coliformes fecals, bifidobactèries / *E. coli*, i bifidobactèries / anaerobis totals. El recompte de les bifidobactèries es va realitzar amb el medi YN-6 que va mostrar una baixa eficiència per a enumerar la totalitat de les bifidobactèries viables. Per aquest motiu, els resultats obtinguts no van permetre extraure unes conclusions fiables, encara que es va apuntar cap una gran supervivència extraentèrica de *Bifidobacterium* (Carrillo *et al.* 1985). L'origen de la contaminació fecal en mostres de carns i productes làctics també s'ha proposat comparant les proporcions de *Bifidobacterium* i *E. coli* (Beerens 1998).

D'altres mètodes suggerits es basen en la detecció de determinats compostos químics sintetitzats o degradats pels propis microorganismes com estanols i coproestenols citats en la introducció general. Aquestes són mesures indirectes que es basen en la fisiologia dels microorganismes, i per tant comporten certes limitacions importants.

En tots aquests casos els valors absoluts de la quantificació tant de les bactèries com de les substàncies químiques no ens serveixen per a determinar l'origen de la contaminació fecal ja que els valors absoluts de les diferents mostres varien molt segons la càrrega bacteriana de la mostra. El que realment ens pot aportar alguna informació de l'origen de la mostra són les diferents proporcions entre poblacions bacterianes, ja que en la majoria de les mostres es mantenen algunes proporcions bacterianes constants independentment de la càrrega bacteriana absoluta.

Existeixen molts medis selectius (Taula 2.1) i diferencials descrits per a la enumeració i selecció de *Bifidobacterium*. La majoria d'aquests estan dissenyats per a la indústria alimentària, degut a la gran importància d'aquest gènere com a microorganisme probiòtic. L'enumeració de *Bifidobacterium* spp. en mostres fecals ha estat de gran interès en aquests últims anys per poder trobar noves espècies o soques amb propietats fisiològiques adients per a valorar-se com a probiòtics (Arunachalam 1999; Charteris *et al.* 1997; Rybka i Kailasapathy 1996). Això ha fet que s'adaptessin i es desenvolupessin medis i protocols, per a l'anàlisi de les bifidobactèries més enllà dels aliments fermentats.

No obstant, s'han desenvolupat molt poc els medis per a la recuperació de bifidobactèries en mostres d'aigües residuals o ambientals (Beerens 1990; Hartemink *et al.* 1996; Mara i Oragui 1983; Muñoa i Pares 1988; Nebra i Blanch 1999; Resnick i Levin 1981a). El primer treball que descriu la identificació de la font de contaminació fecal en aigües residuals es va realitzar l'any 1959 per Gylleberg i Niemela. Van dissenyar un medi selectiu per aïllar les bifidobactèries a partir d'aigües contaminades per material fecal. Aquest medi no incorporava agents selectius i la única font de carboni i energia era L(+) arabinosa, un sucre que actualment se sap que no permet el creixement de moltes de les espècies de *Bifidobacterium*.

Taula 2.1. Relació dels medis selectius més destacats descrits per a *Bifidobacterium*.

Medi selectius	Autors i any
Medi Gylleberg	Gylleberg <i>et al.</i> 1960
MRS	Deman <i>et al.</i> 1960
BS1 agar	Mitsuoka <i>et al.</i> 1965
MNP medium	Tanaka i Mutai 1980
Bifidobacterium Medium	Lauer i Kandler 1976
Medi Gylleberg millorat	Evison i Morgan 1978
NPNL Medium	Teraguchi <i>et al.</i> 1978
BL medium	Teraguchi <i>et al.</i> 1978
Bifidobacterium Medium	Tanaka i Mutai 1980
NY-6	Resnick i Levin 1981a
NY-7	Resnick i Levin 1981b
HBSA	Mara i Oragui 1983
Modified MRS Medium	Chang <i>et al.</i> 1983
Modified RCM Medium	Hunger 1986
TOS Medium	Sonoike <i>et al.</i> 1986
Modified TOS Medium	Sonoike <i>et al.</i> 1986
TPY Medium	Scardovi 1986
BIM-25 agar	Muñoa i Pares 1988
Columbia Propionic Acid Medium	Beerens 1990
"Bif" medium	Pacher i Kneifel 1996
mMRSox	Gómez <i>et al.</i> 1998
BL-OG	Lim <i>et al.</i> 1995
Rogosa agar	Tamime <i>et al.</i> 1995
RB agar	Hartemink <i>et al.</i> 1996
Modified RCPB Medium	Rybka i Kailasapathy 1996
BFM	Nebra i Blanch 1999
MW agar	Rada i Petr 2000

Posteriorment, es va proposar el gènere *Bifidobacterium* com indicador de contaminació fecal utilitzant el medi de Gylleberg i Niemela (Evison i James 1973). Aquests van estudiar la relació de *Bifidobacterium*, *E. coli* i estreptococs fècals en femtes, aigües residuals i rius de Gran Bretanya. També van analitzar la supervivència i la capacitat de multiplicació d'aquestes en el medi ambient. Van detectar que les densitats de les poblacions d'*E. coli*, estreptococs i *Bifidobacterium* es mantenien en totes les mostres analitzades. Així van poder afirmar que *Bifidobacterium* podia ser un indicador de contaminació fecal perquè estaven presents en totes les mostres analitzades.

Altres estudis van intentar millorar el medi de Gylleberg i Niemela afegint 5 mg/l d'àcid nalidíxic al medi (Evison i Morgan 1978). Amb aquest medi van estudiar la distribució de les diferents espècies de *Bifidobacterium* en l'intestí de les persones de diferents edats. Van obtenir dades de diferents creixements de soques de *Bifidobacterium* en relació a diferents paràmetres físico-químics com la temperatura, l'oxigen dissolt en aigua, concentracions de glucosa i de les proteïnes aplicades al medi. Aquests anàlisis van concloure que era molt poc probable que es pogués donar un creixement de *Bifidobacterium* en aigües ambientals i residuals.

Posteriorment Resnick i Levin van descriure un nou medi el YN-6. En aquest medi van afegir agents selectius com l'àcid nalidíxic i sulfat de neomicina. Com agent diferencial van utilitzar el verd de bromocresol. Van aplicar aquest nou medi a recomptes de *Bifidobacterium* en fèntes i aigües residuals. Van observar que no era prou selectiu ja que la microbiota acompanyant que creixia al medi era molt abundant (Resnick i Levin 1981a). En posteriors estudis van utilitzar modificacions d'aquest medi, el YN-7 (Resnick i Levin 1981b). Cal tenir en compte que l'any 1958 ja es va suggerir que *Bifidobacterium* podria ser un indicador de contaminació fecal (Mossel 1958) però aquesta falta d'un medi selectiu adequat per l'anàlisi d'aigües per aquest gènere sempre va impossibilitar un estudi profund en el medi ambient. Aquesta falta d'un medi selectiu per *Bifidobacterium* en aigües es produït per varies raons tal i com ja s'ha comentat anteriorment (Ballongue 1998; Silvi *et al.* 1996):

1. La gran diversitat d'espècies amb diferents característiques fisiològiques. Actualment es reconeixen fins a 33 espècies.
2. Els requeriments nutricionals que tenen (vitamines, factors de creixement) per créixer en medis sintètics.
3. La seva fisiologia anaeròbia.
4. Un període de creixement lent (2-5 dies).

Durant la dècada dels anys 80 es va descriure el medi Human Bifido Sorbitol Agar (HBSA), un medi selectiu i diferencial per a l'aïllament i enumeració de bifidobactèries en aigües residuals i femtes d'humans i animals. Aquest medi es va basar en la diferenciació de les soques fermentadores de sorbitol com a indicadores de la contaminació fecal humana (Mara i Oragui 1983).

Es van dissenyar altres medis selectius per *Bifidobacterium* com el medi selectiu i diferencial BIM-25 per a l'enumeració de bifidobactèries en aigües ambientals i aigües residuals (Muñoa i Pares 1988). L'agent selectiu que van utilitzar va ser l'antibiòtic àcid iodocetat i com agent diferencial el clorur 2,3,5, trifenil-tetrazoli (TTC). Van observar la necessitat d'utilitzar substàncies que ajudessin a recuperar les cèl·lules malmeses en l'ambient degut a les condicions adverses a què estan sotmeses. Primer van incubar les mostres en el medi ric RCA durant cinc hores. Posteriorment realitzaven una incubació en el medi selectiu BIM-25 durant cinc dies. Aquests medi va presentar una certa limitació ja que es va observar el creixement de la microbiota acompanyant en el medi en les enumeracions d'aigües residuals.

En els anys 90 Beerens va realitzar una modificació del medi Columbia Blood Agar per tal d'aconseguir un medi selectiu i electiu per a la recuperació de bacteries de *Bifidobacterium* (Beerens 1990). Tot i que aquest medi també va presentar un creixement d'altres bacteries pertanyents a altres gèneres (com a la resta de medis realitzats fins el moment), va permetre recuperar totes les espècies de *Bifidobacterium* descrites fins el moment.

El medi HBSA descrit a principis dels anys 80, es va tornar a utilitzar per a realitzar les enumeracions de *Bifidobacterium* en diferents punts d'un riu amb grans nivells de contaminació fecal (Jagals i Grabow 1996). Aquests van proposar com a indicadors de contaminació fecal *E. coli*, els estreptococs fecals i com indicadors de l'origen de la contaminació fecal la proporció d' *E. coli* /estreptococs i l'enumeració de bifidobactèries fermentadores de sorbitol utilitzant el medi HBSA. Van tenir problemes amb les enumeracions de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol, en alguns punts les concentracions d'aquestes eren molt baixes i en altres molt altes. Van observar que la supervivència de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol era baixa.

Nebra i Blanch (1999) van crear un medi molt selectiu per a l'enumeració i recuperació de bifidobactèries en aigües residuals i productes làctics. En aquest cas es va reduir molt l'enumeració de la microbiota acompanyant, degut a la seva gran selectivitat, però es va dificultar la recuperació de tres de les espècies de *Bifidobacterium* en determinades mostres (Nebra i Blanch 1999).

Long i Arango (2001) van utilitzar el medi HBSA per a estudiar diferents variacions del medi en mostres d'aigües residuals. Van observar que havia soques fermentadores de sorbitol que no pertanyien al gènere *Bifidobacterium* i creixien a les diferents variacions del medi. També van observar que les soques fermentadores en el medi pertanyien majoritàriament a les espècies *B. adolescentis* i *B. breve*. A més a més, aquestes espècies tenien un nivell de recuperació òptim en el medi HBSA quan es comparaven les enumeracions obtingudes per les dues soques respecte aquelles obtingudes en medis rics (Long i Arango 2001).

Com s'ha comentat anteriorment els requeriments nutricionals de *Bifidobacterium* són molt complexos i varien segons les espècies. Per aquest motiu la majoria de medis descrits fins el moment per *Bifidobacterium* es basen en medis rics els quals s'afegeixen agents selectius. En molts casos aquests són antibiòtics. La incorporació d'aquests agents selectius provoca la inhibició de la microbiota acompanyant però també pot afectar una part de la població de bifidobactèries com passa a la majoria de medis selectius per *Bifidobacterium* que no detecten a totes les espècies del gènere (Muñoa i Pares 1988; Pacher i Kneifel 1996; Resnick i Levin 1981b; Tanaka i Mutai 1980). Per aquest motiu existeixen tantes propostes de medis per aquest gènere per què no s'acaba de trobar un medi selectiu adient. A més a més, la majoria dels medis selectius per a *Bifidobacterium* descrits fins el moment són complicats de preparar i/o necessiten un temps d'incubació de 2 a 5 dies (Lim *et al.* 1995; Silvi *et al.* 1996), el que suposa un inconvenient per la seva utilització en anàlisis rutinaris de mostres ambientals.

Per aquests motius, els objectius d'aquest capítol han estat:

- Valorar l'eficiència de tres medis selectius de *Bifidobacterium* per al seu ús en l'enumeració d'aquest gènere en mostres d'aigües residuals urbanes (majoritàriament humanes) i d'aigües residuals d'escorxadors (majoritàriament animals).
- Valorar les diferents proporcions de les poblacions bacterianes per a intentar discernir l'origen de contaminació fecal en mostres d'aigües residuals. Avaluar el potencial del medi HBSA per a discernir l'origen de contaminació fecal en mostres d'aigües residuals basant-se en la detecció diferencial de les bifidobactèries fermentadores del sorbitol.

2.2. Materials i Mètodes

2.2.1. Medis de cultiu, condicions de creixement i soques de referència

El medi utilitzat per a la recuperació i l'enumeració de microorganismes anaerobis totals va ser el medi Columbia Blood Agar, CBA, (Difco, Detroit, Mich) suplementat amb 5 g/L de glucosa (Panreac, Espanya) i 0,5 g/L de L-cisteïna-HCl (Sigma, St. Louis, Mo), sCBA tal i com s'ha descrit en estudis previs (Nebra i Blanch 1999)(Annex I).

S'ha valorat l'ús de tres medis selectius diferents per a la detecció i l'enumeració de *Bifidobacterium* en aigües residuals urbanes i col·lectors d'escorxadors d'animals. En la Taula 2.2 es detalla un resum dels components dels tres medis selectius analitzats. Aquests han estat:

- Beerens: És un medi selectiu i electiu per a l'aïllament de les espècies de *Bifidobacterium*. És una modificació del medi Columbia Agar (Difco). A aquest medi comercial s'hi va afegir 5 g/L de glucosa (Panreac) com a font de carboni i 0,5 g/L de cisteïna (Sigma) que és la font de nitrogen essencial, i a més a més té la funció addicional de reduir el potencial redox del medi. Posteriorment a l'esterilització del medi s'hi va afegir 5 mL/ L d'àcid propiònic ajustant el pH a 5 (Annex I). La disminució de pH augmenta la selectivitat i potencia el creixement de les soques de *Bifidobacterium* en el medi (Beerens 1990).
- BFM: És un medi selectiu sense antibiòtics per a l'enumeració i l'aïllament de *Bifidobacterium* en mostres ambientals i d'aliments (Nebra i Blanch 1999). Les principals fonts de carboni del medi són la lactulosa i el midó. Presenta com agents selectius el blau de metilè i el clorur de liti. L'àcid propiònic actua com un agent electiu. El medi BFM té com a font d'aminoàcids peptona, triptona, extracte de carn i de llevat. La cisteïna és la font de nitrogen essencial, i a més a més té la funció addicional de reduir el

potencial redox del medi. Les vitamines adicionades com a factors de creixement son la tiamina i la riboflavina (Annex I).

- **HBSA:** És un medi selectiu i diferencial per a l'aïllament de les soques de *Bifidobacterium* en mostres fecals (Mara i Oragui 1983). Aquest medi ens diferencia les soques de *Bifidobacterium* que fermenten sorbitol de les que no. Les soques fermentadores de sorbitol presenten una coloració groga de les colònies degut a l'indicador de pH que porta el medi. La resta de colònies presenten una coloració blanca o transparent. S'ha estimat que només les soques d'origen humà són capaces de fermentar el sorbitol (Mara i Oragui 1983). Per tant, aquest medi ens permetria diferenciar l'origen de la contaminació en el moment de l'enumeració. La principal font de carboni del medi és el sorbitol. Els antibiòtics polimixina B, àcid nalixídic, i sulfat de kanamicina actuen com agents selectius. La polipeptona (BBL), casaminoàcids i l'extracte de carn són la font d'aminoàcids. La cisteïna també té un paper com a font de nitrogen essencial, i permet reduir el potencial redox del medi. L'indicador de pH del medi és el porpra de bromocresol (Annex I).

Taula 2.2. Components principals dels tres medis selectius de *Bifidobacterium* analitzats:

Medis	Font de carboni	Font de nitrogen	pH	Selectivitat	Antibiòtics	Diferencial
Beerens	Glucosa	Cisteïna, extracte de llevat, caseïna i proteasa peptonada	5	Àcid propiònic	No	No
BFM	Lactulosa i midó	Cisteïna, peptona, triptona, extracte de carn i llevat	5.5	Blau de metilè i clorur de liti.	No	No
HBSA	Sorbitol	Cisteïna, BBL, casaminoàcids i extracte de carn	6.9	Polimixina B, àcid nalixídic, i sulfat de kanamicina	Si	Si

Les mostres ambientals analitzades amb aquests tres medis es van incubar a 37°C durant 48 hores dins de gerres d'anaerobiosis (GasPak, BBL, Hampshire, Anglaterra) que contien generadors d'atmosfera de CO₂ (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemanya). En el cas del medi BFM es van incubar fins 72 h a 37°C segons el creixement observat a les 48 h (Nebra i Blanch 1999).

El medi utilitzat per a l'enumeració de coliformes fecals va ser el mFC agar (Difco) (Annex I). Les mostres es van incubar a 44.5°C durant 24 h, aquesta temperatura d'incubació i les característiques selectives del medi només permeten créixer aquelles poblacions de coliformes que tenen un origen fecal. Les colònies de color blau ens indiquen els coliformes fecals que han fermentat l'àcid rosòlic que porta el medi. En aquesta oxidació de l'àcid rosòlic el color vermell del medi passa a blau acolorint les colònies que enumerarem (Grabow 1998).

El medi mEA (Difco) es va utilitzar per a l'enumeració d'enterococs. Les mostres es van incubar a 37°C durant 48 h (Annex I). Aquest medi conté azida sòdica com inhibidor de la microbiota Gram negativa i el clorur de trifeníl-2,3,5 tetrazòlic (TCC) com indicador incolor que es reduït a vermell per aquest gènere. Les colònies d'enterococs en aquest agar apareixen de color vermell.

El medi Bile Esculine Agar (Difco) (BEA) es va utilitzar per a la confirmació de les colònies, crescudes en el medi mEA (Annex I), com a pertanyents al gènere *Enterococcus*. Aquest medi porta àcid biliar i esculina que pot ser hidrolitzada a esculetina. Les colònies pertanyents al gènere *Enterococcus* presenten una coloració negra quan es produeix la hidròlisi de l'esculina. El temps d'incubació va ser de 4h a 37°C (Figueras *et al.* 1998).

Les espores de clostridis sulfit-reductors (clostridis) es van enumerar per xoc tèrmic de les mostres a 80°C durant 10 minuts com prèviament s'ha descrit (Figueras *et al.* 1998). Posteriorment, 1 mL de cada una de les dilucions va ser inoculada en 50 mL de medi Sulphite Polymyxin Sulfadiazine liquid (SPS) Agar (Scharlau, Barcelona, Espanya). Els tubs inoculats es van barrejar per homogeneïtzar la solució i es va deixar solidificar el medi. Posteriorment els tubs

es van incubar a 37°C durant 24 h. Es va realitzar una enumeració de les espores crescudes en el tub que presenten una coloració negra (Annex I).

Les soques tipus de *Bifidobacterium* utilitzades per a la valoració del medi HBSA es detallen en la Taula 2.3.

Taula 2.3. Soques tipus de *Bifidobacterium* utilitzades per a determinar la fermentació del sorbitol en el medi HBSA. ^TSoca tipus.

Espècies	Soca	Espècies	Soca
<i>B. adolescentis</i>	DSM 20083 ^T	<i>B. infantis</i>	DSM 20088 ^T
<i>B. angulatum</i>	DSM 20098 ^T	<i>B. longum</i>	DSM 20219 ^T
<i>B. animalis</i>	DSM 20104 ^T	<i>B. lactis</i>	DSM 20223 ^T
<i>B. asteroides</i>	DSM 20089 ^T	<i>B. magnum</i>	DSM 20222 ^T
<i>B. bifidum</i>	DSM 20456 ^T	<i>B. mervicicum</i>	DSM 6492 ^T
<i>B. boum</i>	DSM 20432 ^T	<i>B. minimum</i>	DSM 20102 ^T
<i>B. breve</i>	DSM 20213 ^T	<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20438 ^T
<i>B. catenulatum</i>	DSM 20103 ^T	<i>B. pseudolongum</i>	DSM 20099 ^T
<i>B. choerinum</i>	DSM 20434 ^T	<i>B. pullorum</i>	DSM 20433 ^T
<i>B. coryneforme</i>	DSM 20216 ^T	<i>B. ruminantium</i>	DSM 6489 ^T
<i>B. cuniculi</i>	DSM 20435 ^T	<i>B. saeculare</i>	DSM 6531 ^T
<i>B. dentium</i>	DSM 20084 ^T	<i>B. scardovii</i>	DSM 13734 ^T
<i>B. gallinarum</i>	DSM 20670 ^T	<i>B. subtile</i>	DSM 20096 ^T
<i>B. globosum</i>	DSM 20092 ^T	<i>B. suis</i>	DSM 20211 ^T
<i>B. indicum</i>	DSM 20214 ^T	<i>B. thermophilum</i>	DSM 20210 ^T

Les soques tipus proviments de la col·lecció DSM van ser enviades al laboratori liofilitzades. Es van resuspendre en el medi líquid i ric Reinforced Clostridial Medium, (RCM) (Difco, Detroit, Mich). Posteriorment es van incubar en tubs de vidres estèrils a 37°C durant 48 hores dins de gerres d'anaerobiosis (GasPak) que contenen generadors d'atmosfera de CO₂ (Anaerocult A). Posteriorment, 1.5 mL del creixement de les soques es van congelar en criovials estèrils amb un 10% de glicerol. Del mateix creixement en líquid es va comprovar la viabilitat i puresa de les soques realitzant diferents estries en el medi ric CBA suplementat tal i com s'ha indicat anteriorment. Aquestes estries es van incubar també a 37°C durant 48 hores dins de gerres d'anaerobiosis (GasPak) que contenen generadors d'atmosfera de CO₂ (Anaerocult A).

2.2.2. Comparació de tres medis selectius per a la recuperació de *Bifidobacterium* en aigües residuals

2.2.2.1. Enumeració de les diferents poblacions bacterianes

L'enumeració de *Bifidobacterium* es va realitzar mitjançant els tres medis selectius descrits anteriorment, i seguint els procediments indicats pels diferents autors: (Beerens 1990; Mara i Oragui 1983; Nebra i Blanch 1999). L'enumeració de les bifidobactèries es va realitzar en totes les mostres d'aigües residuals municipals i en mostres d'aigües residuals d'escorxadors. La contaminació fecal de les aigües residuals municipals cal considerar-la com d'origen principalment humà i les aigües residuals d'escorxadors tenen principalment un origen animal. Es van realitzar un banc de dilucions seriades de les mostres en Ringer ¼ i es va inocular alíquotes de 100µL de cada dilució i es van sembrar en cada un dels medis selectius per *Bifidobacterium*. El període d'incubació va ser de 48 h a 37°C sota condicions anaeròbies (GasPak, BBL, Hampshire, Anglaterra) amb generadors d'atmosfera de CO₂ (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Anglaterra). Posteriorment es va procedir a l'enumeració de les colònies crescudes en cada una de les plaques, atenent a les especificacions de cada medi.

2.2.2.2. Hibridació colonial amb la sonda Bif

Les colònies crescudes en cada un dels diferents medis de cultius selectius per a *Bifidobacterium* es van confirmar mitjançant la tècnica d'hibridació colonial amb una sonda molecular, Bif, marcada amb digoxigenina i específica per aquest gènere. Aquesta sonda Bif està dissenyada en un fragment de 28 nucleòtids de la seqüència de l'ADN que codifica pel gen del 16S rRNA. La sonda presenta una T_m de 84°C, i ha estat descrita prèviament (Nebra *et al.* 2002).

La seqüència de la sonda Bif és:

5'- TCT ACA CAT TCC ACC GTT ACA CCG GGA A -3'

Està ubicada entre les posicions 662 a 689 respecte l'enumeració de la seqüència del gen del 16S rRNA d' *Escherichia coli* (Brosius *et al.* 1981). L' extrem 5' es va marcar amb digoxenina (MGW-Biotech, Alemanya). La temperatura d'hibridació que es va utilitzar per a la sonda genèrica va ser de 73°C.

El protocol d'hibridació ha estat prèviament definit i descrit (Nebra *et al.* 2002). Aquest protocol es va utilitzar en aquest estudi per a la confirmació de les colònies crescudes en les plaques dels diferents medis selectius estudiats al gènere *Bifidobacterium*. El procediment que es va seguir es detalla en els tres següents apartats:

Transferència i lisi cel·lular

Per tal de realitzar la hibridació colonial com a mètode de confirmació de les soques crescudes en els diferents medis de pertànyer al gènere *Bifidobacterium*, es va realitzar una transferència de les colònies crescudes en les diferents plaques dels medis selectius a una membrana de niló. El protocol que es va seguir és el següent:

- Transferència de les colònies a una membrana de niló carregades positivament (Hibond-N+, Arnersharn Pharmacia Biotech, Anglaterra) per contacte directe. Posteriorment es va afegir a la membrana una petita estria de la soca *B. dentium* DSM 20084^T procedent d'un cultiu de 48h en placa crescut a 37°C en condicions anaeròbies del medi ric CBA com a control positiu del procés de la hibridació colonial.

- Lisi cel·lular sobre paper 3MM (Whatman, Anglaterra) saturat amb solució de lisi (10mM Tris-HCl, 250mM sacarosa, 5 mg/mL de lizozim, pH 7,5) (Annex II) durant 1 h a 37°C (Kaufmann *et al.* 1997).

- Desnaturalització sobre paper 3MM saturat amb 0,1 M NaOH (Panreac, Espanya) (Annex II) durant 10 minuts.

- Neutralització sobre paper 3 MM saturat amb 0,1 Acetat Sòdic

(Merck, Alemanya) a pH 6,0 (Annex II) durant 2 min.

Els passos de desnaturalització i neutralització es van realitzar d'acord amb el protocol descrit prèviament per altres autors (Schaper i Jofre 2000).

- Rentat de les membranes posant-les sobre paper 3MM saturat amb 2XSSC, 0,1 % SDS (Annex II) durant 4 min.
- Fixació de l'ADN a la membrana de niló per assecament a 80°C durant 10 min i radiació UV (4 min de la cara de ADN i 2 min de la cara contrària).

Hibridació colonial

La hibridació colonial amb la sonda Bif es va realitzar de la següent manera:

- Rentat de les membranes amb solució 3XSSC, 0,1% SDS (Annex II) a 68°C durant 1 h.
- Prehibridació amb solució d'hibridació (Annex II) durant 1 h a 73°C.
- Hibridació durant tota la nit (ON) a 73°C amb solució d'hibridació que contenia una concentració de la sonda Bif de 2,5 pmol/ml.

Revelat de la hibridació amb la sonda Bif

La detecció de la sonda marcada amb digoxigenina es va realitzar pel mètode luminescent de detecció de l'activitat fosfatasa alcalina. Es va utilitzar com a substrat el CSPD (Disodium 3-(4-methoxy-spirofl, 2-dioxetane-3, 2'-(5'chloro) tricyclo[3.3.1.^{3,7}]decan)4-yl) phenyl phosphatase) per a la detecció de la fosfatasa alcalina (Annex II).

Aquest procés es va realitzar de la següent manera:

- Eliminació de la solució d'hibridació. Aquesta solució pot ser utilitzada fins a tres vegades. Per això, es necessari mantenir-la a -20°C.

- Rentat de les membranes a la temperatura d'hibridació durant 30 min (10 min + 20 min) amb la solució 5XSSC, 0,1% SDS (Annex II).

- Rentat de les membranes a temperatura ambient durant 30 min (10 min + 20 min) amb la solució 2XSSC, 0,1% SDS (Annex II) en un agitador horitzontal (Certomat®, B. Braun, Melsungen, Alemanya) a 120 rpm.

- Revelat de la hibridació ADN-ADN mitjançant la detecció immunològica de la digoxigenina:

- ✓ Rentat de les membranes durant 1-5 min amb tampó de rentat (Annex II).

- ✓ Incubació durant 30 min en tampó 2 (es van canviar les plaques de Petri en què es van rentar les membranes per unes de noves).

- ✓ Incubació durant 30 min en tampó 2 (Annex II) que contenia una concentració 1:10.000 d'anticòs anti-digoxigenina conjugat amb fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya). Es recomana centrifugar breument el vial que conté l'anticòs i agafar una alíquota de la part superior per a evitar agregats.

- ✓ Rentat de les membranes durant 2 x 15 min amb tampó de rentat (Annex II) per a eliminar l'excés d'anticòs.

- ✓ Equilibrar les membranes amb el tampó 3 (Annex II) durant 2-5 min.

✓ Incubació de les membranes durant 5 min en la solució de substrat. Aquesta està constituïda per una dilució 1: 100 de CSPD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanya) en tampó 3. Es van posar les membranes sobre un film d'acetat, amb la cara de l'ADN cap a dalt, i es va repartir sobre elles la solució de substrat (250-500 µl per membrana). Es va posar un film d'acetat nou a sobre de les membranes vigilant que no es formessin bombolles d'aire, i es deixà incubar 5 min.

✓ Les membranes es van introduir en bosses de plàstic i es van segellar. Es van incubar a 37°C durant 10 min.

✓ Posteriorment, les membranes es van exposar 60-120 min en films de radiografia (Curix RP2, Agfa-Gevaert, Bèlgica). El senyal que emet el producte de la fosfatasa alcalina amb el substrat CSPD és en forma d'emissió de llum. Aquest es pot percebre quan posem en contacte les membranes amb films de fotografia. El senyal positiu presenta un color negre en el film, i en cas contrari no hi ha cap tipus de senyal.

2.2.2.3. Presa de mostres d'aigües residuals urbanes i d'escorxadors

Les mostres d'aigües residuals es van prendre en recipients de plàstic estèrils. El transport es va efectuar en neveres mantenint les mostres a 4°C, i des de la recollida de la mostra fins al seu processament no van passar més de quatre hores (ISO 5667/3) (Anònim 1998). Es van analitzar un total de 17 mostres d'aigües residuals (6 d'origen humà, 5 d'origen boví, 2 d'origen porcí i 4 d'aviram) sense tractar, d'estacions depuradores d'aigües residuals urbanes (EDARs) i de tancs d'homogeneïtzació d'aigües residuals d'escorxadors. Aquestes mostres es van analitzar en l'estudi comparatiu dels tres medis selectius de *Bifidobacterium*. Les característiques principals de les EDARs i col·lectors d'escorxadors s'indiquen en la Taula 2.4. També es van determinar el nombre d'anaerobis totals i coliformes fecals per tal de tenir una referència de la càrrega bacteriana de les mostres.

El recompte de *Bifidobacterium* es va realitzar mitjançant un banc de dilucions decimals seriades en Ringer $\frac{1}{4}$ i sembra en placa de 100 μ L de les diferents dilucions per extensió en els diferents medis selectius (Beerens, HBSA i BFM). Les mostres d'aigües residuals analitzades amb aquests tres medis es varen incubar a 37°C durant 48 hores en gerres d'anaerobiosis que contenien generadors d'atmosfera de CO₂.

L'anàlisi comparatiu dels nivells de recuperació dels diferents medis selectius per a *Bifidobacterium* en mostres d'aigües residuals es va realitzar mitjançant una anàlisi de la variància pel mètode de Bonferroni utilitzant el paquet de programes informàtics Statgraphics 5.0. Posteriorment, també es van valorar les diferències en la recuperació de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol en mostres d'origen humà i mostres d'origen animal.

Es va realitzar una enumeració coliformes fecals de les aigües ambientals pel mètode de la filtració per membrana (FM) (Clesceri 1998) (Annex I). Es van utilitzar membranes d'èsters de cel·lulosa (Ez-PakTM Membrane Millipore) amb un porus de 0,45 μ m en què la majoria de microorganismes a analitzar queden retinguts a la membrana per que tenen un diàmetre superior a aquest. L'enumeració de les poblacions de coliformes fecals es va realitzar mitjançant un banc de dilucions decimals seriades en Ringer $\frac{1}{4}$ (Oxoid). A continuació, es va filtrar un volum d'1 mL de cada dilució. Un cop passada la mostra pel filtre es va posar a incubar aquest filtre sobre el medi selectiu mFC per fer un recompte directe de les colònies sobre la superfície de la membrana.

Es van incubar a 44.5°C durant 24 h, aquesta temperatura d'incubació i les característiques selectives del medi només permeten créixer aquelles poblacions de coliformes que tenen un origen fecal.

El recompte d'anaerobis totals es va realitzar amb un banc de dilucions seriades de les mostres en Ringer $\frac{1}{4}$ i es va inocular alíquotes de 100 μ L de cada dilució i es van sembrar en el medi ric CBA. El període d'incubació va ser de 48 h a 37°C sota condicions anaeròbies (GasPak, BBL, Hampshire, Anglaterra) amb

generadors d'atmosfera de CO₂ (Anaerocult Un, Merck, Darmstadt, Anglaterra). Posteriorment es va procedir a l'enumeració de les colònies crescudes en cada una de les plaques.

Taula 2.4 Característiques principals de les EDARs i escorxadors. ND: No determinat.

	Cabal (m³/dia)	Habitants	Temps de residència	Tractament
EDAR 1 (Taradell)	2000	5.000	2.2 dies	Biològic (Fangs activats)
EDAR 2 (Gavà)	72000	390.000	4 hores	Biològic (Fangs activats)
EDAR 3 (St. Adrià)	670000	1.500.000	1 hora	Físic – químic
EDAR 4 (Ampolla)	ND	1.500	ND	Biològic (Fangs activats)
	Lloc	Bestiar	Tractament	
Escorxador 1	St. Eugènia de Berga	Porcí	Tanc col·lector	
Escorxador 2	Figueres	Porcí	Tanc col·lector	
Escorxador 3	Figueres	Boví	Tanc col·lector	
Escorxador 4	Figueres	Boví	Tanc col·lector	
Escorxador 5	Amposta	Aviram	Tanc col·lector	
Escorxador 6	Tortosa	Aviram	Tanc col·lector	

2.2.2.4. Avaluació de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol mitjançant el medi selectiu i diferencial HBSA

Per a valorar la capacitat de recuperació de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol en el medi HBSA es van fer créixer totes les soques tipus de *Bifidobacterium* descrites fins al moment en aquest medi. El llistat de soques tipus es detalla en la Taula 2.3. En un primer pas es van repicar amb hisòps estèrils, les soques de *Bifidobacterium* congelades a -80°C i es van realitzar petites estries de cada una de les soques en el medi ric CBA. Això va permetre disposar de cultius nous i metabòlicament actius. El període d'incubació va ser de 48 h a 37°C sota condicions anaeròbies amb generadors d'atmosfera de CO₂. Posteriorment, també amb hisòps estèrils i en condicions d'esterilitat es van repicar cada una de les estries crescudes en el medi CBA i es van sembrar en el medi HBSA per tal de determinar la capacitat de fermentació del sorbitol per cada una de les soques tipus. El període d'incubació també va ser de 48 h a 37°C sota condicions anaeròbies amb generadors d'atmosfera de CO₂. En aquest medi va ser molt important realitzar la lectura a les 48 h ja que la coloració groga de les colònies amb el temps es pot perdre donant falsos negatius, i el cas invers, colònies no fermentadores de sorbitol amb un creixement excessiu poden acidificar el medi i fer virar l'indicador del pH donant falsos positius. Per aquest motiu aquest procés es va repetir quatre vegades per a confirmar els patrons de fermentació del sorbitol.

2.2.3. Determinació de la contaminació fecal mitjançant les diferents proporcions bacterianes en aigües residuals

Es van calcular les diferents proporcions entre poblacions bacterianes per a valorar el seu ús potencial com a indicadors de l'origen de la contaminació fecal. Per aquest motiu es van enumerar diferents poblacions bacterianes en diversos orígens (anaerobis totals, coliformes totals, enterococs fecals, espores de clostridis sulfitereductors, bifidobactèries totals i bifidobactèries fermentadores de sorbitol).

Es van analitzar un total de 34 mostres d'aigües residuals (16 d'origen humà, 4 d'origen boví, 6 d'origen porcí i 8 d'aviram) sense tractar, de plantes depuradores d'aigües residuals i de col·lectors d'homogeneïtzació (descrites en la Taula 2.4). Les mostres d'aigües residuals es van prendre en recipients de plàstic estèrils com s'ha descrit a l'apartat 2.2.2.3. L'enumeració de coliformes fecals es va realitzar com s'ha descrit a l'apartat 2.2.2.3. Per a l'enumeració d'enterococs es va utilitzar també la tècnica de filtració per membrana. Es va realitzar un banc de dilucions decimals seriades en Ringer $\frac{1}{4}$ (Oxoid) de les mostres. A continuació, es va filtrar un volum d'1 mL de cada una de les dilucions. Un cop passada la mostra pel filtre es va posar a incubar aquest filtre sobre el medi selectiu mEA. Les plaques amb les membranes es van incubar a 37°C durant 48 h. Posteriorment a aquest període, les membranes utilitzades per a l'enumeració d'enterococs es van transferir al medi "Bile Esculine Agar" per a confirmar les enumeracions d'enterococs, com prèviament s'ha descrit en l'apartat 2.2.1. Les espores de clostridis sulfit-reductors (clostridis) es van enumerar per xoc tèrmic tal i com s'ha descrit prèviament en l'apartat 2.2.1. El recompte d'anaerobis totals es va realitzar mitjançant un banc de dilucions decimals seriades en Ringer $\frac{1}{4}$ i sembra en placa de 100 µl en el medi ric CBA de les diferents dilucions per extensió. Les mostres d'aigües residuals analitzades es van incubar a 37°C durant 48 hores en gerres d'anaerobiosis que contenen generadors d'atmosfera de CO₂.

El recompte de bifidobactèries totals i fermentadores de sorbitol es va realitzar mitjançant un banc de dilucions decimals seriades en Ringer $\frac{1}{4}$ i sembra en placa de 100 µL en el medi en el medi HBSA com s'ha ja s'ha descrit prèviament en l'apartat 2.2.2.1.

A partir dels valors obtinguts en les enumeracions d'aquestes poblacions bacterianes es van considerar diferents proporcions entre elles per a avaluar el seu ús en la determinació de l'origen de la contaminació fecal en aigües. Les proporcions considerades van ser:

1. bifidobactèries fermentadores de sorbitol/ bifidobactèries totals (G/T).
2. bifidobactèries fermentadores de sorbitol/ anaerobis totals (G/AT).
3. bifidobactèries fermentadores de sorbitol / coliformes fecals (G/CF).
4. bifidobactèries fermentadores de sorbitol /enterococs fecals(G/ENT).
5. clostridis /bifidobactèries fermentadores de sorbitol (CL/G).
6. coliformes fecals/ enterococs fecals (CF/ENT).

2.3. Resultats

2.3.1. Comparació dels tres medis selectius per a la recuperació de *Bifidobacterium* en aigües residuals

Les aigües residuals d'entrada a les depuradores i dels tancs d'homogeneïtzació d'escorxadors analitzades van presentar una càrrega bacteriana similar pels diferents paràmetres microbiològics estudiats com es detalla a la Taula 2.5. La càrrega bacteriana de coliformes fecals va ser al voltant de 7 unitats logarítmiques UFC/100mL exceptuant dues mostres d'escorxadors (PG2 i PL2). El nombre de coliformes fecals està un logaritme per sobre en la mostra d'escorxadors de porc (PG2) i dos logaritmes per sota en la mostra d'escorxador de pollastre (PL2). El nombre d'anaerobis totals va ser entre 8-9 unitats logarítmiques UFC/100mL en tots els casos, exceptuant una mostra d'escorxador de pollastres (PL2). Habitualment, es va detectar una concentració entre un i dos logaritmes superior d'anaerobis totals que de coliformes fecals.

L'anàlisi comparatiu dels nivells de recuperació dels diferents medis selectius de *Bifidobacterium* en mostres d'aigües residuals es van realitzar mitjançant una anàlisi de la variança. Aquesta anàlisi ens va indicar que hi haver diferències en la recuperació de tots tres medis. Es va observar que la recuperació del medi HBSA i Beerens va ser similar, i que tots dos presenten una diferència significativa en la recuperació respecte el medi BFM (ANOVA, $P < 0,05$).

El recompte de *Bifidobacterium* obtinguts en cada una de les plantes d'aigües residuals d'entrada i escorxadors emprant els tres medis selectius diferents, es detallen en la Taula 2.5 en forma d'unitats logarítmiques UFC/100mL. La càrrega bacteriana de *Bifidobacterium* va ser molt similar per a totes les mostres essent entre 6-7 unitats logarítmiques UFC/100mL. Normalment, el nombre de bifidobactèries va ser lleugerament més elevat que el de coliformes fecals en cada mostra. Ara bé, les bifidobactèries es van trobar en una concentració d'entre 1 i 2 logaritmes inferior respecte els microorganismes anaerobis totals.

El medi selectiu Beerens va presentar sempre valors de recuperació superiors als altres dos medis analitzats. En aquest medi les colònies de *Bifidobacterium* presenten una coloració blanca (Figura 2.1) al cap de 48 h d'incubació a 37°C en condicions d'anaerobiosi.

Les enumeracions de bifidobactèries en el medi HBSA van ser molt similars a les obtingudes en el medi Beerens, tot i que van presentar una recuperació menor no significativa. En el medi HBSA les colònies tenen dues coloracions diferents (Figura 2.2) al cap de 48 h d'incubació a 37°C en condicions d'anaerobiosi. Les colònies de color groc són bifidobactèries fermentadores de sorbitol, al utilitzar aquest sucre acidifiquen el medi fent virar l'indicador de pH (el bromocresol porpra). Per altra banda trobem les colònies blanques que pertanyen a les bifidobactèries no fermentadores de sorbitol i que no produeixen el canvi de pH necessari per a virar l'indicador.

Finalment, el medi BFM va tenir un valor de recuperació menor respecte els dos medis anteriors, que es situa al voltant d'un logaritme menys. Les colònies de *Bifidobacterium* crescudes en aquest medi són blanques-transparentes al cap de 48 a 72 h d'incubació a 37°C en condicions d'anaerobiosi (Figura 2.3).

La confirmació de les colònies crescudes en els diferents medis selectius per *Bifidobacterium* es va realitzar per la tècnica de la hibridació colonial. Amb aquesta tècnica es pot realitzar una enumeració més acurada del nombre de bifidobactèries presents a les mostres (Figura 2.4). Les enumeracions obtingudes amb la tècnica de la hibridació colonial van ser una mica més baixes que el recompte en placa en tots tres medis. Aquest fet ens indica que no totes les colònies crescudes en les plaques d'aquests medis pertanyen al gènere *Bifidobacterium*. No obstant, les proporcions de recuperació de les bifidobactèries una vegada confirmades es mantenen en el mateix logaritme; essent aproximadament de 7 unitats logarítmiques UFC/100mL pels medis Beerens i HBSA, i de 6 unitats logarítmiques UFC/100mL pel medi BFM.

Taula 2.5. Nombre de *Bifidobacterium* en les aigües residuals a l'entrada de cada una de les plantes i dels diferents escorxadors en els diferents medis. Els valors s'expressen \log_{10} UFC/100mL. Mostres: **HM:** origen humà, **CW:** origen boví, **PG:** origen porcí, **PL:** origen avícola. **CF:** nombre de coliformes fecals. **AT:** nombre d'anaerobis totals. **Beerens:** medi selectiu Beerens **HBSA:** medi selectiu Human Bifido Sorbitol Agar. **BFM:** medi selectiu *Bifidobacterium* medium. **HC:** valors obtinguts en la hibridació colonial amb la sonda Bif. **Placa:** Enumeració de les unitats formadores de colònies (UFC) crescudes en cada un dels medis selectius expressats en \log_{10} UFC/100mL. **ND:** No determinat.

Mostres	Beerens				HBSA			BFM	
	CF	AT	Placa	HC	Placa Totals	Placa Grogues	HC	Placa	HC
HM1	7,36	8,04	7,3	7,26	7,15	7,04	7,15	6,28	6,11
HM2	6,95	8,04	7,84	7,79	7,59	7,30	7,48	ND	6,17
HM3	7,23	8,43	7,18	6,89	6,89	6,56	6,62	6,08	ND
HM4	6,99	8,58	7,11	ND	6,97	6,47	6,74	6,08	5,00
HM5	6,96	8,95	7,77	7,63	7,43	6,95	7,41	6,40	6,20
HM6	7,51	8,41	7,54	7,48	7,88	7,17	6,95	6,63	6,25
CW1	6,36	7,93	7,52	7,32	7,27	7,15	6,85	6,94	6,15
CW2	6,34	8,48	7,51	7,48	7,30	<6,00	7,00	6,25	5,60
CW3	6,9	8,3	6,75	6,17	6,69	<6,00	6,00	6,30	6,00
CW4	6,89	8,99	7,54	7,40	7,36	<6,00	7,20	7,04	7,00
CW5	7,04	8,2	ND	ND	8,27	<6,00	8,00	<6,00	ND
PG1	7,56	9,26	7,06	7,04	6,60	<5,00	6,47	6,51	5,60
PG2	8,11	8,84	7,91	7,82	7,89	<6,00	7,69	6,66	6,35
PL1	7,23	8,58	7,15	6,95	7,60	<6,00	ND	ND	ND
PL2	5,57	7,26	6,78	5,35	5,48	<5,00	5,48	ND	ND
PL3	7,98	8,38	7,62	7,34	7,59	<6,00	5,00	7,00	6,50
PL4	7,26	8,51	7,69	7,51	7,44	<6,00	7,44	7,2	6,04

Figura 2.1. Creixement observat en una placa del medi Beerens incubada a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosis amb una mostra d'aigua residual. Les colònies blanques corresponent presumptivament a soques del gènere *Bifidobacterium*.

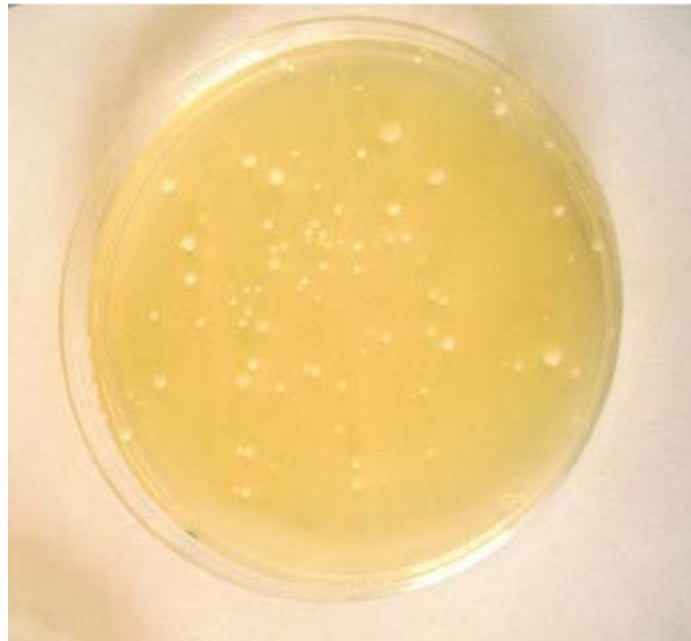


Figura 2.2. Creixement observat en una placa del medi HBSA incubada a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosis amb una mostra d'aigua residual. Les colònies de color blanc corresponent presumptivament a bifidobactèries no fermentadores del sorbitol i les colònies crescudes de color groc són bifidobactèries fermentadores del sorbitol.

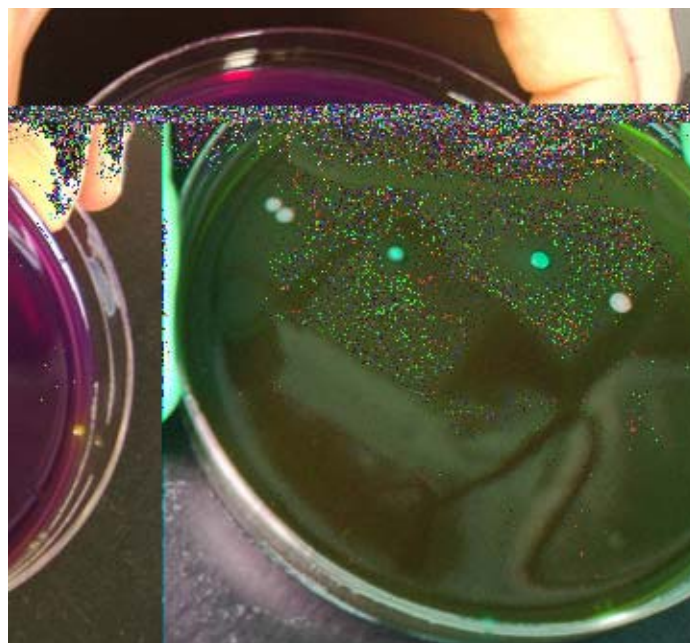


Figura 2.3. Creixement observat en una placa del medi BFM incubada a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosis amb una mostra d'aigua residual. Les colònies blanques-transparentes corresponen presumptivament a soques pertanyents al gènere *Bifidobacterium*.

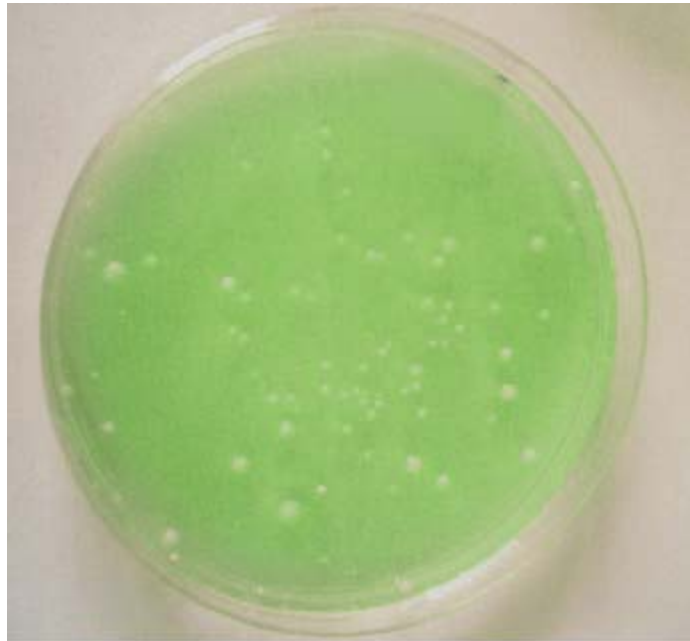


Figura 2.4 Revelat d'una hibridació colonial amb la sonda Bif marcada amb digoxigenina realitzada a partir d'una de les plaques dels medis selectius per *Bifidobacterium* sembrades en aigua residual.



2.3.1.1. Avaluació de les soques de bifidobactèries fermentadores de sorbitol

Es van analitzar els creixements de totes les soques tipus descrites fins el moment de *Bifidobacterium* en el medi HBSA per tal de determinar les espècies fermentadores del sorbitol. Només dos espècies van presentar una coloració groga de les estries realitzades en el medi HBSA, *B. breve* i *B. adolescentis*, indicant que s'havia produït la fermentació del sorbitol per part d'aquestes soques.

2.3.2. Determinació de les diferents proporcions bacterianes en mostres d'aigües residuals

Es van analitzar un total de 34 mostres d'aigües residuals, 16 mostres d'origen humà, procedents de quatre EDARs diferents, les característiques de les quals s'ha detallat a l'apartat 2.2.2.3, i 18 mostres d'origen animal de sis escorxadors diferents (6 de porcí, 4 de boví i 8 d'aviram). Els recomptes de bifidobactèries fermentadores de sorbitol, bifidobactèries totals, coliformes fecals, enterococs, espores de clostridis sulfit-reductors (clostridis) i anaerobis totals, s'indiquen en la Taula 2.6. La concentració d'anaerobis totals va ser de 6-9 unitats logarítmiques UFC/100mL en totes les mostres analitzades. En la Figura 2.5 es pot observar una placa de CBAs inoculada amb una mostra d'aigua residual. La majoria de les colònies blanques crescudes en aquest medi a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosi van presentar una coloració blanquinosa. El nombre de bifidobactèries totals a les mostres d'aigües residuals crues municipals i d'aigües d'escorxador va ser d'entre 6 i 7 unitats logarítmiques UFC/100mL. El nombre de bifidobactèries fermentadores de sorbitol a les mostres d'aigües residuals municipals va ser sempre del mateix ordre de magnitud o una unitat de logaritme més baixa que les bifidobactèries totals. En canvi els recomptes de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol en aigües residuals animals va ser normalment de dues unitats de logaritme per sota del nombre de bifidobactèries totals (Taula 2.6).

La concentració de coliformes fecals va oscil·lar entre els 6 i 7 unitats logarítmiques UFC/100mL. En la Figura 2.6 es mostra una membrana de filtració sobre el medi mFC on es pot observar les colònies de color blau, que corresponen als coliformes fecals. Els recomptes d'enterococs van ser normalment d'un a dos unitats logarítmiques més baixos que l'enumeració de coliformes fecals. En la Figura 2.7 es mostra el creixement dels enterococs en el medi mEA, amb la coloració vermella característica de les colònies crescudes, i en la Figura 2.8 es mostra una placa del medi BEA per a la confirmació de les soques d'enterococs. Finalment els valors de espores de clostridis en les mostres d'origen humà sempre van ser entre 5-6 unitats logarítmiques UFC/100mL, mentre que en les mostres d'origen animal els valors van estar en 4 unitats logarítmiques UFC/100mL exceptuant l'escorxador 4 on el nombre de clostridis va ser d'un ordre de magnitud superior. En la Figura 2.9 s'observa un tub circular de 50 mL on es va realitzar el recompte d'espores de sulfit reductors en el medi SPS agar incubada a 37°C durant 24 h.

Es van calcular i comparar sis proporcions entre les poblacions microbianes a partir dels valors absoluts de les seves enumeracions respectives. La proporció de bifidobactèries fermentadores de sorbitol i anaerobis totals va estar entre 0,55 i 0,79 en totes les mostres analitzades. La proporció de bifidobactèries fermentadores de sorbitol respecte coliformes fecals, va estar entre els valors 0,04 i 0,85 per a mostres d'aigües residuals municipals i 0,00-0,02 per a aigües residuals animals. Es va calcular una altra proporció, entre bifidobactèries fermentadores de sorbitol i enterococs. Les mostres d'aigües residuals humanes van mostrar una gamma ampla de valors (0,90-10,60) i en les mostres d'aigües residuals animals els valors es movien entre 0,02-2,58. La proporció entre les espores de clostridis sulfit-reductors respecte les bifidobactèries fermentadores de sorbitol va presentar un rang de 0,02 a 22,83 en totes les mostres. La proporció de coliformes fecals i enterococs va ser entre 5,35 i 24,03 per a aigües residuals municipals i entre les 14,67-182,30 per a aigües residuals animals.

La proporció del bifidobactèries fermentadores de sorbitol respecte bifidobactèries totals en mostres d'aigües residuals d'origen humà va ser sempre més gran que 0,20, mentre que en les mostres d'aigües residuals animals la proporció va ser sempre igual o més baixa que 0,03.

Taula 2.6. Nombre anaerobis totals, bifidobactèries, coliformes fecals, enterococs i clostridis en aigües residuals humanes (EDARs) i aigües residuals d'escorxadors. Els valors estan expressats com la mitjana de \log_{10} UFC/100 mL. **N:** Nombre de mostres. **AT:** Anaerobis totals. **BT:** Bifidobactèries totals en el medi HBSA. **BG:** Nombre de bifidobactèries fermentadores de sorbitol en el medi HBSA. **CF:** Nombre de coliformes fecals. **EF:** Nombre d'enterococs. **CL:** Nombre de espores de clostridis sulfít-reductors (clostridis). Les proporcions entre poblacions bacterianes s'han calculat amb els valors absoluts (UFC/100mL) de les enumeracions respectives. **G/T:** Proporció entre bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals. **G/AT:** Proporció entre bifidobactèries fermentadores de sorbitol i anaerobis totals **G/FC:** Proporció entre bifidobactèries fermentadores de sorbitol i coliformes fecals. **G/ENT:** Proporció entre bifidobactèries fermentadores de sorbitol i enterococs fecals. **CL/G:** Proporció de clostridis i bifidobactèries fermentadores de sorbitol. **FC/ENT:** Proporció de coliformes fecals i enterococs fecals. La desviació estàndard s'indica entre parèntesi ND: No determinat.

Valors estan expressats com la mitjana de \log_{10} UFC/100 mL.							
	N	AT	BT	BG	FC	ENT	CL
		8,77	6,97	6,16	6,80	6,06	6,16
EDAR 1	3	(±0,26)	(±0,12)	(±0,36)	(±0,28)	(0,26)	(±0,36)
		8,00	7,24	6,39	7,11	5,90	5,44
EDAR 2	9	(±0,38)	(±0,37)	(±0,60)	(±0,24)	(±0,29)	(±0,29)
			7,56	7,02	7,11	6,05	5,56
EDAR 3	2	ND	(±0,47)	(±0,40)	(±0,36)	(±0,13)	(±0,13)
			5,95	5,35	6,87	5,41	4,98
EDAR 4	2	ND	(±0,49)	(±0,49)	(±0,24)	(±0,47)	(±0,32)
		9,01	6,87	5,04	7,71	5,59	4,81
Escorxador 1	4	(±0,32)	(±0,65)	(±0,90)	(±0,61)	(±0,37)	(±0,38)
			7,83	5,69	7,83	5,66	4,89
Escorxador 2	2	ND	(±0,08)	(±0,98)	(±0,40)	(±0,26)	(±0,00)
			7,26	4,08	7,16	5,72	4,38
Escorxador 3	2	ND	(±0,13)	(±1,53)	(±0,38)	(±0,23)	(±0,43)
			6,74	4,08	7,32	5,67	5,19
Escorxador 4	2	ND	(±0,60)	(±0,12)	(±0,39)	(±0,33)	(±0,74)
		6,40	6,93	4,71	6,97	5,70	4,35
Escorxador 5	4	(±0,89)	(±0,99)	(±0,91)	(±1,13)	(±0,84)	(±0,26)
		7,62	7,48	5,87	7,34	6,30	4,24
Escorxador6	4	(±0,51)	(±0,15)	(±0,24)	(±0,77)	(±0,46)	(±0,25)
Proporcions bacterianes calculades amb valors absoluts (UFC/100mL)							
		G/T	G/AT	G/FC	G/EF	CL/G	FC/EF
EDAR 1		0,21	0,70	0,26	1,39	0,28	5,35
EDAR 2		0,23	0,79	0,37	5,57	0,06	14,98
EDAR 3		0,26	ND	0,85	10,60	0,03	12,54
EDAR 4		0,25	ND	0,04	0,90	0,36	24,03
Escorxador 1		0,01	0,55	0,00	0,70	0,26	182,30
Escorxador 2		0,02	ND	0,02	2,58	0,06	166,67
Escorxador 3		0,00	ND	0,00	0,13	0,41	30,80
Escorxador 4		0,00	ND	0,00	0,02	22,83	46,73
Escorxador 5		0,01	0,73	0,00	0,07	0,19	28,16
Escorxador6		0,03	0,77	0,02	0,27	0,02	14,67

Figura 2.5. Creixement en el medi CBA d'una mostra d'aigua residual incubada a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosi. Les colònies crescudes presenten una coloració blanquinosa o transparent.

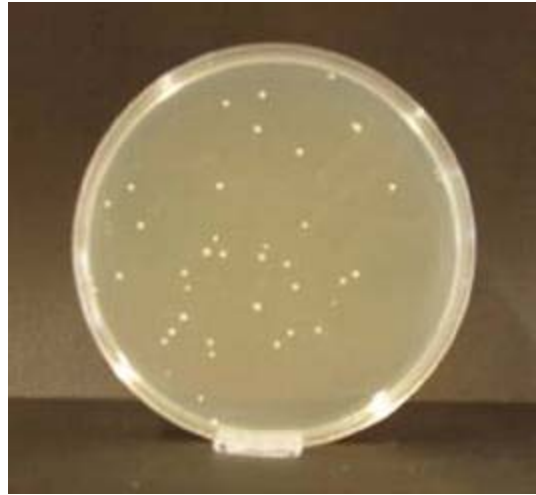


Figura 2.6. Creixement en una membrana de filtració en el medi mFC d'una mostra d'aigua residual incubada a 37°C durant 24 h en condicions d'anaerobiosi. Les colònies blaves corresponent als coliformes fecals.



Figura 2.7. Creixement en una membrana de filtració sobre una placa del medi mEA d'una mostra d'aigua residual després d'incubar-la a 37°C durant 48 h.



Figura 2.8. Confirmació de les soques d'enterococs en una membrana de filtració sobre una placa del medi BEA d'una mostra d'aigua residual després d'incubar-la a 37°C durant 4 h. Les colònies negres corresponent als enterococs fecals.



Figura 2.9. Recompte d'espores de sulfít reductors en el medi SPS agar d'una mostra residual incubada a 37°C durant 24 h.



L'anàlisi estadístic va mostrar diferències significatives ($P < 0,05$) entre la proporció G/T (bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals) de les mostres d'origen humà i les d'origen animal. No va haver-hi cap diferència significativa entre les diferents proporcions dels valors obtinguts per al G/AT, G/CF,G/ENT, CL/G i FC/ENT entre les mostres d'aigües residuals d'origen humà i les d'origen animal.

2.4. Discussió

S'ha suggerit que la distribució de les espècies de *Bifidobacterium* en femtes i en mostres d'aigua contaminades fecalment pot variar, depenent de l'origen humà o animal d'aquestes mostres. Tot i que hi ha una certa discussió, algunes espècies de *Bifidobacterium* s'han associat exclusivament amb els humans i altres estan relacionades exclusivament amb orígens animals (Beerens 1990; Gavini i Beerens 1999; Jagals i Grabow 1996; Lynch *et al.* 2002; Mara i Oragui 1983; Nebra *et al.* 2003; Sinton *et al.* 1998; Wang *et al.* 1996). Tenint en compte aquest fet, podríem considerar que la identificació de determinades espècies de *Bifidobacterium* proporcionaria una informació de l'origen de la contaminació fecal humana o animal en aigua.

S'ha avaluat l'eficàcia de tres medis selectius per a la recuperació i l'enumeració de *Bifidobacterium* en aigües residuals urbanes i d'escorxadors de porcíns, de bovins i d'aviram. A més a més, s'ha realitzat un recompte d'anaerobis totals i de coliformes fecals per tal de tenir una referència de la carrega bacteriana de cada una de les mostres analitzades. Tot i que hi ha diverses propostes per part de diferents autors d'utilitzar *Bifidobacterium* com a indicador de contaminació fecal (Beerens 1990; Jagals i Grabow 1996; Lynch *et al.* 2002; Nebra *et al.* 2003; Sinton *et al.* 1998) l'ús d'aquest té el problema de la falta d'un medi selectiu exclusiu pel gènere *Bifidobacterium* (Beerens 1990; Nebra i Blanch 1999; Silvi *et al.* 1996). Per tal de solucionar aquesta limitació, en un primer pas s'ha avaluat l'especificitat de tres medis selectius per *Bifidobacterium*: Beerens, HBSA i BFM. La tècnica de la hibridació colonial amb la sonda específica Bif per *Bifidobacterium* (Nebra *et al.* 2002), ha permès la confirmació de les colònies crescudes en cada un dels diferents medis i ajustar l'enumeració. S'ha observat que en els tres medis es va produir un creixement de la flora acompanyant que no són bifidobactèries. Tot i que en aquest estudi no s'han aïllat en cultiu pur ni s'han classificat aquestes soques no pertanyents al gènere *Bifidobacterium*, si que els resultats obtinguts estan d'acord amb altres estudis d'altres autors. S'ha descrit que en el medi Beerens hi creixen d'altres espècies que no pertanyen al gènere *Bifidobacterium* com *Clostridium clostridioforme*, *Eubacteria multiforme* i *Lacobacillus casei* (Silvi *et al.* 1996). En el medi BFM també hi ha un creixement de la microbiota acompanyant (Nebra i Blanch 1999) essent d'*Enterococcus faecalis*, *Ent. faecium*, *Lact. plantarum* i

Lact. bulgaricus algunes de les espècies interferents. En el medi HBSA també hi ha una microbiota acompanyant que interferiex el recompte de *Bifidobacterium* en placa, com és el grup dels estreptococs fecals (Mara i Oragui 1983).

L'anàlisi estadístic indica que els medis Beerens i HBSA tenen una mateixa recuperació per les diferents mostres d'aigües ambientals, i BFM té una recuperació inferior. Aquest diferencial d'un logaritme inferior per part del medi BFM en aigües residuals també s'ha descrit recentment per altres autors (Lynch *et al.* 2002). Aquesta reducció de la recuperació de *Bifidobacterium* en aquest medi es deu a la gran selectivitat que presenta. No obstant, aquest medi s'ha demostrat molt eficient en l'enumeració de bifidobactèries presents en productes làctics fermentats (Nebra i Blanch 1999). La presència de diferents components inhibidors en la seva formulació, impedeix a les cèl·lules de bifidobactèries malmeses de recuperar-se de la situació d'estrès en que poden estar en el medi ambient.

El medi Beerens és un medi selectiu i electiu descrit per a la recuperació de cèl·lules de *Bifidobacterium* en mostres de femtes. Ha estat el medi selectiu per *Bifidobacterium* que ha presentat una major recuperació en mostres ambientals. Aquest fet és d'esperar perquè aquest medi es basa en unes petites modificacions d'un medi ric, Columbia Blood Agar. S'hi afegeix glucosa i cisteïna que és la font de nitrogen essencial, i a més a més té una funció addicional de reduir el potencial redox del medi (Beerens 1990). Per tant, no és un medi molt restrictiu, i les cèl·lules de *Bifidobacterium* que estan en un estat d'estrès fisiològic en el medi ambient els hi és fàcil créixer en aquest medi.

El medi HBSA que té com a única font de carboni el sorbitol, ha presentat una enumeració de bifidobactèries del mateix ordre que l'obtinguda en el medi Beerens tot i que lleugerament inferior. Aquesta diferència no resulta estadísticament significativa. Tal i com s'ha indicat anteriorment, les soques de *Bifidobacterium* fermentadores de sorbitol s'han associat a humans (Mara i Oragui 1983). Cal considerar la hipòtesi que les bifidobactèries fermentadores del sorbitol estan potencialment associades a la contaminació fecal d'origen humà. Per tant, la presència en una mostra de bifidobactèries fermentadores de sorbitol com *B. adolescentis* o *B. breve* descrites

prèviament ens indicaria que la mostra estaria contaminada amb matèria fecal humana (Mara i Oragui 1983). La espècies de *Bifidobacterium* més abundants en els adults són *B. adolescentis* i *B. catenulatum* en adults i en infants les espècies dominats són *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* (Biavati *et al.* 1992; Lynch *et al.* 2002; Matsuki *et al.* 1999; Mullie *et al.* 2003). Per tant, aquest fet reforça l'ús de l'enumeració de les poblacions de bifidobactèries fermentadores de sorbitol per a la determinació de l'origen de la contaminació fecal. En aquest estudi no s'han detectat d'altres espècies de *Bifidobacterium* capaces de fermentar el sorbitol. I s'ha confirmat la variabilitat en alguns clons de *B. adolescentis* alhora de fermentar el sorbitol (Mara i Oragui 1983) en realitzar l'avaluació del medi HBSA amb les soques de referència de *Bifidobacterium*.

Tal i com s'ha comentat, el medi HBSA és selectiu i diferencial per *Bifidobacterium*. En aquest capítol s'ha comparat la facilitat de diferenciació en el medi entre les colònies que fermenten el sorbitol que donen una coloració groga i les que no el fermenten, que tenen una coloració blanca o translúcides quedant un color lila. Aquesta fàcil diferenciació ens va fer valorar si la relació del nombre de colònies grogues respecte el nombre de colònies totals crescudes en aquest medi podria utilitzar-se per a la detecció de l'origen de la contaminació fecal en aigua.

Per tant, en la segona part d'aquest treball, es van comparar les diferents proporcions bacterianes en aigües residuals municipals que tenien un origen humà i aigües residuals animals, de col·lectors d'escorxadors. Algunes d'aquestes proporcions bacterianes han estat proposades per altres autors (Carrillo *et al.* 1985; Feachem 1975; Gylleberg *et al.* 1960; Resnick i Levin 1981a). No es va trobar cap diferència entre les aigües residuals humanes i animals per a l'enumeració de coliformes fecals i enterococs, excepte l'escorxador 4 i l'escorxador 5 on la concentració de coliformes va ser de 2 i 1 unitats logarítmiques inferiors respectivament. El recompte de bifidobactèries totals tampoc va presentar diferències entre les mostres d'origen animal i humà. Les enumeracions de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol van mostrar un rang molt variable que oscil·lava entre 4 i 7 unitats logarítmiques d'UCF/100mL. Per tant, les enumeracions de les diferents poblacions bacterianes no ens serveixen per a la detecció de l'origen de la contaminació fecal. Encara que a les mostres d'origen humà el nombre de colònies grogues en el medi HBSA va ser normalment més alt que en les

mostres d'origen animal, no es pot utilitzar com a criteri diferencial perquè algunes mostres d'animals (escorxador 6) poden contenir concentracions de bifidobactèries fermentadores de sorbitol del mateix ordre logarítmic o fins i tot més altes que en algunes mostres humanes. Aquest fet el van descriure (Jagals i Grabow 1996) que només van calcular valors absoluts i en alguns casos les enumeracions absolutes de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol no servien per a la diferenciació de l'origen de la contaminació fecal.

Per aquesta raó, es va realitzar l'estudi de sis proporcions de poblacions bacterianes per tal de poder discernir l'origen de la contaminació fecal. En cinc de les proporcions valorades s'implica l'enumeració de bifidobactèries fermentadores de sorbitol. Es va realitzar una altra proporció, FC/ENT, que s'havia descrit prèviament per a determinar l'origen de contaminació fecal (Feachem 1975). Els resultats obtinguts ens indiquen que aquesta proporció no distingeix cap tipus d'origen fecal, d'acord com també ja s'ha descrit anteriorment per altres autors (Scott *et al.* 2002; Sinton *et al.* 1998). Aquesta proporció només ens valdria en contaminacions molt recents ja que la supervivència dels coliformes i enterococs és diferent i per tant no tenen el mateix comportament i les proporcions varien molt segons l'estat de la mostra (Clesceri 1998; Pourcher *et al.* 1991).

La proporció de bifidobactèries fermentadores de sorbitol respecte coliformes fecals podria ser una proporció diferencial. Ara bé, en algunes mostres humanes (EDAR 4) es va obtenir un valor de la proporció (0,02) del mateix ordre que varen presentar les proporcions dels escorxadors d'animals. Una situació similar es va observar en la segona proporció que es va calcular entre bifidobactèries fermentadores de sorbitol i enterococs. En algunes mostres humanes es va observar que els valors eren molt similars a les mostres animals (EDAR 2, EDAR 4). Només la proporció de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol respecte bifidobactèries totals van permetre la determinació de l'origen de contaminació fecal en totes les mostres analitzades (n=34). En mostres animals, el nombre de colònies grogues normalment va ser més baix que les mostres humanes (1-2 unitats logarítmiques inferiors). Si assumim que les colònies grogues estan associades a un origen humà, la detecció de colònies grogues en algunes mostres d'origen animal en valors molt menors podria explicar-se per una entrada

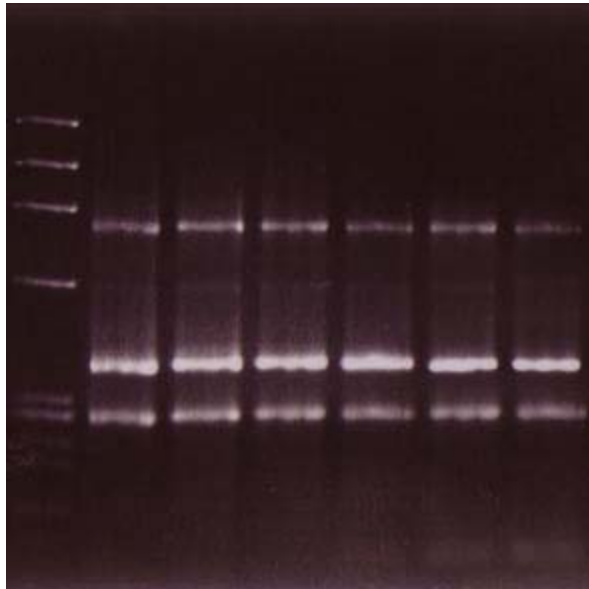
menor de contaminació fecal humana procedent dels lavabos de les empreses o de soques fermentadores de sorbitol que no pertanyent al gènere *Bifidobacterium* i que poden créixer en aquest medi selectiu. El medi de HBSA va permetre l'establiment d'una relació entre el valor absolut del nombre de colònies grogues dividides pel valor absolut de les colònies totals que ens poden determinar l'origen de la contaminació fecal. Els valors d'aquesta proporció més alts que 0,20 indiquen un origen de contaminació fecal humà. Els valors menors (0-0,05) ens indiquen mostres amb contaminació fecal animal. Aquests resultats donen suport a estudis previs que pressuposen l'ús de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol com indicadors de contaminació fecal d'origen humà en aigües residuals (Jagals i Grabow 1996; Long i Arango 2001; Mara i Oragui 1983). No obstant, aquest autors no contempen l'ús de proporcions proposada en aquest estudi. Només es van basar en els valors absoluts de les enumeracions de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol, i en aquest estudi es demostra que no sempre resulta fiable aquest valor absolut.

Una limitació d'aquest medi resulta quan la carrega bacteriana és molt elevada en placa. El mateix metabolisme de les pròpies cèl·lules pot acidificar el medi fent virar l'indicador de pH, el porpra de bromocresol, dificultant el reconeixement de les colònies grogues. Tot i això, cal considerar aquest medi i en particular la proporció G/T com una eina que pot contribuir conjuntament amb altres mètodes a una determinació encertada de l'origen de la contaminació fecal.

En conclusió, la proporció de les soques de *Bifidobacterium* fermentadores de sorbitol i les bifidobactèries totals utilitzant el medi de HBSA és una eina fiable per a la determinació de l'origen de contaminació fecal. Aquesta aproximació no exigeix nivells alts de qualificació tècnica per l'usuari, és un mètode més barat que molts dels mètodes moleculars específics i exigeix uns recursos simples per a l'enumeració de bactèries en condicions anaeròbies. La proporció es pot utilitzar de manera sola o complementant d'altres tècniques proposades per a una identificació de l'origen de la contaminació fecal en aigua.

Capítol 3

**Anàlisi del gen del 16S rRNA mitjançant PCR
múltiple amb iniciadors específics de
Bifidobacterium spp. per a la identificació de
l'origen de la contaminació fecal**



3.1. Introducció

El manteniment de la qualitat i de la seguretat microbiològica en els sistemes aquàtics tant en els abastaments d'aigües potables, com en zones recreatives, i en zones d'aqüicultura resulta determinant. La contaminació d'aquests sistemes comporta un risc sanitari pels humans o les espècies animals presents. A més a més, pot ser la causa de grans pèrdues econòmiques degut al tancament de plantes embotelladores d'aigües, de plantes depuradores d'aigües residuals, de platges, o d'àrees de cultius de peixos, mol·lusc, etc. Com s'ha comentat en els dos capítols anteriors l'aigua contaminada amb material fecal d'humans presenta en general un major risc per la salut humana que si ha estat contaminada per orígens animals (Jagals i Grabow 1996; Scott *et al.* 2002; Sinton *et al.* 1998). Tot i així, no podem menysprear la contaminació fecal d'origen animal, els animals són el reservori d'alguns patògens que poden provocar malalties (Sinton *et al.* 1998; Hudrey *et al.* 2003). Conseqüentment, la identificació de l'origen de la contaminació fecal és un paràmetre molt important a determinar quan es produeix una contaminació ambiental en aigües. També és molt important la determinació de la contaminació fecal per a la realització d'estudis epidemiològics, per a determinar responsabilitats legals, o per a decidir qui és el responsable de la contaminació ambiental en determinats contextos (Jagals i Grabow 1996).

Uns microorganismes indicadors que s'han proposat per a identificar l'origen de la contaminació fecal són les bacteries pertanyents al gènere *Bifidobacterium*, tal i com s'ha comentat en els capítols anteriors. L'especificitat d'hoste per part de les espècies d'aquest grup bacterià dona suport al seu ús potencial com a indicador de la contaminació fecal (Gavini *et al.* 1991; Mara i Oragui 1983; Matsuki *et al.* 1999; Mullie *et al.* 2003; Nebra *et al.* 2003; Scardovi *et al.* 1971).

Diverses problemàtiques han acompanyat aquest gènere al llarg dels anys des de la seva primera descripció l'any 1900 (Tissier 1900). Com s'ha explicat en els capítols anteriors, la falta d'un medi selectiu per aquest gènere ha dificultat molt el seu estudi a nivell ambiental i també taxonòmic. El gran avenç en l'estudi d'aquest gènere, com en la majoria de les bacteries, ha anat acompanyat dels grans avenços en la biologia molecular. La primera classificació bacteriana d'aquest gènere es va basar en la identificació de les

espècies mitjançant el fenotip de les soques com la morfologia de les cèl·lules i en proves bioquímiques, patrons de fermentacions de sucres i electroforesi de mobilitat d'enzims. L'enzim fructosa-6-fosfatat fosfoacetolasa també serveix com a eina taxonòmica en la identificació del gènere però no permet la distinció en el nivell d'espècie. No obstant, en aquesta primera classificació van sorgir certes confusions.

Posteriorment es va realitzar una identificació molt més acurada de les diferents espècies gràcies a la introducció de l'estudi de les seqüències del gen del 16S rRNA, aquesta molècula està considerada una de les molècules signatura més determinants en la taxonomia molecular.

Totes les espècies que pertanyen al gènere *Bifidobacterium* formen una unitat filogenètica que posseeix un 93% d'identitat de les seqüències del gen del 16S rRNA. L'arbre filogenètic de les bacteries de *Bifidobacterium* juntament amb els gèneres *Streptomyces*, *Actinomyces* i *Propionibacterium* s'engloben en un grup anomenat "bactèries Gram positives amb un gran contingut de G+C". Quan s'utilitza la seqüència del 16S rRNA com a índex és difícil diferenciar *Bifidobacterium* i *Gardnerella*, però s'ha vist que el percentatge de G+C de *Gardnerella* (42%) és significativament més baix que no pas el de *Bifidobacterium* (55-65%), per tant es poden arribar a diferenciar (Scardovi 1986).

S'ha demostrat que dues espècies que poden hibridar el seu ADN en un 70%, i posseeixen un 97% d'identitat en la seqüència del gen del 16 rARN (Stackebrandt i Goodfellow 1991; Stackebrandt i Ludwig 1994) no poden considerar-se definitivament com d'una mateixa espècie. Aquestes tècniques precisen de les corbes de reassociació d'ADN per a definir una espècie.

Aquestes noves tècniques moleculars han facilitat l'estudi dels microorganismes sense la necessitat de passar per una fase de cultiu. Aquest fet ha permès augmentar el coneixement de les espècies del gènere de *Bifidobacterium*. S'han anat descrivint noves espècies com *B. inopinatum* i *B. denticolens* (Crociani *et al.* 1996) o l'espècie *B. scardovii* (Hoyles *et al.* 2002), s'ha produït una unificació diferents espècies de *Bifidobacterium* en una mateixa, com la unificació de *B. longum* englobant les espècies *B. infantis* i *B. suis* (Sakata *et al.* 2002). S'han determinat noves classificacions com la de *B. lactis* (Ventura i Zink 2002). S'han descrit noves funcions fisiològiques de

diferents espècies, com la tolerància a l'oxigen per part de *B. lactis* (Meile *et al.* 1997). S'han començat a seqüenciar alguns genomes sencers com el de la soca *B. longum* NCC2705 (Schell *et al.* 2002). S'han anat identificant diferents gens que codifiquen proteïnes com el gen que codifica per la F6p (xpf) que ha estat identificat i caracteritzat per primera vegada en el cromosoma de *B. lactis* (Meile *et al.* 2001). S'han descrit noves metodologies de detecció per a les diferents espècies de *Bifidobacterium* spp. com la utilització de l'enumeració de bifidobactèries utilitzant la tècnica molecular FISH (Harmsen *et al.* 1999; Langendijk *et al.* 1995; Requena *et al.* 2002), com la utilització de sondes per a enumerar diferents poblacions de *Bifidobacterium* (Yamamoto *et al.* 1992), com la quantificació d'ADN en diferents mostres amb la tècnica de la PCR en temps real (Gueimonde *et al.* 2004).

També s'han determinat els diferents hàbitats de les diferents espècies. Les diferents espècies de *Bifidobacterium* es troben en hàbitats molt diversos. En la Taula 3.1 s'indica els diferents hàbitats de les espècies de *Bifidobacterium*. Alguns d'aquests estudis que s'indiquen a la Taula 3.1 han utilitzat diferents mètodes moleculars per a identificar la seva presència. Així tenim, que les espècies que s'han detectat més freqüentment en les femtes de nens són *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* i *B. longum* mentre que en els individus adults les espècies predominants són *B. adolescentis*, *B. longum*, i *B. catenulatum* (Ballongue 1998; Matsuki *et al.* 1999; Matsuki *et al.* 2003). A part de l'intestí, les bifidobactèries també les podem localitzar en altres hàbitats del cos humà com: detecció en càries dentals (*B. dentium*, *B. denticolens* i *B. inopinatum*) (Crociani *et al.* 1996). *B. dentium* és la única espècie potencialment patògena dins el gènere *Bifidobacterium* que pot estar relacionada amb l'etiologia de les càries (Scardovi 1986; Biavati *et al.* 1992).

En canvi, les espècies *B. minimum*, *B. subtile* s'han detectat només en aigües residuals (Biavati *et al.* 1992). L'espècie *B. thermacidophilum* s'ha aïllat a partir d'aigua residual d'una granja dedicada a l'elaboració de formatge de soja (Dong *et al.* 2000b) i *B. lactis* s'ha detectat només en productes fermentats làctics (Meile *et al.* 1997). D'altres espècies del gènere *Bifidobacterium* no s'han trobat en els humans sinó que procedeixen dels intestins de diferents animals de sang calenta i en abelles. Cal tenir en compte que les concentracions de les bifidobactèries, i en particular d'algunes espècies, en els intestins dels animals és més baixa que no pas en els humans i encara més baixa en aigües residuals. Aquesta limitada concentració pot dificultar la seva

detecció sigui quina sigui la metodologia utilitzada (Bernhard i Field 2000). Tot i així, s'ha detectat que les espècies de *Bifidobacterium* d'origen animal tenen una tolerància a l'oxigen major que no pas les espècies d'origen humà en aliments (Beerens *et al.* 2000b). L'espècie de *Bifidobacterium* predominant en els animals i que es considera com un indicador de contaminació fecal d'origen animal és *B. thermophilum* (Bahaka *et al.* 1993; Gavini i Beerens 1999). En canvi en la llet de les vaques la espècie de *Bifidobacterium* predominant és *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, per tant, aquesta espècie podria ser un bon indicador de contaminació fecal d'origen boví ja que només s'ha detectat en llet de granges (Beerens *et al.* 2000a). En mostres fecals d'origen porcí s'han detectat diferents espècies de *Bifidobacterium* com *B. globosum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *B. boum* i *B. choerium* (Scardovi 1986). Altres espècies descrites recentment exclusives d'origen porcí són: *B. aerophilum* i *B. psychoaerophilum* que es troben només en porcs (Ventura *et al.* 2004).

En conseqüència la detecció de certes espècies de *Bifidobacterium* pot determinar l'origen de la contaminació fecal degut a la gran diversitat d'hàbitats en què els trobem. Per aquest motiu és de gran importància poder determinar les espècies d'origens exclusius, tant d'humans com d'animals. En els diversos hàbitats és molt important determinar les espècies de *Bifidobacterium* que estan presents. Aquesta classificació ha estat possible gràcies a la diferents tècniques moleculars descrites a la introducció general.

Taula 3.1. Hàbitats de les diferents bifidobactèries (Ventura *et al.* 2004).

Espècies	Soca	Origen
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703 ^T	Intestí d'adults
<i>B. aerophilum</i>	LMG 21773 ^T	Femtes de porcs
<i>B. angulatum</i>	ATCC 27535 ^T	Femtes d'humans
<i>B. animalis</i>	ATCC 25527 ^T	Femtes d'animals
<i>B. asteroides</i>	ATCC 25910 ^T	Abelles
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521 ^T	Femtes d'infants
<i>B. boum</i>	DSM 20432 ^T	Rumen de vaques
<i>B. breve</i>	ATCC 15700 ^T	Intestí de nens
<i>B. catenulatum</i>	ATCC 27539 ^T	Intestí d'adults
<i>B. choerinum</i>	ATCC 27686 ^T	Femtes de porcs
<i>B. coryneforme</i>	DSM 20216 ^T	Abelles
<i>B. cuniculi</i>	ATCC27916 ^T	Femtes de conill
<i>B. dentium</i>	ATCC 27534 ^T	Caries dentals
<i>B. gallinarum</i>	DAM 20670 ^T	Femtes d'aus
<i>B. indicum</i>	ATCC 25912 ^T	Abelles
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697 ^T	Intestí de nens
<i>B. lactis</i>	DSM 10140 ^T	Iogurt
<i>B. longum</i>	ATCC 15707 ^T	Intestí d'adults
<i>B. magnum</i>	ATCC 127540 ^T	Rumen de vaques
<i>B. merycicum</i>	DSM 6492 ^T	Rumen de vaques
<i>B. minimum</i>	DSM 20102 ^T	Aigua residual
<i>B. pseudocatenulatum</i>	DSM 20438 ^T	Femtes d'infants
<i>B. pseudolongum subsp. globosum</i>	ATCC 25865 ^T	Rumen de vaques
<i>B. pseudolongum subsp. pseudolongum</i>	ATCC 25526 ^T	Femtes de porcs
<i>B. psychroaerophilum</i>	LMG 21775 ^T	Femtes de porcs
<i>B. pullorum</i>	DSM 20433 ^T	Femtes d'aus
<i>B. ruminantium</i>	DSM 26489 ^T	Rumen de vaques
<i>B. saeculare</i>	ATCC 49392 ^T	Rumen de vaques
<i>B. subtile</i>	DSM 20096 ^T	Aigua residual
<i>B. suis</i>	ATCC 27533 ^T	Femtes de porcs
<i>B. thermophilum</i>	DSM 20210 ^T	Femtes de porcs
<i>B. thermacidophilum subsp. thermoacidophilum</i>	LMG 20210 ^T	Aigua residual d'origen animal
<i>B. thermacidophilum subsp. Porcinum</i>	LMG 21689 ^T	Femtes de porcs

Atenent a les diferents tècniques moleculars descrites en la introducció general, en aquest capítol es va plantejar el desenvolupament d'una eina molecular simple, que no precisi cultiu en medis rics o selectius, que requereixi d'un temps curt d'anàlisi, de baix cost i que alhora sigui específica i sensible, per a la detecció de les espècies de *Bifidobacterium* que s'associïn exclusivament a aigües residuals d'origen humà. Així, dels diferents mètodes moleculars descrits per a *Bifidobacterium* en el capítol 3, s'ha utilitzat la PCR aniuada.

Els objectius d'aquest capítol han estat:

1. Determinar quines espècies de *Bifidobacterium*, que s'han associat prèviament com a exclusives dels humans, es troben només en aigües residuals urbanes. S'ha analitzat la presència d'aquestes espècies en aigües residuals municipals (mostres d'origen principalment humà) i aigües residuals d'escorxadors d'animals (mostres principalment d'origen animal) mitjançant tècniques moleculars específiques prèviament descrites per altres autors.
2. Desenvolupar, una nova tècnica molecular per a la detecció de les espècies de *Bifidobacterium* associades exclusivament a aigües residuals d'origen humà. Aquesta tècnica molecular s'ha valorat posteriorment amb mostres d'aigües residuals de diferents orígens per tal de poder determinar l'origen de la contaminació fecal.
3. Analitzar el potencial ús combinat d'aquest nou mètode molecular amb la proporció de bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals en el medi selectiu HBSA, descrita al capítol 2.

3.2. Materials i mètodes

3.2.1. Soques bacterianes i medis de cultiu

Les soques bacterianes tipus de *Bifidobacterium* utilitzades en aquest estudi van ser : *B. adolescentis* DSM 20083^T, *B. angulatum* DSM 20098^T, *B. bifidum* DSM 20456^T, *B. breve* DSM 20213^T, *B. catenulatum* DSM 20103^T, *B. dentium* DSM 20084^T, *B. gallicum* DSM 20093^T, *B. infantis* DSM 20088^T i *B. longum* DSM 20219^T. Cada una de les soques tipus es va recuperar de l'estat de congelació com s'ha descrit a l'apartat 2.2.1. Es van inocular cada una de les soques tipus en tubs de vidre estèrils de 20 mL plens del medi líquid RCM també estèril. Les condicions d'incubació van ser sota condicions anaeròbies a 37°C durant 48 h.

Els medis de cultius utilitzats per a la recuperació de les soques van ser el medi ric Columbia Blood Agar (Difco, Detroit, Mich) complementat abans de l'esterilització amb 5 g/L de glucosa i 5 g/L de L-cysteine-HCl (sCBA) i el medi líquid Reinforced Clostridial Medium, RCM (Oxoid, Hampshire, Anglaterra). Totes les soques es van incubar a 37°C entre 48 h i 72 h en gerres d'anaerobiosi (GasPak, BBL, Hampshire, Anglaterra) que contenien generadors d'atmosfera de CO₂ (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemanya).

L'enumeració de bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals en les mostres ambientals analitzades es va realitzar amb el medi HBSA tal i com s'ha descrit en el capítol anterior a l'apartat 2.2.1.

3.2.2. Extracció de l'ADN dels cultius purs

L'extracció de l'ADN bacterià de les soques tipus es va realitzar seguint un protocol descrit prèviament (Kellogg *et al.* 1990). Cada una de les soques tipus es va inocular en tubs de vidre estèrils de 20 mL plens del medi RCM també estèril. El temps d'incubació va ser de 48h a 37°C en condicions d'anaerobiosi. Posteriorment, 1 mL de

cada un dels inòculs es va centrifugar a 14000 rpm durant 3 min. Les cèl·lules es van rentar dues vegades en aigua destil·lada estèril i es van resuspendre en 0.2 mL de la solució A (100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3) (Annex II) i 0.2 mL de la solució B (2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, un 1% Tween-20, Nonidet P40 d'un 1%, pH 8,3) (Annex II). Es va afegir la Proteïnasa K (Merck, Darmstadt, Alemanya) fins a una concentració final de 120 µg/mL. Les extraccions es van incubar a 55°C durant 1 h. Posteriorment es va afegir 0.2 mL de Matriu d'InstaGene a cada una de les extraccions i es van incubar 15 min més a 55°C. La inactivació de la proteïnasa K es va realitzar mitjançant un xoc tèrmic a 100°C durant 8 min. Es van centrifugar les mostres a 14.000 rpm durant 3 min per a acabar d'eliminar les partícules de la Matriu d'InstaGene. Es van utilitzar 2 µl del sobrenadant per a realitzar les amplificacions de l'ADN per PCR.

3.2.3. Extracció de l'ADN de les mostres ambientals

Es van valorar tres metodologies diferents per a l'extracció d'ADN en mostres d'aigües residuals:

- El primer protocol analitzat fou adaptat a partir de les descripcions fetes per altres autors per a l'extracció d'ADN en aigües residual (Matsuki *et al.* 1999) i femtes (Zhu *et al.* 1993).

Els dos següents protocols analitzats es van basar en dos kits d'extracció de ADN de la casa QIAgen:

- “QIAamp DNA stool mini kit” dissenyat per a l'extracció d'ADN en femtes.
- “QIAamp DNA blood mini kit” dissenyat per a l'extracció d'ADN en sang.

Els protocols de tots tres mètodes avaluats es descriuen a continuació:

3.2.3.1. Mètodes descrits per a l'extracció de l'ADN

A partir dels mètodes d'extracció de l'ADN de mostres d'aigües residuals i de femtes (Zhu et al. 1993; Matsuki et al. 1999) es va establir el protocol següent:

- Es van centrifugar 10 mL de la mostra a 1200 r.p.m. durant 15 min.
- Es va recuperar 1 mL del sobrenadant i es va centrifugar a 14000 r.p.m. durant 3 min.
- Es va descartar el sobrenadant.

A partir dels precipitats obtinguts de les mostres es van realitzar els següents passos:

- Els precipitats es van resuspendre en 250 µl del tampó d'extracció (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 9.0) (Annex II) més 50 µl de SDS 10%.
- Es van congelar els precipitats a -20°C i després es van deixar descongelar a temperatura ambient.
- Es van incubar a 100°C durant 5 min. i després es van mantenir en gel durant 5 min.
- Es va afegir a cada preparació 150 µl de α -clorotoluè (Avocado, Research Chemicals LTD, Heysham, Lancashire, Anglaterra) en una campana d'extracció de gasos per a evitar els efectes tòxics del producte.
- Les extraccions es van incubar a 55°C durant 30 min (barrejant cada 5 min les fases que es formaven amb l'ajuda d'un vòrtex).

- Passat el temps d'incubació es va afegir 150 µl d'acetat sòdic 3 M pH 5,5 (Annex II) a cada extracció i aquestes es van mantenir amb gel durant 15 min.
- Després de centrifugar las extraccions a 14000 r.p.m. durant 10 min a 4°C, es va recollir el sobrenadant i a partir d'aquest es va recuperar l'ADN mitjançant la precipitació amb isopropanol.
- Es va afegir a cada sobrenadant igual volum d'isopropanol i es va deixar a temperatura ambient durant tota la nit.
- Es va centrifugar a 14000 r.p.m. durant 20 min a 4°C per a acabar de precipitar l'ADN.
- Els precipitats es van rentar dues vegades amb 200 µl d'etanol al 70% i es va centrifugar a 14000 r.p.m. durant 10 min.
- Posteriorment es va rentar amb 200 µl d'etanol absolut i es va centrifugar a 14000 r.p.m. durant 10 min.
- Els precipitats es van assecar en una centrífuga de tipus Speed Vacuum (Savant Instruments Inc., Halbrook, NY, USA) durant uns 30 min per a eliminar tot l'etanol.
- Finalment, els precipitats obtinguts es van resuspendre en 100 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).
- Les extraccions de l'ADN es van guardar a -20°C.

3.2.3.2. Extracció d'ADN de les mostres amb el "QIAamp DNA stool mini kit"

El procediment que es va seguir per a l'extracció d'ADN de les diferents aigües residuals es va adaptar basant-se en les instruccions del fabricant del kit:

- Es van centrifugar 10 mL d'aigua residual a 1200 r.p.m. durant 15 min per eliminar les partícules grolleres de les mostres.
- Posteriorment es van agafar 200mL del sobrenadant.
- Es va afegir 1,4 mL de Buffer ASL a cada una de les mostres analitzades. Es va agitar contínuament durant 1 minut en un vórtex.
- Es va escalfar la suspensió durant 5 minuts a 70°-95° C.
- Es va agitar durant 15 segons en un vórtex i es va centrifugar a 14000 r.p.m. durant 1 min.
- Es va pipetejar 1,2 mL del sobrenadant en un nou tub eppendorf de 1,5 mL i es va descartar el precipitat ("pelet").
- Es va afegir 1 barra d'InhibitEX a cada una de les mostres d'aigua residual i es va agitar immediatament de forma continua durant 1 min o fins que la barreta estigues totalment dissolta.
- Es van incubar les suspensions durant 1 min a temperatura ambient.
- Es van centrifugar les mostres a 14000 r.p.m. durant 3 min.
- Es va pipetejar tot el sobrenadant en un nou eppendorf de 1,5 mL i es va

tornar a descartar el “pelet”.

- Es van centrifugar les mostres de μ a una velocitat de 14000 r.p.m. durant 3 min.
- Es va pipetejar 15 μ L de proteïnasa K en un nou tub eppendorf de 1,5 mL.
- Es va pipetejar 200 μ L del sobrenadant obtingut en el pas anterior i es va afegir en el tub eppendorf amb la proteïnasa K.
- Es va afegir 200 μ L de Buffer AL i es va agitar durant 15 segons amb el vórtex.
- Es van incubar les mostres a 70°C durant 10 min.
- Es va afegir 200 μ L d’etanol (96-100%) i es va barrejar amb un vórtex.
- Es va afegir tota la suspensió en una columna “spin”.
- Es va tancar les columnes i es va centrifugar a una velocitat de 14000 r.p.m durant 1 min.
- Es va posar la columna “spin” en un nou tub de recol·lecció i es va descartar el tub del filtrat.
- Es va afegir 500 μ L del Buffer AWL.
- Es va centrifugar a 14000 r.p.m. durant 1 min.
- Es va posar la columna “spin” en un nou tub de recol·lecció i es va tornar

a descartar el tub de recol·lecció que contenia el filtrat.

- Es va afegir 500 µL de Buffer AW2.
- Es va centrifugar a una velocitat de 14000 r.p.m. durant 3 min.
- Es va descartar el tub de recol·lecció.
- Es va transferir la columna a un tub eppendorf i es va pipetejar 200 µL del Buffer AE a la membrana. Es va incubar 1 min i es va centrifugar a una velocitat de 14000 r.p.m. durant 1 min.
- Es va recollir les extraccions de l'ADN guardant-se a -20°C.

3.2.3.3. Extracció de l'ADN de les mostres amb el “QIAamp DNA blood mini kit”

El procediment que es va seguir per a l'extracció d'ADN de les diferents aigües residuals també es va basar en les instruccions del fabricant del kit:

- Es van centrifugar 10 mL d'aigua residual a 250 g durant 15 min per a eliminar les partícules grolleres de les mostres.
- Per a realitzar l'extracció total de l'ADN en aquest cas es va utilitzar el QIAamp ADN Blood Mini Kit.
- Es va pipetejar 20 µL QIAGEN Protease i es va afegir en un tub de 1.5 mL.
- Es va pipetejar 200 µL del sobrenadant de la centrifugació i es va afegir al tub amb la Protease QIAGEN.

- Posteriorment, es va afegir 200 μL del Buffer AL i es va agitar amb vòrtex durant 15 sec. Les mostres es van incubar a 55°C durant 10 min.
- Es va realitzar una polsada de centrifuga en tots els tubs eppendorf per eliminar totes les gotes de dins dels tubs.
- Es van afegir 200 μL d'etanol (96-100%) en totes les mostres, i es va agitar amb vòrtex durant 15 segons. Després es va tornar a realitzar un pols de centrifuga en tots els tubs per a eliminar totes les gotes de dins dels tubs.
- Tota aquesta barreja es va aplicar a una columna "spin" (2 mL). La columna "spin" es van centrifugar a 6,000 x g (8,000 r.p.m.) durant 1 min. Després, la columna es va posar en un tub net de 2 mL i el filtrat es va descartar.
- Es va afegir a la columna "spin" 500 μL del AW1. La columna es va tornar a centrifugar a 8,000 rpm durant 1 min. Després es va tornar a posar la columna en un altre tub net de 2 mL i el filtrat es va descartar.
- Posteriorment es va afegir a la columna "spin" 500 μL del Buffer AW2. Es va centrifugar la columna a la màxima velocitat 14,000 r.p.m. durant 3 min.
- La columna QIAamp "spin" es va posar en un tub net de 1,5 mL i es va descartar el filtrat. Es van afegir 200 μL del Buffer AE en la columna o bé 200 μL aigua destil·lada. Es va incubar les mostres a temperatura ambient durant 5 min, i posteriorment es van centrifugar a 8,000 r.p.m. durant 1 min. En aquests cas el filtrat era la extracció d'ADN de cada una de les mostres.
- L'ADN extret es va guardar a -20°C.

3.2.4. Amplificació del gen del 16s rARN de *Bifidobacterium* per PCR amb iniciadors específics

El gen del 16S rARN de cada una de les soques tipus i de les soques ambientals presents en les mostres d'aigües residuals es va amplificar mitjançant la tècnica de la PCR. Per a la detecció de les diferents espècies de *Bifidobacterium* primer es va realitzar una amplificació del gen del 16S rARN de les mostres amb els iniciadors genèrics descrits prèviament (Kaufmann *et al.* 1997). Les posicions en el gen i les seqüències d'aquests iniciadors s'indiquen en la Taula 3.2.

Taula 3.2. Iniciadors genèrics pel gènere *Bifidobacterium*:

Iniciador	Seqüència	Direcció	Situació
Im26	5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-3'	Iniciador	15-35 ^a
Im3	5'-CGGGTGCT ^b CCCACTTTCATG-3'	Terminal	1412-1432 ^a

a Correspon a l'enumeració del gen del 16S rRNA d' *Escherichia coli* (Brosius *et al.* 1981).

b Inosine (A, C, G i T)

Per a la realització de la PCR es va efectuar una barreja dels diferents reactius necessaris en un tub estèril. En la Taula 3.3 es detallen les concentracions finals de cada un dels reactius utilitzats. Aquesta barreja es va realitzar en una cambra de flux horitzontal per tal d'evitar possibles contaminacions. Tots els reactius es van manipular en condicions estèrils i amb la utilització de guants per a evitar la degradació de l'ADN.

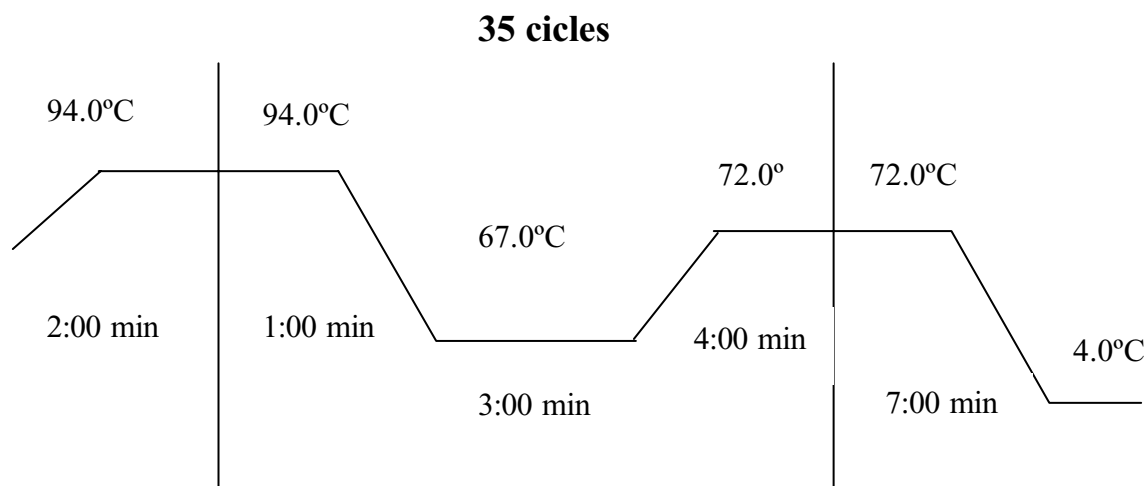
Taula 3.3. Barreja dels diferents reactius necessaris per la PCR del gènere *Bifidobacterium*.

Reactius	Volum (µl)	Concentració final
Buffer 10X (Eppendorf, Hamburg, Alemanya) ¹	5	1X
Mg Cl 2 (25mM) (Eppendorf, Hamburg, Alemanya)	1	2 mM
dNTPs (25mM) (Eppendorf, Hamburg, Alemanya)	0,4	200µM
Primer Im3 (5mM)	3	0,3µM
Primer Im26 (5mM)	3	0,3µM
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,4	2U
Aigua estèril	35,2	
ADN extret	2	
Volum total	50µL	

¹ 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3 (a 25°C), 15 mM MgCl₂, 1% Tritó x100.

Una vegada realitzada la barreja, es va afegir l'ADN extret de les mostres en cada un dels tubs de la PCR i es va realitzar la reacció de la PCR en un termociclador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn). El programa que es va utilitzar per aquesta reacció es detalla a la Figura 3.1.

Figura 3.1. Programa de la PCR utilitzat per l'amplificació de l'ADN pel gènere *Bifidobacterium*.



El resultat de la PCR es va visualitzar en un gel d'agarosa al 0,8% seguint el protocol descrit en l'Annex II.

3.2.5. Selecció de les espècies de *Bifidobacterium* associades a la contaminació fecal d'origen humà

Per tal de determinar si la contaminació fecal en aigües és d'origen humà, es va realitzar prèviament una prospecció de les diferents espècies de *Bifidobacterium*, que s'han associat exclusivament a humans, en mostres d'aigües residuals urbanes i d'escorxadors. Es van caracteritzar aquestes mostres amb nou parells d'iniciadors específics prèviament descrits per altres autors (Matsuki *et al.* 1999) i que permeten la detecció d'espècies de *Bifidobacterium* que s'han associat a femtes humanes. Aquestes espècies són: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. infantis* i *B. longum*.

Per a la realització de la PCR específica d'espècie es va realitzar la barreja dels reactius per a la reacció de la mateixa manera detallada en l'apartat anterior. En la Taula 3.4 s'observen les concentracions finals de cada un dels diferents reactius.

Taula 3.4. Barreja de la reacció per a la realització de la PCR per a les diferents espècies de *Bifidobacterium*:

Reactius	Volum (µl)	Concentració final
Buffer 10X ¹	2,5	1X
dNTPs (25mM)	0,2	200µM
Iniciador*	1,5	0,25µM
Terminador*	1,5	0,25µM
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,2	1U
Aigua estèril	18,1	
ADN extret	1	
Volum total	25 µL	

*Cada barreja li va correspondre el seu joc d'iniciadors específics per a cada una de les soques estudiades. Les seqüències de cada un dels iniciadors es detallen en la Taula 3.5.

¹ 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3 (a 25°C), 15 mM MgCl₂, 1% Tritó x100

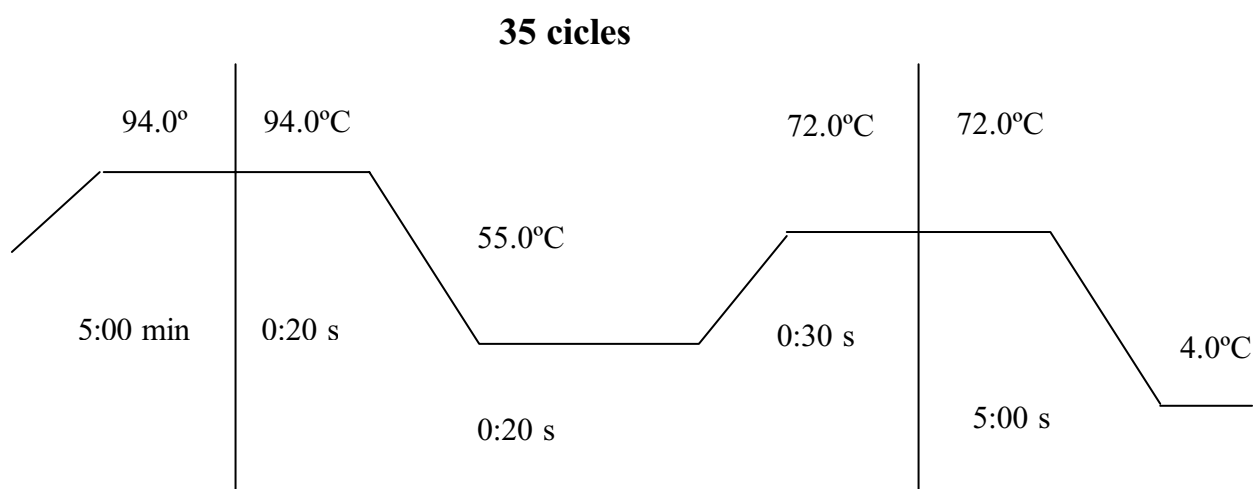
Taula 3.5. Seqüències dels iniciadors específics per a les diferents espècies de *Bifidobacterium* associades a un origen humà (Matsuki *et al.* 1999).

Espècies	Iniciadors	Seqüències	Mida (pb)	Situació ^a	Mida producte (pb)
<i>B. adolescentis</i>	BiADO-1	CTCCAGTTGGATGCATGTC	19	182-200	279
	BiADO-2	CGAAGGCTTGCTCCCAGT	18	474-442	
<i>B. angulatum</i>	BiANG-1	CAGTCCATCGCATGGTGGT	19	185-203	275
	BiANG-2	GAAGGCTTGCTCCCCAAC	18	473-441	
<i>B. bifidum</i>	BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	21	184-204	278
	BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCCAAA	19	475-442	
<i>B. breve</i>	BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	18	175-192	288
	BiBRE-2	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT	19	475-444	
<i>B. catenulatum grup</i>	BiCATg-1	CGGATGCTCCGACTCCT	17	176-192	285
	BiCATg-2	CGAAGGCTTGCTCCCGAT	18	474-442	
<i>B. longum</i>	BiLON-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	182-201	831
	BiLON-2	GGGAAGCCGTATCTCTACGA	20	1028-1008	
<i>B. infantis</i>	BtINF-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	182-201	828
	BiINF-2	GGAAACCCCATCTCTGGGAT	20	1027-1007	
<i>B. dentium</i>	BiDEN-1	ATCCCGGGGGTTTCGCCT	17	72-89	387
	BiDEN-2	GAAGGGCTTGCTCCCGA	17	473-443	
<i>B. galicum</i>	BiGAL-1	TAATACCGGATGTTCCGCTC	20	170-189	303
	BiGAL-2	ACATCCCCGAAAGGACGC	18	479-454	

^a Correspon a l'enumeració del gen del 16S rRNA d' *Escherichia coli* (Brosius *et al.* 1981).

Una vegada es va realitzar la barreja es van afegir a cada una de les reaccions l'ADN extret de les mostres. Es va realitzar la reacció de la PCR en un termociclador tèrmic Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn). El programa que es va utilitzar per aquesta reacció es detalla a la Figura 3.2.

Figura 3.2. Programa de la PCR utilitzat per l'amplificació de ADN per les diferents espècies de *Bifidobacterium*.



El resultat de la PCR es va visualitzar en un gel d'agarosa al 2 % seguint el protocol descrit en l'Annex II.

L'origen de les mostres analitzades d'aigües residuals de plantes depuradores i d'escorxadors municipals de vaques, porcs i aus es detallen en la Taula 2.4 del capítol 2.

3.2.6. Definició d'una PCR múltiple per *B. adolescentis* i *B. dentium* (PCR múltiple ADO-DEN)

Es va definir una PCR múltiple específica per a determinar l'origen de la contaminació fecal humana atenent als resultats de la presència d'espècies de *Bifidobacterium* en aigües residuals (3.2.5). El procediment es va dissenyar amb dos espècies de *Bifidobacterium* i utilitzant dos passos d'amplificació. Primer es va realitzar una PCR utilitzant els iniciadors del gènere *Bifidobacterium* Im26 i Im3 indicats

prèviament en la Taula 3.1, i seguint el protocol explicat al paràgraf 3.2.4 (Kaufmann *et al.* 1997). Posteriorment, els productes amplificats de PCR es van utilitzar per a una segona PCR en la qual es van barrejar els iniciadors de *B. adolescentis* i *B. dentium* en una mateixa barreja. Per tal d'ajustar les concentracions dels diferents reactius de la PCR múltiple es van assajar tres PCRs múltiples amb diferents concentracions dels iniciadors de *B. adolescentis* i *B. dentium* (Taula 3.6).

Taula 3.6. Diferents concentracions d'iniciadors per a la definició d'una PCR múltiple ADO-DEN.

Reactius	Volum (µl)	Concentració final	Volum (µl)	Concentració final	Volum (µl)	Concentració final
Buffer 10X ¹	2,5	1X	2,5	1X	2,5	1X
dNTPs (25mM)	0,2	200µM	0,2	200µM	0,2	200µM
Primer ADO-1	1,5	0,25µM	1,5	0,25µM	1,5	0,25µM
Primer ADO-2	1,5	0,25µM	1,5	0,25µM	1,5	0,25µM
Primer DEN-1	1,5	0,25µM	3	0,50µM	4,5	0,75µM
Primer DEN-2	1,5	0,25µM	3	0,50µM	4,5	0,75µM
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,2	1U	0,2	1U	0,2	1U
Aigua estèril	18,1		15,1		12,1	
ADN extret	1		1		1	
Volum total	25 µL		25 µL		25 µL	

¹ 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3 (a 25°C), 15 mM MgCl₂, 1% Tritó x100.

El programa d'amplificació que es va utilitzar va ser el mateix que estava descrit per a la PCR específica per espècies, que prèviament s'ha descrit en l'apartat 3.2: un cicle de desnaturalització de l'ADN de 94°C durant 5 min, seguits per 35 cicles que consten de 94°C durant 20 segons, 55°C per a 20 segons i 72°C per a 30 segons, i finalment un cicle d'elongació del ADN a 72°C durant 5 min. Els productes d'amplificació es van sotmetre a una electroforesi en gel d'agarosa d'un 3%, seguit d'una tinció de bromur d'etidi (Annex II).

3.2.7. Determinació de la sensibilitat de la PCR múltiple per *B. adolescentis* i

B. dentium

Per a determinar la sensibilitat de detecció de *B. adolescentis* i *B. dentium* per la PCR múltiple ADO-DEN es va realitzar un de banc de dilucions seriades en Ringer ¼ de dos creixements de cultius purs de les dues espècies (*B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T). Aquestes dues soques tipus es van descongelar i repicar en el medi líquid RCM com s'ha detallat en l'apartat 2.2.1. Es va determinar la concentració de cada una de les dilucions en un recompte en placa per duplicat en el medi ric CBA.

L'extracció de ADN de cada una de les dilucions realitzades es va realitzar amb el 'QIAamp ADN blood mini kit'. Es va realitzar una primera amplificació del 16S rRNA amb els iniciadors específics de gènere Im26 i Im3 com s'ha descrit anteriorment a l'apartat 3.1. Posteriorment, els productes de l'amplificació de la primera PCR es van utilitzar per a una segona PCR específica per les espècies (*B. adolescentis*- *B. dentium*). El límit de detecció de la PCR múltiple ADO-DEN es va determinar analitzant els productes d'amplificació de cada una de les diferents dilucions mitjançant una electroforesi amb un gel d'agarosa al 3%, seguit d'una tinció amb bromur d'etidi (Annex II).

3.2.8. Avaluació de l'especificitat de la PCR múltiple per *B. adolescentis* i *B.*

dentium

Es van analitzar quatre barreges experimentals d'aigües residuals humanes i animals en diferents proporcions per a fer una avaluació preliminar de l'especificitat de la PCR múltiple per *B. adolescentis* i *B. dentium*. Aquestes barreges van consistir de diferents concentracions d'aigües residuals procedents de diferents orígens: 100% aigua residual humana (H) (control positiu per a aigües residuals humanes) i 0% aigua residual animal (A), i unes barreges amb una concentració d'aigua residual humana decreixent respecte l'aigua residual: 90%H:10%A, 10%H:90%A, 5%H:95%A, 2.5%H:97.5%A, 1%H:99%A i 0%H:100%A (control positiu per a aigües residuals

animals). L'extracció d'ADN, i l'amplificació específica de gènere del 16S rRNA es van realitzar com anteriorment s'ha descrit a l'apartat 3.1. Posteriorment es va realitzar la PCR múltiple per *B. adolescentis* i *B. dentium* per a cada una de les diferents barreges. Com a controls positius es van utilitzar l'ADN amplificat dels cultius purs de *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T de la mateixa manera que s'ha descrit en l'apartat 3.2.2. Els productes d'amplificació es van sotmetre a una electroforesi de gel en agarosa d'un 3%, seguit d'una tinció de bromur d'etidi (Annex II) per a determinar el nivell d'especificitat de la PCR múltiple ADO-DEN.

3.2.9 Detecció de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* en mostres ambientals.

Es van analitzar un total de 41 mostres d'aigües residuals de diferents orígens. Vint-i-dues mostres d'aigües residuals crues es van recollir de quatre EDARs municipals, que es van considerar principalment d'origen fecal humà. Les característiques principals de les EDARs es mostren en la Taula 2.4 del capítol anterior. Dinou mostres d'aigües residuals animals es van agafar de col·lectors d'escorxadors de porc, bestiar i aviram on les característiques també es detallen en la Taula 2.4. Totes les mostres es van transportar a 4°C al laboratori segons protocols estandarditzats (Anònim 1994).

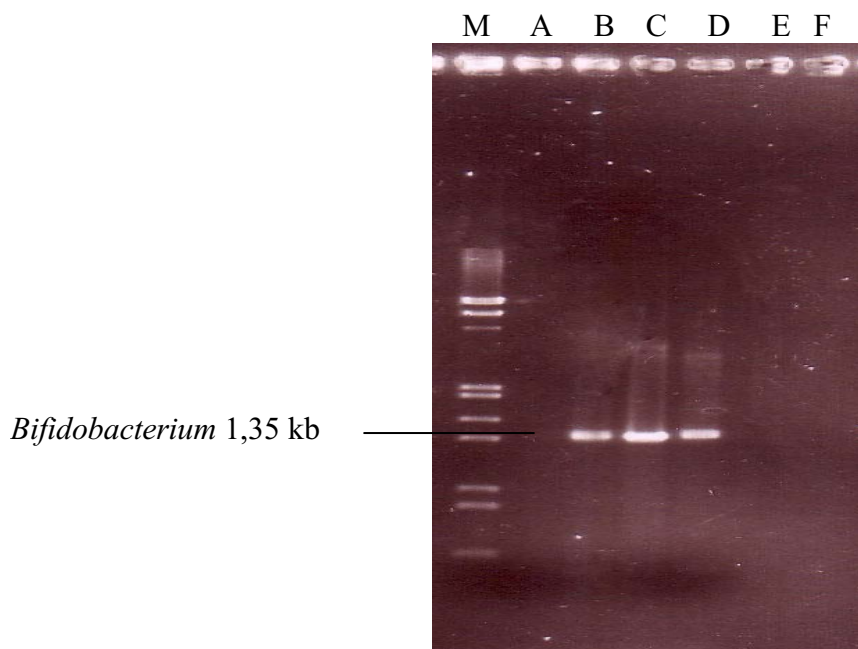
En totes les mostres es va realitzar una enumeració de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals presents a les mostres, i es van calcular les diferents proporcions en valors absoluts entre les bifidobactèries fermentadores de sorbitol i les bifidobactèries totals. L'enumeració d'aquests dos paràmetres microbiològics ja s'ha descrit en el capítol anterior (2.2.1). Posteriorment les mostres es van guardar a -80°C pel posterior anàlisi molecular.

3.3. Resultats

3.3.1. Extracció de l'ADN de les mostres ambientals

En la Figura 3.3 s'observen els patrons de bandes en un gel al 0.8% d'agarosa de l'electroforesi de les PCRs de gènere de *Bifidobacterium* per a les diferents tècniques d'extracció valorades. Els mètodes descrits en la bibliografia (Matsuki *et al.* 1999; Zhu *et al.* 1993) i el protocol d'extracció d'ADN "QIAGEN blood Mini Kit" van presentar una amplificació positiva pels iniciadors genèrics Im3 i Im26 del gènere *Bifidobacterium* indicant que l'extracció d'ADN s'havia produït satisfactòriament en les mostres d'aigua residual crua. No es va obtenir una extracció i amplificació d'ADN pel mètode de QIAGEN "QIAGEN stool Mini Kit" en cap de les dues rèpliques realitzades.

Figura 3.3. Patrons de bandes de la PCR de *Bifidobacterium* de l'extracció d'ADN de les mostres d'aigües residuals. **M:** marcador d'ADN lambda enzim (Annex II). **A:** Protocol adaptat de "QIAGEN stool Mini Kit". **B:** Protocol de "QIAGEN blood Mini Kit". **C:** Mètode de Matsuki i Zhu. **D:** control positiu. **E:** control negatiu d'extracció de l'ADN. **F:** control negatiu.



3.3.2. Selecció de les espècies de *Bifidobacterium* associades a la contaminació fecal d'origen humà

La relació de les diferents espècies de *Bifidobacterium* associades a un origen humà que es van trobar en les mostres analitzades s'indiquen en la Taula 3.7. Totes les mostres d'aigües residuals tant humanes com d'animals van mostrar una amplificació positiva del gen del 16S rARN pels iniciadors específics del gènere *Bifidobacterium*. Els productes d'aquesta amplificació es van sotmetre a una segona PCR amb els iniciadors específics d'espècie. Totes les mostres d'aigües residuals humanes van presentar senyal positiva per a *B. adolescentis*. Onze mostres d'aigües residuals humanes van ser positives per a *B. dentium* i *B. catenulatum*. Les espècies *B. bifidum* i *B. longum* van presentar senyal positiva per a vuit i set mostres d'aigües residuals humanes, respectivament. La meitat d'aquestes mostres van ser positives per a *B. infantis* i *B. breve* mentre que *B. angulatum* només es va detectar en cinc d'aquestes mostres d'aigües residuals humanes. Finalment, *B. gallicum* no es va trobar en cap de les mostres d'aigües residuals humanes analitzades (Taula 3.7.). *B. adolescentis*, *B. dentium* i *B. longum* no van presentar cap tipus de senyal en les mostres dels col·lectors d'escorxadors d'aigües residuals animals. Una mostra d'aigües residuals de vaques va ser positiva per a *B. infantis*, i dues mostres d'aigües residuals (boví i aviram) van ser positives per a *B. catenulatum*. Tres mostres d'aigües residuals (una de porcí i dues d'aviram) van ser positives per a *B. angulatum* i tres per a *B. breve* (una de porcí i dues d'aviram). Finalment, *B. bifidum* es va trobar en quatre d'aquestes mostres d'aigües residuals analitzades (dues de boví, una de porcí i una d'aviram).

Taula 3.7. Distribució de les espècies de *Bifidobacterium* associades a un origen humà en aigües residuals de EDARs i col·lectors d'escorxadors en base als iniciadors específics pel gènere i les espècies indicades basats en 16S rRNA (Matsuki *et al.* 1999). **N:** Nombre de mostres. Els resultats estan expressats com nombre d'amplificacions positives respecte el nombre de mostres analitzades. **Gènere:** nombre d'amplificacions positives pel gènere amb els iniciadors específics de *Bifidobacterium* lm26 i lm3 (Kaufmann *et al.* 1997). **ADO:** *B. adolescentis*, **DEN:** *B. dentium*, **ANG:** *B. angulatum*, **BIF:** *B. bifidum*, **BRE:** *B. breve*, **CAT:** *B. catenulatum*, **GAL:** *B. gallicum*, **INF:** *B. infantis*, **LON:** *B. longum*. **ND:** No determinat.

Orígens	N	Gènere	ADO	DEN	CAT	BIF	LON	BRE	INF	ANG	GAL
Humà	12	12/12	12/12	11/12	11/12	8/12	7/12	6/12	6/12	5/12	0/12
Animal	8	8/8	0/8	0/8	2/8	4/8	0/8	3/8	1/8	3/8	ND
Boví	2	2/2	0/2	0/2	1/2	2/2	0/2	0/2	1/2	0/2	ND
Porcí	2	2/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/2	1/2	ND
Aviram	4	4/4	0/4	0/4	1/3	1/3	0/4	2/2	0/4	2/2	ND

3.3.3. Definició d'una PCR múltiple per *B. adolescentis* i *B. dentium* (PCR-múltiple ADO-DEN)

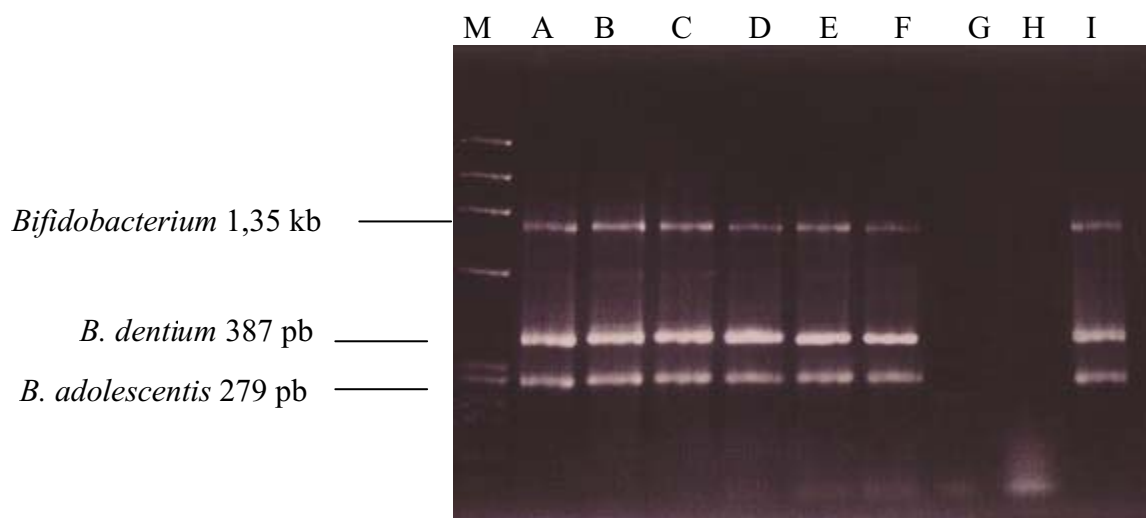
Es va definir una PCR múltiple per *B. adolescentis* i *B. dentium* per a detectar les dues espècies alhora en les diferents mostres d'aigües residuals. Es van establir les concentracions òptimes per als iniciadors específics de les dues espècies quan es van utilitzar conjuntament. En la Taula 3.8 s'observen les concentracions finals de la PCR múltiple ADO-DEN. Es van realitzar unes dilucions seriades dels cultius purs crescuts de 48 hores a 37°C de les dues espècies de *Bifidobacterium* per establir la sensibilitat del mètode. En la Figura 3.4 es mostren els productes de la PCR obtinguts d'aquestes dilucions seriades en utilitzar la PCR múltiple ADO-DEN. Atenent al nombre de UFC quantificades per cultiu en placa que disposàvem en cada dilució, el límit de detecció per al nou mètode va ser 10 UFC/mL.

Taula 3.8. Quadre de les concentracions finals de la PCR múltiple ADO-DEN.

Reactius	Volum (μ l)	Concentració final
Buffer 10X ¹ ,	2,5	1X
dNTPs (25mM)	0,2	200 μ M
Primer ADO-1	1,5	0,25 μ M
Primer ADO-2	1,5	0,25 μ M
Primer DEN-1	3	0,50 μ M
Primer DEN-2	3	0,50 μ M
Taq polimerasa (5 U/ μ l)	0,2	1U
Aigua estèril	15,1	
ADN extret	1	
Volum total	25 μL	

¹ 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3 (a 25°C), 15 mM MgCl₂, 1% Tritó x100

Figura 3.4. Electroforesi en un gel d'agarosa al 3% dels productes de la PCR múltiple ADO-DEN obtinguts de les diferents dilucions seriades dels diferents cultius mixtes de *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T per a determinar la sensibilitat del mètode. **M:** marcador d'ADN phiX 174: **A:** 10⁶ UFC/mL, **B:** 10⁵ UFC/mL, **C:** 10⁴ UFC/mL, **D:** 10³ UFC/mL, **E:** 10² UFC/mL, **F:** 10¹ UFC/mL, **G:** 10⁰ UFC/mL, **H:** control negatiu, **I:** control positiu.



3.3.4. Avaluació de l'especificitat de la PCR múltiple per *B. adolescentis* i *B. dentium*

Les barreges experimentals d'aigües residuals humanes i aigües residuals animals en les seves diferents proporcions van mostrar una amplificació positiva per a les dues espècies en aplicar la PCR múltiple ADO-DEN.

En la barreja 100% d'aigua residual humana (H) respecte el 0% d'aigua residual d'origen animal (A) es va produir una amplificació de l'ADN per les dues espècies (Figura 3.5.). En l'anàlisi de l'aigua residual exclusivament animal (H) on no hi ha cap tipus de contaminació fecal humana no es va produir cap tipus de senyal com en el cas del control negatiu. En tota la degradació de les diferents proporcions d'aigües residuals animals respecte aigües residuals d'origen humà es detecta una senyal positiva de totes dues espècies. Es van detectar les dues espècies fins el límit de 1% d'aigua residual d'origen humà respecte un 99% d'aigua residual animal (Figura 3.5, G).

Figura 3.5. Els patrons de l'electroforesi en gel d'agarosa de la PCR múltiple ADO-DEN obtinguts de les barreges experimentals de les aigües residuals d'origen humà i de les aigües residuals d'origen animal. Les diferents barreges estan indicades en les proporcions d'aigua residual d'origen humà i animal respecte els volums (v:v): **M:** Marcador d'ADN phiX 174 (Annex II). **A:** 100H:0A, **B:** 90H:10A, **C:** 10H:90A, **D:** 7,5H:92,5A **E:** 5H:95A, **F:** 2,5H:97.5A, **G:**1H:99A, **H:** 0H:100A, **I:** control negatiu, **J:** control positiu.

M A B C D E F G H I J

Bifidobacterium 1,35 kb —————
B. dentium 387 pb —————
B. adolescentis 279 pb —————



3.3.5. Detecció de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* en mostres ambientals

La detecció de *B. adolescentis* i *B. dentium* en les mostres d'aigües residuals d'origen humà i de les aigües residuals d'origen animal es mostren a la Taula 3.9. Totes les mostres d'aigües residuals humanes van mostrar una amplificació positiva per a la PCR múltiple ADO-DEN. Només tres mostres d'aigües residuals animals van presentar una amplificació positiva per a la PCR múltiple ADO-DEN. D'aquestes, dues mostres d'aigües residuals d'escorxadors de vaques varen donar una amplificació positiva per totes dues espècies. Una mostra d'aigua residual dels escorxadors d'aviram va donar una amplificació positiva per a *B. adolescentis*, però no per a *B. dentium*. La resta de mostres d'aigües residuals animals no van presentar cap tipus d'amplificació positiva per la PCR múltiple ADO-DEN.

La proporció G/T entre l'enumeració de bifidobactèries fermentadores de sorbitol i l'enumeració de bifidobactèries totals en mostres d'aigües residuals d'origen humà va ser de 0,21-0,30. Mentre que en les mostres d'aigües d'origen animal aquesta proporció va ser de 0,00-0,05 (Taula 3.9.).

Taula 3.9. Resultats de la PCR múltiple ADO-DEN juntament amb el recompte de bifidobactèries fermentadores de sorbitol (**G**) i bifidobactèries totals (**T**) en aigües residuals d'origen humà i animal. **N**: nombre de mostres. **PCR múltiple**: nombre de mostres que presenten una amplificació positiva pel mètode respecte el nombre total de mostres analitzades.

	N	PCR Múltiple	ADO	DEN	G/T
Origen Humà					
EDAR 1	6	6/6	6/6	4/6	0,21
EDAR 2	12	12/12	12/12	10/12	0,30
EDAR 3	2	2/2	2/2	1/2	0,26
EDAR 4	2	2/2	2/2	2/2	0,25
Origen Animal					
Escorxador 1	5	0/5	0/5	0/5	0,01
Escorxador 2	2	0/2	0/2	0/2	0,02
Escorxador 3	2	2/2	2/2	2/2	0,00
Escorxador 4	2	0/2	0/2	0/2	0,00
Escorxador 5	5	0/5	0/5	0/5	0,01
Escorxador 6	3	1/3	1/3	0/3	0,03

3. 4. Discussió

Bifidobacterium s'ha suggerit com a indicador de contaminació fecal en aigua, ja que aquest gènere compleix la majoria dels requeriments per a ser un bon microorganisme indicador de la contaminació fecal (Biavati *et al.* 1992). A més a més, algunes de les espècies pertanyents a aquest gènere s'han associat a un origen fecal humà mentre que altres a un origen exclusivament animal (Gavini *et al.* 1991; Mara i Oragui 1983; Matsuki *et al.* 1999; Mullie *et al.* 2003; Nebra *et al.* 2003; Scardovi *et al.* 1971) . En aquest capítol s'ha estudiat la distribució de les diferents espècies de *Bifidobacterium* que estan relacionades amb un origen humà en aigües residuals urbanes i d'escorxadors. La detecció d'aquestes espècies s'ha basat en l'amplificació del gen del 16S rARN de les espècies de *Bifidobacterium* associades a humans (Matsuki *et al.* 1999). Posteriorment, s'han utilitzat els iniciadors específics per les espècies relacionades exclusivament amb aigües residuals humanes, per a desenvolupar una PCR múltiple.

L'adaptació de les PCRs específiques per l'anàlisi d'aigües residuals va ser satisfactòria. Es van detectar la majoria de les espècies analitzades en totes les mostres d'aigua residual d'origen humà. Així es va realitzar una distribució de les diferents espècies de *Bifidobacterium* en els diferents tipus d'aigües. *B. adolescentis* i *B. dentium* es van detectar en dotze i onze de les dotze mostres d'aigües residuals humanes respectivament. Cap de les dues espècies no es va trobar en les mostres analitzades d'aigües residuals animals. Encara que *B. catenulatum* es va trobar en onze de les mostres d'aigües residuals humanes, no es va considerar com un bon indicador de contaminació fecal d'origen humà perquè es va detectar en dues mostres d'aigües residuals animals. Conseqüentment, la detecció conjunta i específica de *B. adolescentis* i *B. dentium* en aigües residuals d'origen humà podria ser utilitzat com indicador de l'origen de contaminació fecal en aigua. Aquest resultat coincideix amb altres estudis independents en els quals els seus autors proposaven *B. adolescentis* (Lynch *et al.* 2002) i *B. dentium* (Nebra *et al.* 2003) com espècies específiques d'origen humà. Els dos estudis suggerien aquestes espècies per a distingir l'origen de la contaminació fecal humana. Tanmateix, l'ús de *Bifidobacterium* com a indicador de font de la contaminació fecal s'ha suggerit durant molts anys, però la manca d'un medi altament selectiu que

pugui distingir el gènere *Bifidobacterium* dels altres gèneres (Beerens 1990; Mara i Oragui 1983; Nebra i Blanch 1999) ha produït una falta de coneixement i comportament d'aquest gènere en el medi ambient. Les metodologies moleculars basades en PCR, hibridació colonial, DGGE, etc. que s'han desenvolupat en aquests últims anys aporten una nova aproximació al coneixement del gènere (Dong *et al.* 2000a; Kaufmann *et al.* 1997; Lynch *et al.* 2002; Miyake *et al.* 1998; O'Riordan i Fitzgerald 1997; Requena *et al.* 2002; Satokari *et al.* 2001; Ventura i Zink 2002; Yamamoto *et al.* 1992). En aquest capítol es presenta una detecció molecular, simultània i específica de les dues espècies de *Bifidobacterium* que no exigeix del creixement d'aquestes bacteries en medis selectius i diferencials. Aquest nou mètode es complementa amb el creixement de les bifidobactèries en el medi HBSA per a la determinació de proporcions de soques de *Bifidobacterium* fermentadores de sorbitol respecte les bifidobactèries totals, tal i com s'ha exposat en el capítol 2.

El desenvolupament de la PCR múltiple ADO-DEN, que combina prèviament iniciadors específics definits anteriorment per a cada espècie, proporciona un valor addicional a la detecció d'una única espècie proposada en altres estudis (Lynch *et al.* 2002; Nebra *et al.* 2003). A més a més, el mètode desenvolupat no requereix de l'aïllament ni del cultiu d'aquestes espècies. Això dona a la metodologia un valor afegit, ja que la manca de medis selectius com ja s'ha indicat prèviament fa difícil la detecció de *Bifidobacterium* en mostres ambientals. El nou mètode permet la detecció d'aquestes dues espècies en una concentració baixa, presenta un llindar de sensibilitat de 10 UFC/mL. Tal i com es va comprovar mitjançant les barreges dels dos cultius purs crescuts a 48 h de les dues espècies i del ajustament de les concentracions dels iniciadors de les dues espècies per a la PCR múltiple ADO-DEN que va permetre l'ús conjunt de les dues espècies en una mateixa reacció de PCR. La concentració dels iniciadors *B. dentium* (0,50µM) va ser el doble de la concentració dels iniciadors de *B. adolescentis* (0,25µM) degut a la baixa concentració de *B. dentium* en les aigües residuals observada. Tot i així, en diverses mostres d'aigües residuals analitzades no es va poder detectar *B. dentium*.

L'avaluació de l'especificitat de la PCR múltiple ADO-DEN utilitzant barreges experimentals d'aigües residuals d'origen animal i humà ens revela que és possible detectar un 1% de la contaminació fecal humana respecte el 99% de contaminació fecal animal.

Es va obtenir una amplificació positiva mitjançant la PCR múltiple ADO-DEN en totes les mostres d'aigües residuals d'origen humà. Tanmateix, *B. dentium* només es va detectar en 17 de 22 mostres d'aigües residuals municipals. A més a més, 3 de les 22 mostres d'aigües residuals animals van presentar senyal positiva per a la PCR múltiple ADO-DEN (Taula 4): dues mostres de l'escorxador 3 i una de l'escorxador 6. En el primer cas (escorxador 3, boví) les dues espècies mostraven amplificació positiva. Llavors, es va revisar d'on es rebien les aigües residuals a la xarxa de l'escorxador analitzat i es va trobar que hi havia una aportació dels lavabos dels treballadors. Probablement, és aquesta la raó per la qual es van detectar aquestes dues espècies de *Bifidobacterium* en aigües animals, ja que hi havia una contaminació d'origen humà. En el segon cas (escorxador 6, aviram), només *B. adolescentis* presentava una senyal positiva. També es va realitzar una revisió del col·lector i de la xarxa d'aigües residuals de l'escorxador i no es va detectar cap tipus d'entrada d'aigua residual d'origen humà. Per aquest motiu no es pot descartar que *B. adolescentis* estigui present també a la microbiota intestinal d'alguna espècie d'aus. En estudis futurs caldria considerar una anàlisi exhaustiu de la presència d'aquesta espècie en escorxadors d'aviram.

La PCR múltiple ADO-DEN està basada en la detecció del gen del 16S rRNA de *B. dentium* i *B. adolescentis* per iniciadors d'espècie específics i no necessita d'un creixement previ en medis selectius. Ara bé, la utilització conjunta d'aquesta metodologia amb la proporció de bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals en el medi selectiu HBSA ens dona un valor afegit que no pas utilitzant aquestes dues tècniques per separat.

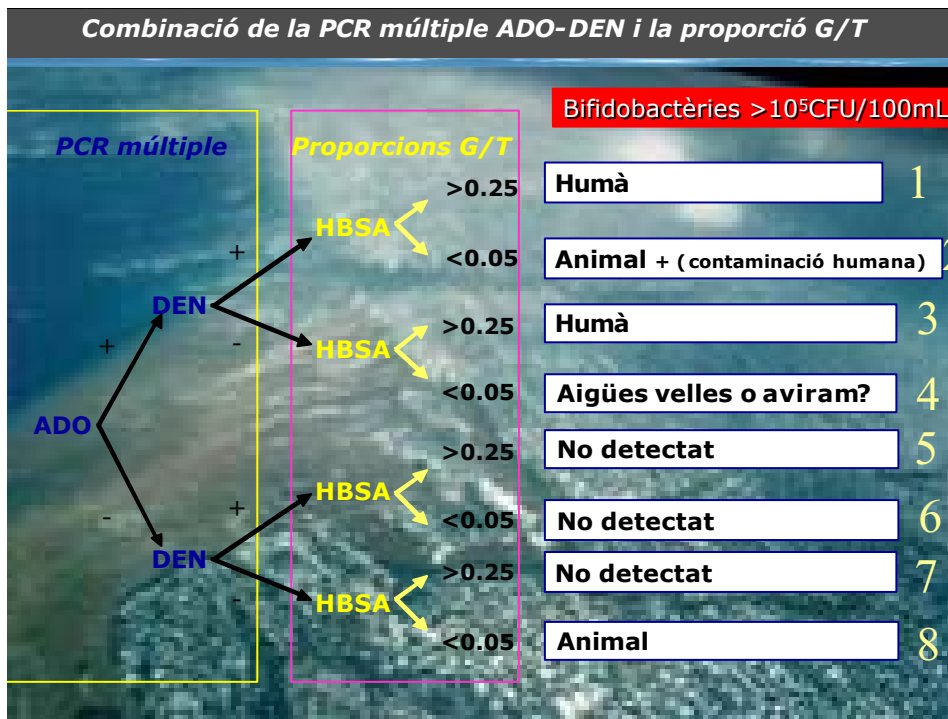
En la Figura 3.6 es mostren els possibles resultats diferents, quan es combinen les dues metodologies desenvolupades en aquest capítol i l'anterior: la PCR múltiple ADO-DEN i les proporcions G/T. Els resultats esperats són:

- La presència de *B. adolescentis* i *B. dentium* alhora en una mostra ambiental i una proporció G/T per sobre 0,21 ens indica que la contaminació fecal en l'aigua analitzada té un origen humà. Aquesta situació ha estat trobada exclusivament en mostres d'origen humà analitzades i mai en cap mostra d'origen animal. (Figura 3.1.1).
- La presència de *B. adolescentis* i *B. dentium* alhora en una mostra ambiental i una proporció G/T per sota del 0,03 és indicatiu d'una contaminació fecal d'origen animal, però amb alguna aportació de contaminació fecal humana. Aquesta no es pot detectar amb el medi HBSA, però si que el creixement en el medi ens indica que la contaminació fecal és animal. La major sensibilitat per a detectar *B. adolescentis* i *B. dentium* per la PCR múltiple ens permet detectar la menor aportació d'una contaminació d'origen humà (Figura 3.6.2). Aquest cas es va donar en les mostres de l'escorxador 3.
- La presència sola de *B. adolescentis* en una mostra ambiental i una proporció G/T per sobre 0,21 també ens indica d'una contaminació fecal d'origen humà. S'ha observat que en algunes mostres d'aigües residuals humanes no ens resulta possible detectar *B. dentium* ja que podria estar en una concentració per sota del llindar de detecció (Figura 3.6.3). Aquesta situació es va produir en mostres dels escorxadors 1, 2 i 3.
- La presència sola de *B. adolescentis* en una mostra ambiental i una proporció G/T per sota de 0,02 ens porta a una situació incerta ja que ens pot indicar una contaminació fecal humana remota en el temps. En aquest cas les bifidobactèries poden no ser cultivables en un medi selectiu com el HBSA degut a què les condicions ambientals aeròbiques generen un estrès fisiològic determinat per una baixa persistència. És possible que *B. dentium* no sigui detectable probablement perquè o bé té una baixa persistència en l'entorn o es troba en concentracions baixes. (Figura 3.6.4). Només quedaria el

resultat positiu de *B. adolescentis* en la PCR múltiple com l'origen de la contaminació fecal humana. Aquests casos s'han trobat en aigües ambientals. Cal indicar que aquesta circumstància també s'ha trobat en una mostra d'aigües residuals d'un escorxador d'aviram. En aquest cas la baixa proporció G/T en el medi HBSA ens indica que la contaminació fecal és d'origen animal, però la detecció de *B. adolescentis* per la PCR múltiple ADO-DEN ens indicaria que hi ha una aportació de contaminació fecal humana. Tal i com s'ha indicat anteriorment es va descartar absolutament l'aportació d'aigües residuals humanes. Per tant, cal no descartar la possibilitat que *B. adolescentis* fos present també a l'intestí de les aus. Aquesta situació correspondria a una mostra del escorxador 6.

- La detecció sola de *B. dentium* no s'ha trobat en cap de les mostres analitzades independentment de la proporció G/T. Aquesta circumstància es probablement deguda a la seva baixa concentració en aigües residuals (Figura 3.6.5 i 3.6.6).
- No s'ha detectat en cap cas l'absència de *B. adolescentis* i *B. dentium* amb un valor superior de la proporció de G/T 0,21. Aquesta situació no trobada ens confirma que la detecció de *B. adolescentis* i de *B. dentium* amb una proporció G/T superior a 0,21 és inequívocament contaminació fecal humana (Figura 3.6.7).
- L'absència de *B. adolescentis* i *B. dentium* i un valor inferior de la proporció G/T de 0,03 ens indicaria inequívocament una contaminació fecal d'origen animal, tal i com ens han confirmat les mostres d'origen exclusivament animal (Figura 3.6.8).

Figura 3.6. Diferents combinacions dels resultats possibles quan es combina l'ús de la PCR múltiple i de la proporció de bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals:



Per tant, basant-nos en aquestes situacions confirmades amb els resultats d'aquest estudi es pot considerar que aquesta nova metodologia molecular juntament amb l'enumeració de bifidobactèries fermentadores de sorbitol, bifidobactèries total i el posterior càlcul de les diferents proporcions bacterianes poden ser eines complementàries per a caracteritzar l'origen de la contaminació fecal en aigües.

Capítol 4

Desenvolupament d'una PCR quantitativa en temps real per a l'enumeració de *B. adolescentis* i *B. dentium*



4.1. Introducció

Els microorganismes en el medi aquàtic poden ser malmesos per diferents causes, per factors físics o químics com la presència d'oxigen, la radiació solar, la concentració de nutrients en el medi, el pH, les variacions de temperatura, la presència de desinfectants (clor i altres biocides), i la presència de metalls com el coure o el zinc (Arany *et al.* 1995; Barcina *et al.* 1997; Gourmelon *et al.* 1994; McFeters *et al.* 1986; McFeters 1989; Toranzos i McFeters 1997). Com a resultat de l'actuació d'aquests factors les diferents poblacions bacterianes a l'aigua poden presentar tres estats diferenciats: cèl·lules no malmeses, cèl·lules estructural o metabòlicament malmeses o lesionades (injured), i cèl·lules mortes que estan irreversiblement malmeses. Les cèl·lules malmeses en unes condicions favorables poden tornar a multiplicar-se, es diu que estan en un estat viable però no cultivable (VBNC) (Chaiyanan *et al.* 2001). S'ha detectat que en aquest estat les cèl·lules poden tenir activitat cel·lular encara que no es puguin multiplicar en el medi ambient, per aquest motiu també s'aplica el concepte de cèl·lules actives però no cultivables (ABNC). Les bacteries patògenes poden mantenir els factors de virulència i poden ser cultivables en determinades condicions tot i estar en un estat VBNC. La presència en sistemes aquàtics de les formes VBNC d'*E. coli*, *Ent. faecalis*, *Vibrio cholerae* i d'altres bacteries representa un risc per a la salut pública (Colwell *et al.* 1985).

El concepte de cèl·lules malmeses o lesionades associades a un microorganisme es defineix com la conseqüència fisiològica o estructural resultant de l'exposició a determinats factors dins l'aigua i es manifesta en la inhabilitat de les cèl·lules malmeses a multiplicar-se sota condicions que sí permeten la multiplicació de les cèl·lules no malmeses. Discrepàncies entre els recomptes a partir d'una mostra ambiental sobre un medi de cultiu selectiu i els obtinguts sobre un medi ric posen de manifest l'existència en les mostres ambientals d'una subpoblació de cèl·lules malmeses, que encara que siguin viables (creixen sobre el medi ric) no són capaces de créixer sobre medis de cultiu selectiu i per tant no detectades en els recomptes de medis selectius (Bissonnette *et al.* 1975; Kang i Siragusa 2001; McFeters 1989).

Per solucionar el problema de la no detecció de les cèl·lules en estat VBNC en medis de cultius, en els darrers anys s'han desenvolupat diferents estratègies per a la detecció de les bacteries sense la necessitat d'un cultiu previ. Entre aquestes estratègies es troba la tècnica de la citometria de flux que s'ha utilitzat per a realitzar diferents estudis d'enumeracions de bacteries en diferents hàbitats sense la necessitat de cultivar les bacteries (Gregori *et al.* 2003; Hoefel *et al.* 2003). Una altra tècnica utilitzada per poder detectar les cèl·lules malmeses o mortes és la detecció "in situ" per microscopia d'epifluorescència utilitzant diferents fluorocroms, com per exemple el DAPI que ens determina la viabilitat de les cèl·lules (Wierzchos *et al.* 2004) o la determinació de l'activitat cel·lular (Rodríguez *et al.* 1992). La detecció del mARN de les diferents poblacions bacterianes també s'ha proposat com un marcador de la viabilitat de les cèl·lules per la seva baixa persistència dins la cèl·lula (Sheridan *et al.* 1998), així s'espera que les cèl·lules en estat VBNC pugin sintetitzar algunes molècules de mARN encara que no es pugin multiplicar (Bürgmann *et al.* 2003; Mar Lleo *et al.* 2000). També s'ha proposat la detecció de les proteïnes HSP com un indicador de la viabilitat de les cèl·lules perquè són proteïnes molt conservades i abundants que determinen la viabilitat de les cèl·lules (Abbaszadegan *et al.* 1997).

Una altra metodologia per a la quantificació de microorganismes independent del cultiu en medis és la tècnica de la PCR quantitativa en temps real que permet quantificar una espècie determinada entre una barreja complexa de poblacions. Aquesta especificitat a nivell d'espècie és realment complicada d'aconseguir amb la utilització de medis selectius. La utilització de la PCR en temps real per a quantificar les poblacions bacterianes és una eina molt eficaç per a estudiar la composició de les diferents comunitats en els seus diferents hàbitats. En el cas dels estudis d'aigües, ens permet quantificar les cèl·lules presents en les mostres analitzades, tant de les cèl·lules mortes, de les cèl·lules malmeses, i com de les cèl·lules cultivables. Fins i tot, amb aquesta tècnica es poden quantificar bacteries descrites fins el moment no s'havien descrit perquè no es podien fer créixer en cap medi, com és el cas de la quantificació d'un nou grup de bacteries reductores de nitrat en diferents sòls (López-Gutiérrez *et al.* 2004). O també permet la quantificació de certs virus que fins el moment no s'han pogut quantificar amb els mètodes tradicionals.

4.1.1. PCR quantitativa en temps real

La PCR quantitativa en temps real és una evolució de la PCR convencional. Aquesta és una tècnica que ofereix tres avantatges fonamentals respecte la PCR tradicional:

- Evita totes les manipulacions posteriors a la amplificació de l'ADN, desapareix el risc de contaminacions
- El temps utilitzat en l'anàlisi disminueix considerablement podent augmentant el nombre de mostres en una mateixa reacció.
- Detecta i (al mateix temps) quantifica l'ADN present en la mostra.

La PCR es realitza en un equip que integra un termociclador de PCR convencional que inclou un espectrofluoròmetre que determina la fluorescència que es produeix en el tub de la mostra amplificada al llarg de tot el procés. La senyal del fluoròfor que emet quan està present en la reacció de la PCR és detecta al final de cada cicle d'amplificació. Amb les diferents senyals detectades al final del procés d'amplificació de l'ADN es realitza una gràfica on s'obté la relació entre l'emissió de fluorescència i la quantitat d'ADN amplificat. S'obté una corba on es descriu l'amplificació de l'ADN durant tot el procés. L'equip utilitza un làser que emet la llum que excita el fluoròfor i la tecnologia de cameres de diodes computaritzats (CCD) determina la fluorescència emesa a les diferents longituds d'ona en funció del fluoròfor que s'utilitzi. La camera CCD és multicanal, el que permet realitzar varis anàlisis simultanis en el mateix tub de reacció de la PCR ja que el làser d'excitació pot emetre llum fins a 488 nm i la camera de detecció utilitza pràcticament tots els fluorocroms (SYBR Green, FAM, VIC, TET, TAMRA).

La quantificació de l'ADN s'aconsegueix mitjançant la realització d'una corba patró en la que es representen les intensitats de fluorescència detectades en mostres d'ADN de concentracions inicials conegudes d'un fragment idèntic del que volem quantificar. La C_t és el cicle fraccionari en què es detecta més fluorescència que la de la pròpia mostra, el que s'anomena soroll de fons. La quantificació d'una mostra es realitza mitjançant l'extrapolació de la C_t de la mostra analitzada amb la C_t de la recta patró realitzada amb les concentracions d'ADN conegudes.

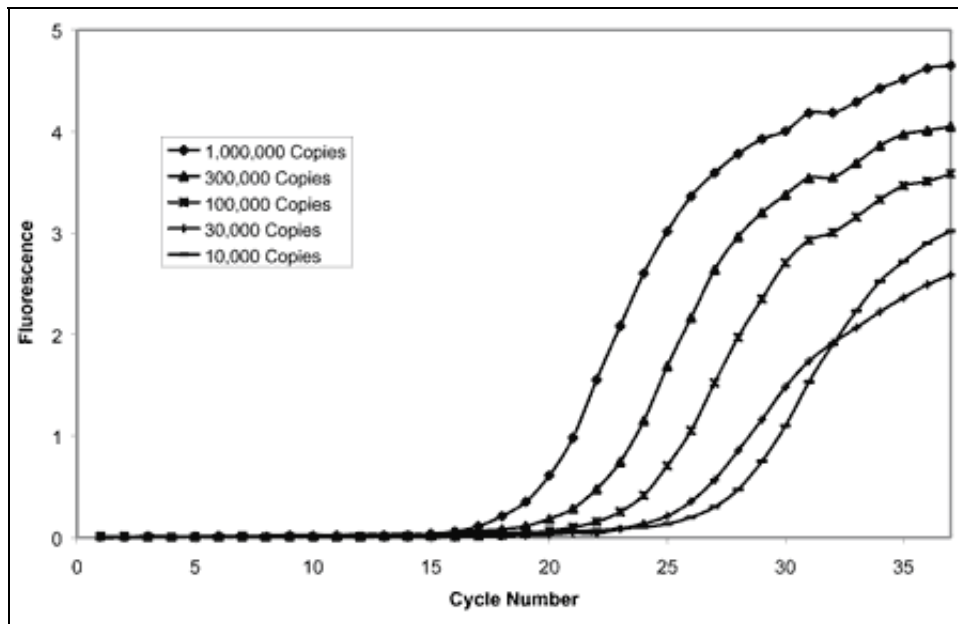
Una quantificació típica es mostra a la Figura 4.1. En aquest perfil de la reacció es diferencien tres parts, una fase inicial, una fase exponencial de multiplicació i una fase estacionària. La fase inicial dura fins que la senyal de fluorescència dels productes de la PCR comencen a ser superiors a la fluorescència del propi sistema. La quantificació de l'ADN només es realitza a la fase exponencial de la reacció, es quantifica l'emissió de fluorescència en aquesta fase de la corba exponencial. La fase estacionària comença quan la eficiència de la reacció va disminuint i per tant la producció d'ADN s'estanca.

Durant la fase exponencial la síntesi d'ADN segueix la següent equació:

$$T_N = T_0 (E)^N$$

On T_N és la quantitat final d'ADN després dels cicles realitzats en la reacció (N). T_0 és la quantitat inicial d'ADN de la mostra analitzada i E és l'eficiència en què es produeix la reacció. L'eficiència màxima que es pot donar en una reacció de PCR és la de dues rèpliques d'ADN per cicle. I el valor mínim és el zero en el que no es produeix cap tipus de senyal en la PCR.

Figura 4.1. Perfil d'una reacció típica de la PCR quantitativa en temps real amb el fluorocrom *SBYR Green*.



Hi ha tres tipus de fluoròfors fluorescents per a la detecció de l'ADN amplificat en la PCR de temps real:

❖ SYBR Green

SYBR Green és un agent intercalant de l'ADN que s'utilitza per a la quantificació d'ADN. Presenta grans avantatges sobre la utilització de les sondes TaqMan, no s'han de sintetitzar sondes d'hibridació amb la problemàtica que això pot suposar. És el fluoròfor més econòmic, més fàcil d'utilitzar i és sensible. Aquest fluoròfor s'uneix a qualsevol doble cadena d'ADN. Aquesta unió inespecífica és el gran desavantatge d'aquest fluoròfor. Si els iniciadors no són prou específics es poden produir contaminacions creuades que amb aquest fluoròfor no es detecten. Per aquest motiu després de cada anàlisi s'han de realitzar les corbes de dissociació (corbes "melting") per determinar si s'ha produït algun tipus d'unió inespecífica. Com qualsevol fluoròfor emet fluorescència quan es excita amb l'UV, la utilització d'aquest fluoròfor és ideal per a PCRs d'un sol producte (Richards *et al.* 2004; Vitali *et al.* 2003).

❖ Sondes TaqMan

Les sondes TaqMan són oligonucleòtids que tenen a l'extrem 5' un fluoròfor i a l'extrem 3' un "quencher". La funció del "quencher" és la inhibició del fluoròfor quan aquests dos estan units. Aquestes sondes s'hibriden específicament en una regió interna del producte amplificat de la PCR. Quan l'ADN polimerasa amb l'activat exonucleasa degrada la sonda, el fluoròfor i el "quencher" queden alliberats i es separen, en aquest instant el fluoròfor queda lliure del "quencher" i pot emetre fluorescència que és detectada per l'aparell. Aquesta fluorescència augmenta a cada cicle proporcionalment a la taxa de degradació de la sonda, ja que es produeix un augment continu de la fluorescència en cada un dels cicles de la PCR (Bach *et al.* 2002; Holland *et al.* 1991).

❖ Molecular Beacons.

Les moleculars Beacons són oligonucleòtids amb una estructura de bucle en la qual els dos extrems estan units, el "quencher" i el fluoròfor estan junts com en el cas de les sondes TaqMan. Com s'ha comentat anteriorment en aquesta situació el fluoròfor no pot emetre fluorescència. Quan la sonda hibrida amb el producte de la PCR, el fluoròfor es separa del quencher, a partir d'aquest moment el fluoròfor alliberat pot emetre fluorescència, l'emissió de fluorescència es produeix només en la fase d'hibridació de la sonda amb el motlle, en la fase de desnaturalització de la reacció que és a una temperatura diferent de la hibridació no es produeix fluorescència ja que la sonda es desenganxa del motlle i el "quencher" i el fluoròfor tornen a estar units. En aquest cas no es produeix un augment continu de la fluorescència en cada un dels cicles de la PCR (Tyagi *et al.* 1998; Uyttendaele *et al.* 2003).

L'enumeració de poblacions bacterianes utilitzant la tècnica de la PCR quantitativa en temps real ha estat una eina molt utilitzada en aquests últims anys. Aquesta tècnica s'ha utilitzat tan per a les enumeracions de bacteries com *Escherichia coli* O157:H7 (Ibekwe i Grieve 2002), *Bacteroides* i *E. coli* (Huijsdens *et al.* 2002), com de gèneres: *Enterobacteriaceae* o del grup *Bacteriodes-Prevotella* (Bartosch *et al.* 2004). Aquesta tècnica també s'ha utilitzat per a enumerar diferents virus, com els treballs realitzats amb enterovirus (Donaldson *et al.* 2002) o treballs realitzats amb els

virus de Norwalk (Richards *et al.* 2004). També s'han efectuat enumeracions en protozous com els estudis realitzats amb *Giardia lamblia* en aigües residuals (Bertrand *et al.* 2004). També hi ha treballs relacionats amb el gènere *Bifidobacterium* que ara descriurem breument.

4.1.2. PCR quantitativa en temps real aplicada al gènere *Bifidobacterium*

Aquesta tècnica de la PCR quantitativa en temps real també s'ha aplicat per a l'estudi de les comunitats bacterianes del tracte intestinal. El desenvolupament d'aquesta tècnica ha permès conèixer d'una manera més minuciosa la composició de les comunitats gastrointestinals dels humans, la relació d'aquestes amb la dieta, i la relació d'aquestes comunitats amb l'estat de la salut humana. Com ja s'ha explicat en el capítol 2, el desenvolupament de nous medis selectius per a l'enumeració de *Bifidobacterium* s'ha produït per la proliferació de productes probiòtics i prebiòtics, en aquest cas, també s'han produït grans avenços en la PCR quantitativa en temps real per a les enumeracions d'aquests productes probiòtics. Fins el moment no hi ha cap treball per a les enumeracions de poblacions de *Bifidobacterium* a nivell d'aigües ambientals.

S'ha descrit la utilització de sondes TaqMan per quantificar poblacions de *Bifidobacterium* en mostres fecals humanes utilitzant la detecció del gen de la transaldolasa (Requena *et al.* 2002). S'ha utilitzat aquest gen per què té seqüències molt conservades que poden ser diana dels iniciadors i de les sondes necessàries per a la realització de la TaqMan. A més a més, s'ha detectat una sola còpia d'aquest gen en el genoma de *B. infantis* ATCC 15702. En aquest estudi, van detectar una bona correlació entre l'enumeració en PCR quantitativa en temps real i recompte en el medi ric BHI en enumeracions de cultius purs. En canvi, aquesta correlació no es va produir en el recompte de *B. infantis* en mostres de femtes de nens (Requena *et al.* 2002).

La utilització del fluoròfor *SYBR Green* també s'ha utilitzat per a les enumeracions de les poblacions de *Bifidobacterium*. S'ha descrit la quantificació de diferents espècies de *Bifidobacterium* en mostres de femtes humanes (Gueimonde *et al.* 2004). Aquests autors també van detectar una bona correlació entre els recomptes

en placa i la tècnica de la PCR en temps real. També van comparar aquesta tècnica amb la tècnica molecular FISH, els recomptes també van ser molt similars, no obstant quan la quantitat de bifidobacteries en la mostra era baixa aquesta correlació disminuïa, ja que es produïa una sobreestimació en el recompte amb la tècnica FISH. Van determinar el límit de detecció de la tècnica en 5×10^4 cèl·lules/g de femtes amb una reproducibilitat del 99 % (Gueimonde *et al.* 2004). En un altre estudi es comparava les enumeracions de diferents soques tipus de *Bifidobacterium* amb la tècnica de la PCR en temps real, recompte en placa sobre medis rics i amb la metodologia DAPI (Matsuki *et al.* 2004). En aquests cas les enumeracions en el medi TOS agar van ser una mica més baixes que les enumeracions en les dues tècniques moleculars utilitzades, depenent de la soca analitzada. També van realitzar una quantificació de sis espècies de *Bifidobacterium* associades a un origen humà en sis persones, amb recompte en medi selectiu i les tècniques moleculars PCR quantitativa i FISH. El límit de detecció de la PCR quantitativa va ser de 10^6 cèl·lules/g de femtes, mentre que en la tècnica FISH el límit va ser de 10^8 cèl·lules/g de femtes (Matsuki *et al.* 2004). Altres estudis han utilitzat la PCR quantitativa en temps real per a les enumeracions de certes espècies de *Bifidobacterium* en mostres probiòtiques, en femtes d'humans, en cultius "starters" i en biòpsies, etc. (Matsuki *et al.* 2004; Vitali *et al.* 2003). També s'ha realitzat una avaluació del nombre de còpies de l'operó del gen *rrn* en les espècies de *Bifidobacterium* d'origen humà (Candela *et al.* 2003).

Atenent a què en el tercer capítol es va desenvolupar una eina eficaç per a la detecció de *B. adolescentis* i *B. dentium* en aigües residuals en aquest capítol es va desenvolupar una altra eina molecular per a la quantificació d'aquestes dues espècies en aigües residuals. Es va plantejar una eina molecular simple, que no precisés d'un cultiu previ, d'un temps curt d'anàlisi, específica i sensible. En aquest cas, es va optar per la PCR quantitativa en temps real. Dels tres marcadors a escollir per a la realització d'una PCR quantitativa es va triar el fluoròfor SBYR *Green*. Amb aquest fluoròfor no s'han de dissenyar sondes com en la tècnica TaqMan, ni s'han de buscar conformacions d'estructures secundàries complexes dels iniciadors com en la realització de les PCR quantitatives amb el fluoròfor de les moleculars Beacons. Una altra raó va ser que posseïem uns iniciadors molt específics (com s'ha comprovat en el capítol 3) per a les dues espècies amb què la inespecificitat del marcador no era un problema, i finalment, que de les tres opcions era la més econòmica.

Per aquests motius els objectius d'aquest capítol han estat:

1. Desenvolupar, una nova tècnica molecular per a la detecció quantitativa de les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* en aigües residuals d'origen humà.
2. Comparar l'eficàcia d'aquesta tècnica molecular amb la tècnica molecular de la PCR múltiple ADO-DEN també en aigües residuals d'origen humà.

4.2. Materials i Mètodes

4.2.1. Medis de cultiu, condicions de creixement i soques tipus

Per a la l'enumeració de les espècies tipus de *Bifidobacterium* es va utilitzar el medi ric CBA, suplementat amb 5 g/L de glucosa i 0,5 g/L de L-cisteïna-HCl tal i com s'ha descrit en els capítols anteriors. Per a recuperar les soques tipus de l'estat de congelació es va utilitzar el medi líquid RCM. Les soques utilitzades en aquest capítol van ser *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T. Cada una de les dues soques tipus es van recuperar de l'estat de congelació com s'ha descrit a l'apartat 2.2.1. Es van inocular cada una de les soques tipus en tubs de vidre estèrils de 20 mL plens del medi líquid RCM també estèril. Les soques es van incubar a 37°C durant 48 h.

4.2.2. Desenvolupament de la tècnica de la PCR en temps real per *B. adolescentis* i *B. dentium*

Per a realitzar una PCR quantitativa no es pot efectuar una primera amplificació de la mostra com es va realitzar en el capítol 3 perquè es produiria una sobreestimació del contingut d'ADN inicial. Per aquest motiu es va definir prèviament una nova PCR per a la detecció de *B. adolescentis* i *B. dentium*. La PCR anuada amb els iniciadors descrits en la bibliografia (Matsuki *et al.* 1999) va ser poc eficient per a la realització de la PCR quantitativa en temps real. En la Taula 4.1 s'observen les concentracions de cada un dels diferents reactius utilitzats per aquesta nova PCR quantitativa. Es va realitzar una amplificació del gen del 16S rRNA de les soques tipus de *B. adolescentis* i *B. dentium* amb els iniciadors específics descrits per Matsuki (Taula 4.2) de cada una de les mostres, per la tècnica de la PCR convencional ajustant els temps de desnaturalització, hibridació i elongació del programa utilitzat en el capítol 3 per a la PCR específica d'espècie.

Taula 4.1. Barreja de la reacció per a la realització de la PCR quantitativa per a les diferents espècies de *Bifidobacterium*:

Reactius	Volum (µl)	Concentració final
Buffer SBYR Green 10X	2,5	1X
Mg Cl 2 (25 mM) ²	1,5	2 mM
dNTPs (12.5 mM) ²	0,4	200µM
Iniciador*	1,5	0,25µM
Terminador*	1,5	0,25µM
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,2	1U
Aigua estèril	17,8	
ADN extret	1	
Volum total	25 µL	

*Cada barreja li va correspondre el seu joc d'iniciadors específics per a cada una de les dues soques analitzades. Les seqüències de cada un dels iniciadors es detallen en la Taula 4.2.

Un cop ajustades les concentracions dels reactius i els diferents temps del programa de la PCR es va realitzar l'amplificació de les mostres amb el termociclador ABI Prism ® 7700 Sequence Detection utilitzant el programa SDS v. 1.6.3 (Applied Biosystems). El fluoròfor que es va utilitzar per aquesta nova PCR quantitativa en temps real va ser el SYBR Green (PCR Core Reagents AB).

Taula 4.2. Seqüències dels iniciadors específics per a les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* (Matsuki *et al.* 1999).

Espècies	Iniciadors	Seqüències	Mida (pb)	Situació ^a	Mida producte
<i>B. adolescentis</i>	BiADO-1	CTCCAGTTGGATGCATGTC	19	182-200	279
	BiADO-2	CGAAGGCTTGCTCCCAGT	18	474-442	
<i>B. dentium</i>	BiDEN-1	ATCCCGGGGGTTCGCCT	17	72-89	387
	BiDEN-2	GAAGGGCTTGCTCCCGA	17	473-443	

^a Correspon a l'enumeració del gen del 16S rRNA d' *Escherichia coli* (Brosius *et al.* 1981).

La recta patró necessària per a la realització de la PCR quantitativa en temps real es va realitzar mitjançant dos cultius purs de les dues espècies a analitzar *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T. Aquestes dues soques tipus es van descongelar i repicar en el medi líquid RCM com s'ha detallat en l'apartat 2.2.1. Es va realitzar un banc de dilucions seriades en Ringer ¼ dels dos creixements realitzats de les dues espècies. Es va determinar la concentració de cada una de les dilucions per un

recompte en placa per duplicat en el medi ric CBAs a les 48 h d'incubació a 37°C en condicions anaeròbies. Paral·lelament es va realitzar l'extracció de l'ADN de cada una de les dilucions realitzades amb el "QIAamp ADN blood mini kit", mètode descrit en l'apartat 3.2.3. D'aquesta manera es va crear una recta patró amb les concentracions conegudes d'ADN per a cada una de les dilucions seriades. Aquesta recta és essencial per la PCR quantitativa, alhora de quantificar l'ADN de les mostres. El límit de detecció de la PCR convencional es va determinar analitzant els productes d'amplificació de cada una de les diferents dilucions mitjançant una electroforesi amb un gel d'agarosa al 2%, seguit d'una tinció amb bromur d'etidi.

Posteriorment, de cada una de les extraccions d'ADN de les dilucions seriades realitzades anteriorment es va efectuar una recta patró de les dues espècies, en el qual es va determinar el llindar de detecció de la PCR quantitativa en temps real de les dues espècies mitjançant l'aparell ABI Prism ® 7700.

4.2.3. Enumeració de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* per la tècnica de PCR en temps real en aigües residuals d'origen humà

Es van analitzar un total de 22 mostres d'aigües residuals de quatre EDARs municipals, on es considera que reben principalment càrrega fecal d'origen humà. Aquestes mostres són les mateixes en què es van analitzar per la tècnica de la PCR múltiple ADO-DEN. Les característiques principals de les EDARs es mostren en la taula 2.4 del capítol 2. Es van utilitzar les extraccions d'ADN de les mostres analitzades en el capítol 2 i 3 que s'havien guardat a -20°C. Aquestes extraccions d'ADN es poden mantenir a -20°C d'acord amb les indicacions del kit d'extracció "QIAamp DNA Blood Mini Kit".

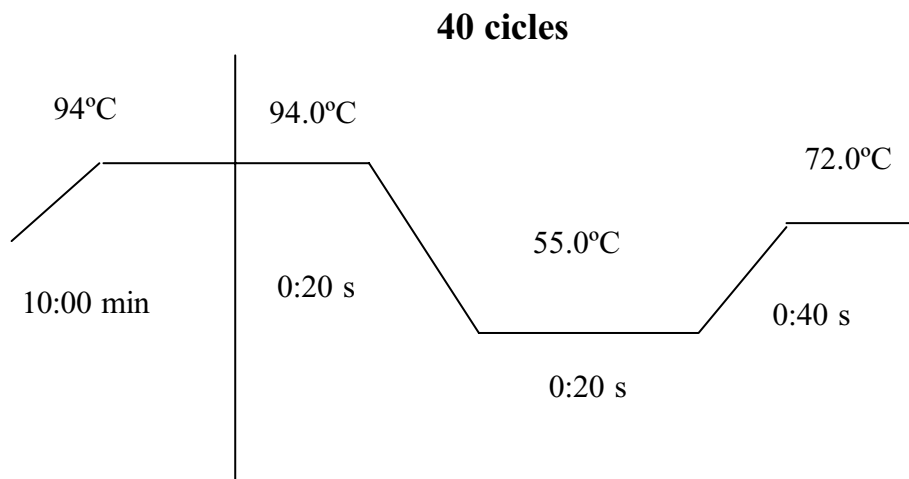
La detecció de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* per la tècnica de la PCR múltiple ADO-DEN en les aigües residuals d'origen humà es descriu en el capítol 3.2.6. L'enumeració d'aquestes dues soques mitjançant la tècnica de la PCR quantitativa en temps real es detalla en l'apartat 4.3.2.

4.3. Resultats

4.3.1. Determinació de la recta patró per a la PCR en temps real de *B. adolescentis* i *B. dentium*

Es va crear una recta patró d'ADN amb valors coneguts mitjançant un conjunt de dilucions seriades dels cultius de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* incubats a 37°C durant 48 hores en el medi RCM en condicions d'anaerobiosi. Es va realitzar un recompte en el medi CBA d'aquests creixements. D'aquesta manera es va poder quantificar l'ADN de les mostres. El desenvolupament de la reacció de la PCR es va realitzar en un primer pas en un termociclador tèrmic Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn). Es van determinar els temps de desnaturalització de l'ADN, el temps d'hibridació i el temps d'elongació de la reacció. El programa final de la reacció de PCR quantitativa es detalla a la Figura 4.2.

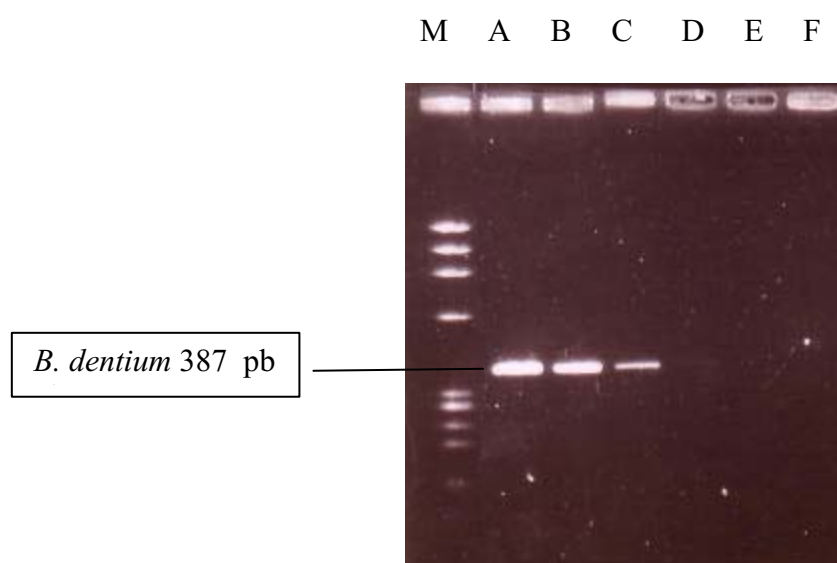
Figura 4.2. Programa de la PCR quantitativa en temps real per a la quantificació de *B. adolescentis* i *B. dentium*.



El resultat de la PCR es va visualitzar en un gel d'agarosa al 2 % seguint el protocol descrit en l'Annex II.

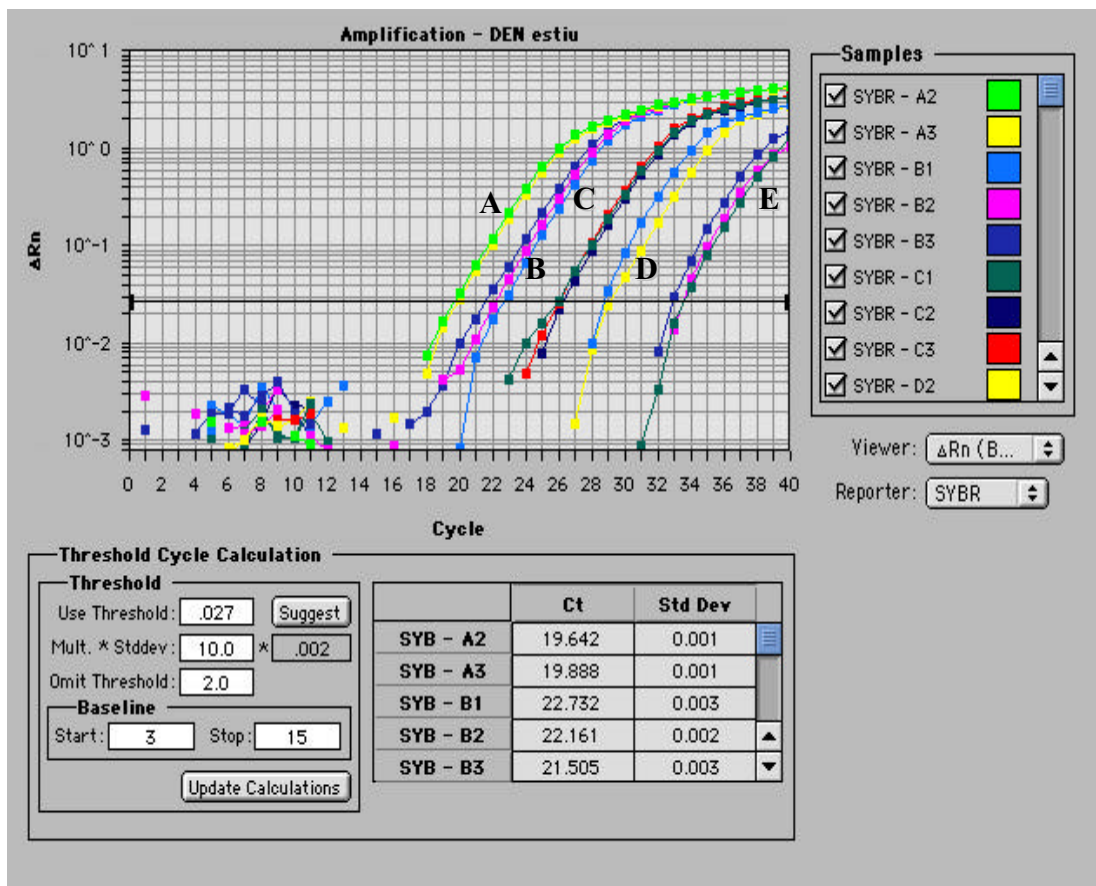
En la Figura 4.3 es mostren els productes amplificats de la PCR específica de *B. dentium* obtinguts de les dilucions seriades del cultiu d'aquesta espècie incubat a 37°C en condicions anaeròbies durant 48. Atinent al nombre d'UFC quantificats pel cultiu en el medi CBA que disposàvem en cada dilució, la concentració del cultiu va ser de l'ordre de set unitats logarítmiques. Es va determinar el límit de detecció de la PCR que va ser de 10³ UFC/ mL.

Figura 4.3. Els patrons de l'electroforesi en gel d'agarosa de la PCR específica per *B. dentium* DSM 20084^T obtinguts de les diferents dilucions seriades per a determinar la sensibilitat. **M:** marcador d'ADN lambda (Annex II), **A:** 10⁵ UFC/mL, **B:** 10⁴ UFC/mL, **C:** 10³ UFC/mL, **D:** 10² UFC/mL, **E:** 10¹ UFC/mL, **F:** control negatiu



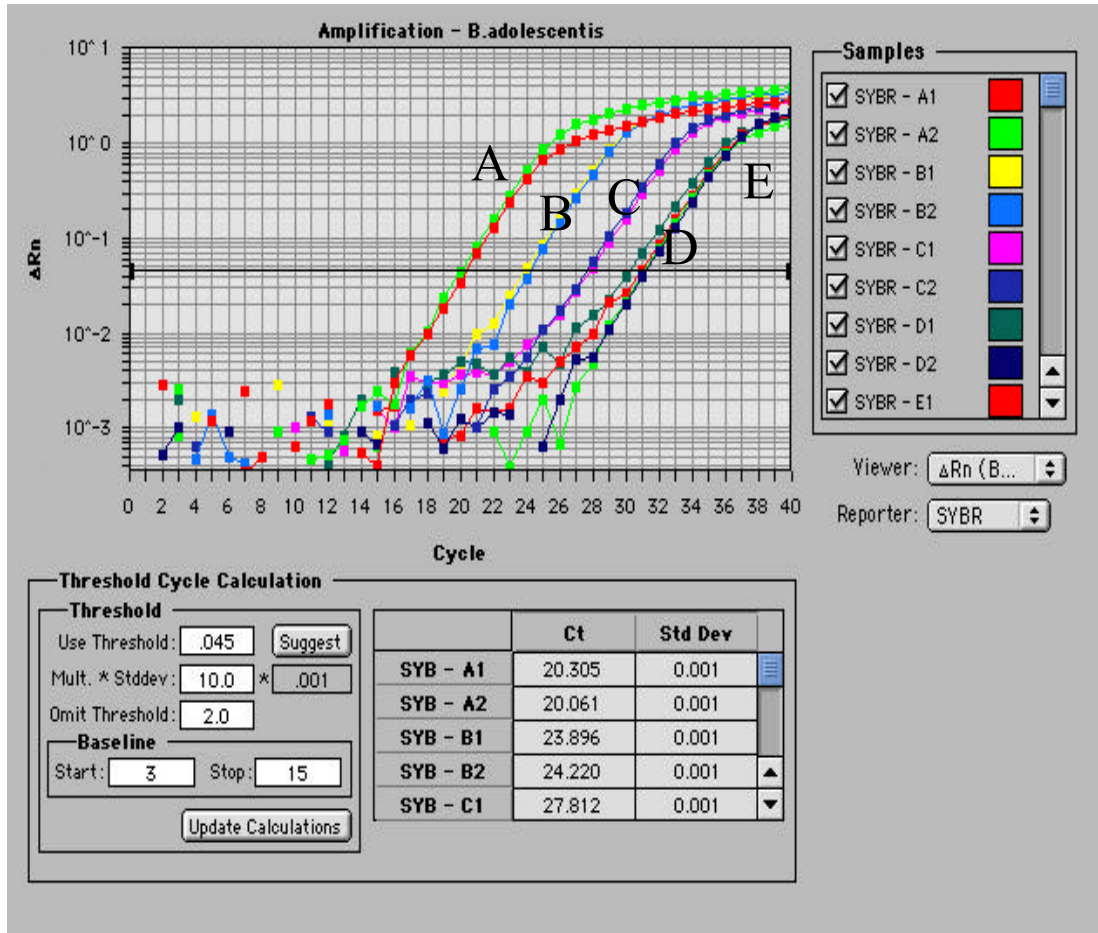
L'espècie *B. adolescentis* va presentar el mateix llindar de detecció de la PCR aniuada. Una vegada desenvolupada la PCR per a *B. adolescentis* i *B. dentium* i visualitzats els productes de l'amplificació en els gels d'agarosa, les extraccions de les diferents dilucions seriades es van amplificar a l'aparell ABI Prism ® 7700 per a realitzar la PCR quantitativa. Per cada una de les mostres es van efectuar tres rèpliques per així precisar més el resultat de la quantificació mitjançant la PCR quantitativa. En el cas de que en alguna de les reaccions de la PCR no es produís amplificació, es descartava aquell anàlisi i l'enumeració de l'ADN es realitzava amb els altres dos valors obtinguts de les rèpliques. L'anàlisi d'aquesta amplificació es va realitzar amb els registres d'emissió de fluorescència al llarg de la reacció de la PCR. El programa informàtic S.D.S representava en una gràfica els increments de fluorescència en cada un dels tubs al llarg dels diferents cicles de la PCR de la recta patró de *B. dentium* (Figura 4.4) i de *B. adolescentis* (Figura 4.5)

Figura 4.4. Mostra de la PCR quantitativa de les corbes patró de *B. dentium*. La quantitat d'emissió de fluorescència es va incrementant a mesura que el SYBR Green es va intercalant entre les dobles cadenes d'ADN que es van sintetitzant. Cada una de les corbes correspon a l'increment de fluorescència contínua d'una reacció de PCR. Les mostres de A-E corresponen a les dilucions seriades de la recta patró de *B. dentium* (A: 3×10^5 , B: 3×10^4 , C: 3×10^3 , D: 3×10^2 , E: 3×10^1 UFC/ mL).



En els primers cicles no es va apreciar quasi increment en l'emissió de fluorescència. Els valors de fluorescència emesa entre els cicles 3 i 15 es van utilitzar per establir el senyal de fons ("background"). Es va utilitzar la senyal mitjana del "background" de tots els tubs més 10 vegades la desviació estàndard per establir l'emissió de fluorescència basal ("threshold"). El cicle en el qual es supera aquesta fluorescència basal és la Ct. Aquesta Ct sempre es troba en la fase exponencial de la corba d'amplificació.

Figura 4.5. Mostra de la PCR quantitativa de les corbes patró de *B. adolescentis*. La quantitat d'emissió de fluorescència es va incrementant a mesura que el SYBR Green es va intercalant entre les dobles cadenes d'ADN que es van sintetitzant. Cada una de les corbes correspon a l'increment de fluorescència contínua d'una reacció de PCR. Les mostres de A-E corresponen a les dilucions seriades de la recta patró de *B. adolescentis* (A: 3×10^5 , B: 3×10^4 , C: 3×10^3 , D: 3×10^2 , E: 3×10^1 UFC/ mL).



Els valors de Ct de cada una de les mostres de la PCR quantitativa es van interpolar en un recta patró construïda a partir de les extraccions de l'ADN de cada una de les dues espècies del seu corresponent banc de dilucions realitzat anteriorment. En la Figura 4.6 s'observa la recta patró d'una PCR quantitativa en temps real amb iniciadors específics de *B. dentium*. Els punts negres corresponen a la recta patró i els punts en vermell són les mostres amplificades que es volen quantificar. En la Figura 4.7 s'observa una altra recta patró de la PCR quantitativa, però en aquest cas amb els iniciadors específics de *B. adolescentis*. La quantitat d'ADN d'aquestes dilucions es va determinar a partir del recompte en placa en el medi CBA. Per a cada una de les PCR quantitatives es va realitzar sempre aquesta recta patró per quantificar l'ADN.

Figura 4.6. Recta patró utilitzada per interpolat la concentració d'ADN inicial a partir del valor Ct. En l'eix de les ordenades es mostra el valor Ct de cada una de les reaccions de la PCR i en l'abscissa l'emissió de fluorescència de cada una de les reaccions. Les mostres de A-E corresponen a les dilucions seriades de la recta patró de *B. dentium* (A: 3×10^5 , B: 3×10^4 , C: 3×10^3 , D: 3×10^2 , E: 3×10^1 UFC/mL). El programa informàtic també va mostrar les anàlisis de regressió mostrant el coeficient de correlació, la pendent de la recta i el valor de tall en el eix de les ordenades.

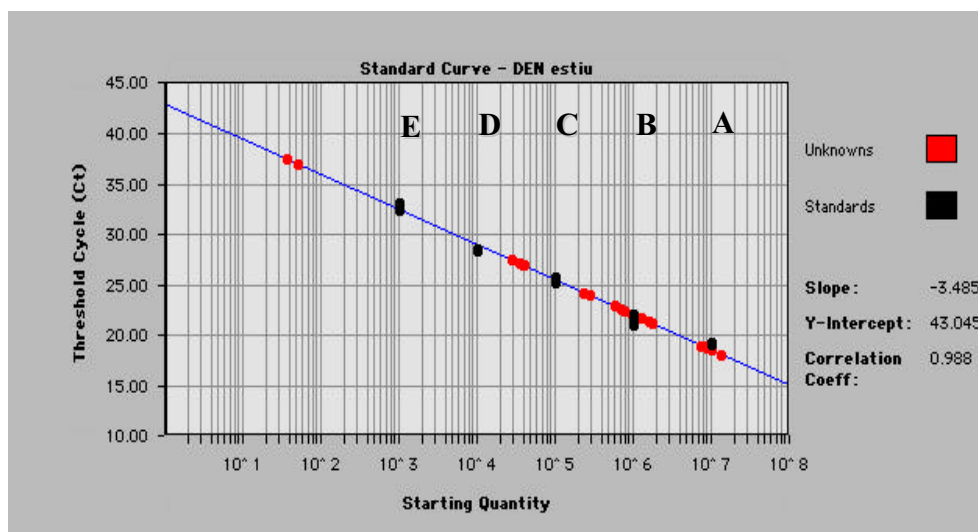
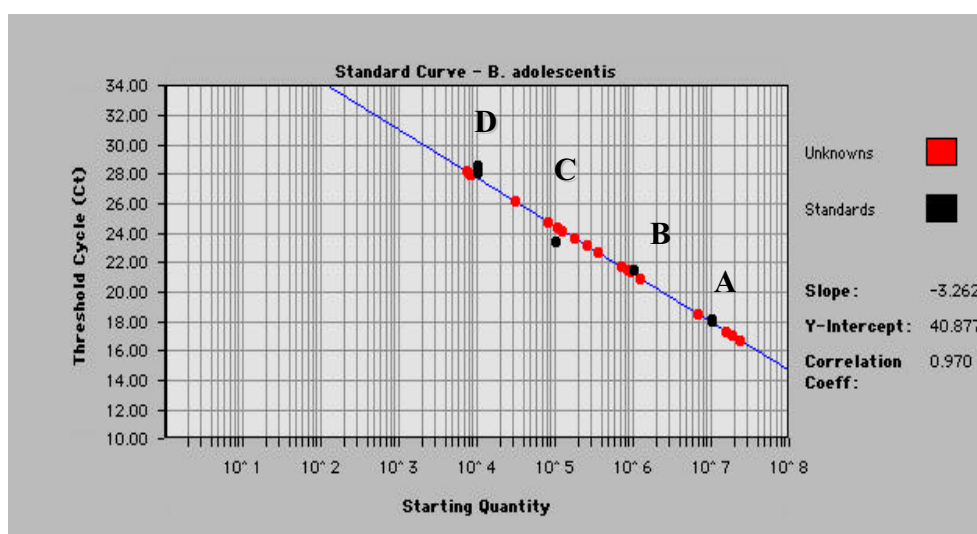


Figura 4.7. Recta patró utilitzada per interpolat la concentració d'ADN inicial a partir del valor Ct. En l'eix de les ordenades es mostren el valor Ct de cada una de les reaccions de la PCR i en l'abscissa l'emissió de fluorescència de cada una de les reaccions. Les mostres de A-E corresponen a les dilucions seriades de la recta patró de *B. adolescentis* (A: 3×10^5 , B: 3×10^4 , C: 3×10^3 , D: 3×10^2 UFC/mL).



Una pendent de la recta patró propera a -3.2 ens indica que l'eficiència de la PCR ha estat del 100%. Aquest paràmetre ens indica que cada 3.2 cicles hi ha una reducció d'una unitat de logarítmica d'ADN segons les indicacions del fabricant.

Com s'ha comentat anteriorment en la introducció, el marcador utilitzat en la quantificació d'ADN en les mostres ambientals va ser el *SYBR Green*, aquest s'intercala en totes les dobles cadenes d'ADN de qualsevol amplímer de la reacció de la PCR sense cap tipus de discriminació. Per aquest motiu, al finalitzar la quantificació de l'ADN mitjançant la PCR quantitativa es van realitzar les corbes de dissociació per a la detecció de les possibles reaccions inespecífiques en cada una de les reaccions.

En les corbes de dissociació es produeix una desnaturalització total de l'amplímer generat en cada reacció de la PCR. Posteriorment, es produeix un descens de la temperatura a 60°C per tal que tot l'ADN es torni a renaturalitzar, finalment es torna a produir un procés de desnaturalització lent durant 20 min fins a una temperatura de 94°C on es va detectant l'emissió de fluorescència per la separació de les dues cadenes d'ADN del fragment amplificat en la reacció. A mesura que les dues cadenes d'ADN es van separant s'allibera el fluoròfor *SBYR Green* que emet fluorescència (Figura 4.8).

La diferència de T_m de cada un dels amplímer originats genera una corba de dissociació diferent. Si en l'amplificació d'ADN s'han format dos amplímers diferents, en aquest procés lent de desnaturalització de l'ADN es detectaran els dos amplímers ja que aquests posseiran T_m diferents. La T_m dels amplímers que amplifiquem són altes perquè la longitud d'amplímer està al voltant de les 300 pb i 400 pb en *B. adolescentis* i *B. dentium*. En canvi, quan es produeixen dímers, es poden detectar perquè la T_m d'aquests amplímers és molt més baixa. Això té lloc quan la concentració d'ADN en la mostra és molt baixa, en conseqüència es produeix una sobreestimació en la quantificació d'ADN ja que es produeix una sobreestimació del resultat. En el cas d'una contaminació de la mostra, el producte d'ADN amplificat procedent de la contaminació té una T_m diferent de l'amplímer que nosaltres volem amplificar, sent detectat en les corbes de dissociació (Figura 4.9). Per aquesta raó és imprescindible la realització de les corbes de dissociació després de cada una de les reaccions de les PCR quantitatives en temps real amb la utilització del marcador *SYBR Green*.

Figura 4.8. Corbes de dissociació resultant de cada un dels amplimers generats en cada una de les reaccions de la PCR quantitativa en temps real amb el marcador *SYBR Green*. En l'eix de les ordenades es mostra l'augment de la fluorescència i en l'eix de les abscisses la T_m dels amplimers de la PCR quantitativa en temps real.

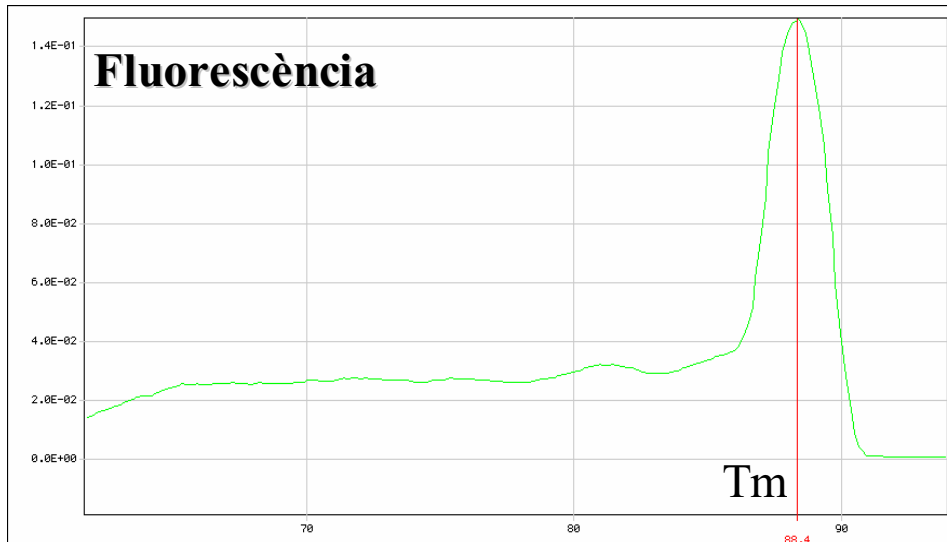
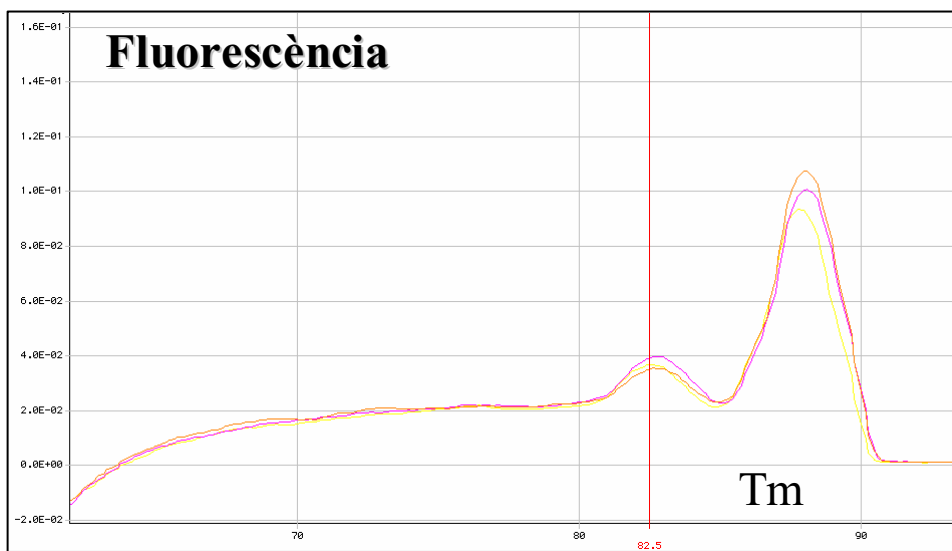


Figura 4.9. Corbes de dissociació resultant de cada un dels amplimers generats en cada una de les reaccions de la PCR quantitativa en temps real amb el marcador *SYBR Green*. Cada corba correspon a una sola reacció de PCR. En aquesta gràfica es detecta una contaminació creuada ja que es detecten dos T_m diferents corresponents a dos amplimers diferents produïts en la reacció.



4.3.2. Enumeració de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* per la tècnica de PCR en temps real en aigües residuals d'origen humà

L'enumeració de *B. adolescentis* i *B. dentium* mitjançant la PCR quantitativa en temps real en les mostres d'aigües residuals d'origen humà es mostra a la Taula 4.3. En aquesta mateixa taula es mostra la detecció de les dues espècies per la tècnica de la PCR múltiple ADO-DEN realitzat en el capítol 3 corresponents a les mateixes mostres. En aquest cas la PCR quantitativa es va realitzar a partir de les extraccions d'ADN conservades a -20°C analitzades en el capítol 3.

Taula 4.3. Resultats de la PCR quantitativa per les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* en mostres d'aigües residuals d'origen humà. També s'indiquen la detecció d'aquestes espècies per la tècnica de la PCR múltiple ADO-DEN. **N:** nombre de mostres. **PCR múltiple:** nombre de mostres que presenten una amplificació positiva pel mètode respecte les mostres totals analitzades. **PCR quantitativa:** nombre de mostres que presenten una quantificació positiva pel mètode respecte les mostres totals analitzades. Nombre de cèl·lules en unitats logarítmiques per 100mL.

	N	ADO			DEN		
		PCR múltiple	PCR quantitativa		PCR múltiple	PCR quantitativa	
			Mostres quantificades	u log cèl·lules/100mL		Mostres quantificades	u log cèl·lules/100mL
EDAR 1	6	6/6	6/6	5,04 (±0,97)	4/6	0/6	<4
EDAR 2	12	12/12	10/12	3,98-4,76* (±2,28; ±0,74)	10/12	6/12	3,05-4,34* (±2,28; ±0,45)
EDAR 3	2	2/2	2/2	4,45 (±0,35)	½	1/2	2,09-4,10* (±2,97; ±0,10)
EDAR 4	2	2/2	2/2	5,28 (±0,11)	2/2	0/2	<4

* Es mostren els intervals de confiança de totes les mostres analitzades. S'han realitzat aquests intervals per què algunes de les mostres no han pogut ser enumerades per què es trobaven per sota del llindar de detecció de la PCR quantitativa en temps real.

En la taula 4.3 s'observen les diferents enumeracions de les espècies *B. adolescentis* i de *B. dentium* en les diferents EDARs mitjançant la tècnica de la PCR quantitativa en temps real. L'EDAR que va presentar una enumeració més alta de *B. adolescentis* va ser l'estació número 4 amb un valor de 5,28 ulog cèl·lules/100mL. En canvi, l'EDAR 2 va presentar les enumeracions més baixes amb un interval de confiança de 3,98-4,76 ulog cèl·lules/100mL. Aquest resultat és degut a que en dues mostres de l'EDAR no es va poder quantificar la mostra perquè el llindar de detecció va ser superior a la quantitat d'ADN present en les dues mostres. Per tant es van calcular els diferents intervals en què podem afirmar amb seguretat la concentració de *B. adolescentis* en l'EDAR 2. L'EDAR 1 i 3 van presentar unes enumeracions intermitges de 5,04 i 4,45 ulog cèl·lules/100mL.

De les 22 mostres d'aigües residuals d'origen humà en què es va detectar la presència de *B. adolescentis* mitjançant la tècnica de la PCR múltiple ADO-DEN, només en dues mostres, les comentades anteriorment, no es va poder realitzar l'enumeració amb la tècnica de la PCR quantitativa en temps real d'aquesta espècie en aigües residuals d'origen humà.

L'EDAR 2 va presentar les enumeracions més altes de *B. dentium* amb un interval de confiança de 3,05-4,34 ulog cèl·lules/100mL. En aquest cas es van poder quantificar 6 de les 12 mostres d'aquesta EDAR. L'altra EDAR en què es va poder quantificar aquesta espècie va ser l'EDAR 3 on la concentració va ser de 2,09-4,10 ulog cèl·lules/100mL. No obstant, es va detectar amplificació en una de les dues mostres. En les dues EDARs restants no es poder quantificar cap mostra, la concentració de *B. dentium* estava per sota del límit de detecció de la tècnica. En aquests casos la concentració d'aquesta espècie està per sota de 4 ulog cèl·lules/100mL.

De les 17 mostres en què es va detectar *B. dentium* mitjançant la PCR múltiple ADO-DEN es van poder quantificar 7 mostres amb la tècnica de la PCR quantitativa en temps real, de les quals 6 provenien de la mateixa EDAR, la 2.

4.4. Discussió

L'enumeració de les poblacions bacterianes utilitzant la tècnica de la PCR quantitativa en temps real ha experimentat una gran acceptació en aquests últims anys en els diferents àmbits de la microbiologia, com s'ha comentat en la introducció del capítol.

Per tal de discernir la capacitat d'enumeració de la PCR quantitativa en temps real s'ha comparat aquesta tècnica amb altres metodologies moleculars i tradicionals, com els medis de cultiu. Entre les tècniques moleculars s'ha comparat amb la tècnica FISH. Com s'ha comentat en la introducció del capítol, els valors obtinguts mitjançant les dues tècniques són molt similars exceptuant el cas en què les concentracions de *Bifidobacterium* eren molt baixes, on es produïa una sobreestimació en el recompte amb la tècnica FISH (Gueimonde *et al.* 2004). Una altra tècnica molecular en què s'ha comparat la PCR en temps real és el recompte amb DAPI, les enumeracions de soques tipus de *Bifidobacterium* van presentar resultats molt similars amb les dues tècniques (Matsuki *et al.* 2004). També s'ha comparat aquesta tècnica amb un PCR aniuada convencional en la realització de recomptes de certes espècies de *Bifidobacterium* en la preparació probiòtica VSL-3, donant resultats molt similars, però amb una sensibilitat superior i amb unes mitjanes d'interval d'error molt menors per part de la PCR en temps real (Vitali *et al.* 2003). La tècnica de l'ELISA també s'ha avaluat amb la PCR quantitativa, mostrant la mateixa sensibilitat alhora de detectar *Salmonella* en mostres d'aliments i ambientals (Uyttendaele *et al.* 2003).

Per a l'enumeració de *Giardia lamblia* es van comparar les tècniques IFA i PCR quantitativa en temps real, obtenint resultats molt similars en la detecció d'aquest protozou (Bertrand *et al.* 2004). Finalment també s'han relacionat les enumeracions en PCR en temps real amb el recompte d'unitats infectives d'enterovirus en aigües superficials, corresponent a 55 còpies virals detectades per PCR en temps real per produir una infecció per aquest virus (Donaldson *et al.* 2002).

La majoria dels treballs citats anteriorment també van realitzar un seguiment de les enumeracions dels diferents anàlisis amb medis de cultiu. En tots el casos quan es va realitzar un recompte de les soques tipus en els medis selectius respectius o en medis rics i es va comparar el recompte amb la PCR quantitativa en temps real, els resultats van ser molt similars en la majoria dels treballs. Ara bé, quan es realitzen aquests recomptes en les mostres a analitzar, tant en teixits, sòls, rius, aigües residuals, etc. aquesta similitud desapareix. El recompte en medis selectius va disminuir en tots el casos, en els casos més extrems els recomptes en medis van ser inferiors en tres unitats logarítmiques, tal i com es descriu en el treball de quantificació de les bacteries adherents a la mucosa gastrointestinal, en totes les mostres analitzades es va observar aquesta disminució en el recompte de les diferents espècies (Huijsdens *et al.* 2002).

Aquest fet no és d'estranyar, ja que les bacteries quan estan en el medi ambient, en qualsevol habitat, les condicions físico-químiques no són les òptimes de creixement en la major part dels casos, hi ha processos de competència pels nutrients per part de les diferents poblacions bacterianes, hi ha processos de depredació per part dels protozous, i en conseqüència una part de la població analitzada no pot créixer en el medi utilitzat per les condicions d'estrès del medi ambient on viuen.

En aquest capítol no s'ha analitzat aquesta diferència en les enumeracions entre les dues tècniques (el cultiu en medi selectiu i la enumeració per PCR quantitativa en temps real) ja que aquest anàlisi s'ha realitzat en l'últim capítol de la tesi. En l'últim capítol d'aquesta memòria s'ha realitzat l'estudi comparatiu de les dues tècniques, amb el medi selectiu Beerens i la PCR quantitativa en temps real per a les dues espècies de *Bifidobacterium* analitzades al llarg de la tesi. En aquest capítol s'ha desenvolupat la tècnica de la PCR quantitativa en temps real per a la quantificació de les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* en aigües residuals d'origen humà.

Aquesta tècnica molecular també s'ha utilitzat per a l'enumeració del gènere *Bifidobacterium* en femtes i productes probiòtics (Gueimonde *et al.* 2004; Matsuki *et al.* 2004; Vitali *et al.* 2003). Hi ha alguns anàlisis en aigües en què s'utilitza aquesta tècnica molecular com l'enumeració de l'espècie *Enterococcus faecalis* per PCR en temps real (Domingo *et al.* 2003), l'enumeració de *Giardia lamblia* en aigües residuals (Bertrand

et al. 2004) o l'enumeració de *Vibrio vulnificus* en aigua de mar (Panicker *et al.* 2004). Ara bé, encara no s'ha descrit cap treball a nivell d'anàlisi d'aigües pel gènere de *Bifidobacterium*. Per aquest motiu es va desenvolupar la PCR quantitativa en temps real per a les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* que en el capítol 3 es van proposar com unes molt bones candidates per a ser uns indicadors de contaminació fecal en aigües.

El desenvolupament de la tècnica molecular de la PCR quantitativa en temps real per a l'enumeració de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* en aigües residuals va ser satisfactòria. Aquest mètode molecular desenvolupat no requereix de l'aïllament ni del cultiu de cap d'aquestes dues espècies com s'ha anat comentat al llarg del capítol. Aquests fet és molt important per què la quantificació de *Bifidobacterium* spp. en mostres ambientals és molt complicada utilitzant medis selectius. El nou mètode presenta un llindar de detecció de 10^2 cèl·lules/mL. Aquests llindar es va determinar mitjançant la realització d'un banc de dilucions seriades amb dos cultius purs crescuts a 48 h de les dues espècies.

Aquest llindar de detecció és diferent a altres estudis que quantifiquen *Bifidobacterium* spp. en mostres fecals on el llindar és de 10^6 cèl·lules/g de femtes (Matsuki *et al.* 2004) o de 10^4 cèl·lules/g en altres estudis d'enumeracions de *Bifidobacterium* en femtes (Gueimonde *et al.* 2004). En canvi, altres treballs que van estudiar teixits de la mucosa gastrointestinal van mostrar una gran sensibilitat del mètode detectant 1 UFC d' *E. coli* i 9 UFC de *Bacteroides vulgatus* per reacció de PCR (Huijsdens *et al.* 2002). Altres estudis presenten també un llindar molt baix de detecció, 5×10^1 - 5×10^2 per reacció en la detecció de *Salmonella* en aliments (Uyttendaele *et al.* 2003) o de 10^2 cèl·lules/g per a la detecció de *V. vulnificus* (Panicker *et al.* 2004).

D'altres estudis no descriuen els llindars de detecció per a les enumeracions de *Bifidobacterium* en productes làctics, on normalment les poblacions bacterianes es troben en proporcions molt elevades i hi ha poques espècies que puguin interferir en els anàlisis i no es presenten problemes alhora de realitzar les enumeracions amb aquesta tècnica (Vitali *et al.* 2003).

Es van poder quantificar la majoria de les mostres d'aigües residuals d'origen humà per a l'espècie de *B. adolescentis* (Taula 4.3), només en dues mostres de l'EDAR 2 no es va poder quantificar ja que la concentració d'aquesta espècie va estar per sota del llindar de detecció de la PCR quantitativa en temps real. Aquesta tècnica és eficaç per a la detecció de *B. adolescentis* en aigües residuals, presenta un límit de detecció de 10^4 CFU/mL. Ara bé, en la majoria de mostres d'aigües residuals d'origen humà analitzades, els valors obtinguts són de 4 a 5 unitats logarítmiques per 100mL, si tenim en compte que el llindar de detecció de la tècnica està a 4 unitats logarítmiques per 100 mL, observem que estem analitzant mostres on estem molt a prop del límit de detecció, amb la problemàtica que això comporta. Com ja s'ha comentat, dues mostres no van ser quantificades per aquest motiu. Per tant, si anem a utilitzar aquesta eina per a detectar aquesta espècie en aigües superficials no podrem quantificar les bacteries perquè el límit de detecció serà més alt. Aquest fet s'ha descrit en altres treballs relacionats, en estudis d'espècies concretes en aigües superficials com en *Ent. faecalis* que no s'ha pogut detectar en aigües superficials (Domingo *et al.* 2003). Altres autors han dissenyat medis d'enriquiment per augmentar la població de l'espècie estudiada per poder superar el límit de detecció i poder enumerar les diferents espècies com en el cas de *V. vulnificus* (Panicker *et al.* 2004) o en les enumeracions d'*E. coli* O157 en mostres ambientals (Ibekwe i Grieve 2002).

La quantificació de l'espècie de *B. dentium* va ser més problemàtica. La sensibilitat de la tècnica de la PCR quantitativa en temps real va ser crítica per aquesta espècie. La presència d'aquesta espècie en aigües no es tan elevada com *B. adolescentis*. Aquest fet ja es va detectar amb la tècnica de la PCR múltiple ADO-DEN descrita en el capítol 3. El nombre de mostres positives de *B. dentium* amb la PCR múltiple ADO-DEN va ser de 17 mostres, que comparades amb les 22 mostres positives per *B. adolescentis* ens indica que la seva presència al medi ambient és més baixa. Per aquest motiu és d'esperar que el nombre de quantificacions de mostres de *B. dentium* fos menor que no pas les enumeracions de *B. adolescentis*.

Capítol 5

Inactivació natural “in situ” de diferents poblacions bacterianes en aigua de riu: avaluació mitjançant diferents tècniques metodològiques



5.1. Introducció

Al llarg de la memòria s'han anat descrivint diferents metodologies per a la detecció de diferents poblacions de *Bifidobacterium*. Aquestes poblacions s'han proposat com a microorganismes indicadors de l'origen de la contaminació fecal en aigües. En la primera part de la memòria es va avaluar la detecció de *Bifidobacterium* en diferents medis selectius en aigües residuals, posteriorment es va realitzar la detecció molecular de diferents espècies d'aquests gènere descrites com a exclusives d'origen humà en aigües residuals. Posteriorment, es va realitzar un estudi més exhaustiu de les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* ja que aquestes es van detectar exclusivament en aigües d'origen humà i no en aigües d'origen animal. Per aquest motiu es va desenvolupar una PCR múltiple ADO-DEN per a la detecció simultània de les dues espècies en mostres d'aigües. Finalment, en el capítol 4 es va desenvolupar una PCR quantitativa en temps real per a les enumeracions d'aquestes dues espècies en aigües residuals d'origen humà.

En aquest capítol final es vol valorar el comportament del gènere *Bifidobacterium* i de les dues espècies citades anteriorment de bifidobactèries, "in situ" en aigua de riu, simulant al màxim les condicions ambientals per tal de comprendre el comportament d'aquests microorganismes en un ecosistema natural, com és l'aigua de riu, amb totes les tècniques desenvolupades al llarg de la memòria.

Un factor important en els medis aquàtics és el flux de materials, ja siguin en forma de gas, sòlids o en dissolució, que provoquen canvis en les seves concentracions. Aquests canvis són característics dels medis aquàtics i els microorganismes han de ser capaços de respondre ràpidament a aquests canvis.

La barreja i el flux dels nutrients, l'oxigen i els productes residuals que es produeixen en els medis d'aigua dolça i marina són els factors dominants que controlen les diferents comunitats microbianes. La inactivació dels microorganismes i dels patògens en ambients naturals és un producte de l'acció dels fenòmens naturals, que són molt variats, els quals es diferencien en tres grups: químics, físics i biològics. No

obstant, és difícil de classificar la influència de cada un d'ells en ambients tan complexes com els aquàtics, de manera que encara que s'estudiïn de forma separada, la seva acció en la natura és simultània. A continuació s'explicaran a grans trets els diferents fenòmens d'inactivació natural microbiana per cada un dels diferents factors.

5.1.1. Factors físics d'inactivació

Temperatura

La temperatura és un dels factors més inactivadors de les bactèries i virus en les mostres d'aigües ambientals. Existeixen varis estudis en què es descriu aquest efecte sobre les diferents poblacions bacterianes. La majoria d'aquests estudis d'inactivació en aigües es realitzen sense llum per poder determinar l'efecte exclusiu de la temperatura. Per exemple, hi ha treballs realitzats en cambres fosques, dipositades al mar on es van calcular les inactivacions de coliformes fecals i enterococs tant a l'estiu com a l'hivern amb inoculació d'aigua residual en aquestes cambres. La T_{90} (temps necessari per inactivar el 90% d'una població bacteriana) dels coliformes fecals a l'hivern va ser de 115 h i a l'estiu de 82,3 h i les T_{90} dels enterococs van ser de 461 h i 288 h a l'hivern i a l'estiu respectivament. Es va detectar una clara disminució de la T_{90} a l'estiu on la temperatura de l'aigua va ser molt més elevada (Sinton *et al.* 1994). Altres treballs també van detectar aquesta reducció de la T_{90} a temperatures altes, com l'estudi de l'aigua de mar a les fosques realitzat per Yukelsen i col·laboradors que van determinar una T_{90} dels coliformes fecals de 34,8 h a una temperatura de 9,5°C i una T_{90} de 17,4 h a una temperatura de 25,5°C (Yukselen *et al.* 2002). Altres estudis comparen la T_{90} dels coliformes fecals i dels fags, també troben diferències significatives entre temperatures diferents, en anàlisis a les fosques en aigües de mar. Les T_{90} obtingudes pels fags somàtics, els fags F-ARN específics i pels coliformes fecals respectivament van ser de 52h, 52 h, 49 h a l'estiu. En canvi, a l'hivern van ser de 102 h, 156 h, 63 h respectivament pels tres microorganismes estudiats (Sinton *et al.* 1999).

Aquesta reducció de la supervivència a temperatures altes també es detecta en la inactivació dels diferents tipus de fags ARN específics en aigües, on s'observa una reducció de fins a 4 unitats logarítmiques en temperatures de 30°C respecte temperatures de 4°C (Schaper *et al.* 2002). Un cas extrem és el tractament tèrmic d'aigües residuals a 60°C on aquesta reducció arriba a 6; 3,4; 0,8; 2,1 unitats logarítmiques en coliformes fecals, enterococs, colifags somàtics i fags F-ARN específics (Mocé-Llivina *et al.* 2002).

Radiació solar

La radiació solar és un dels factors naturals més importants antimicrobians juntament amb la temperatura que influeix tant en el la microbiota fecal com en la microbiota natural de les aigües superficials. Produeix una taxa d'inactivació de 2 o més unitats logarítmiques dels diferents microorganismes en l'aigua respecte al mateix experiment realitzat a la foscor. La seva acció varia en funció del temps, des de minuts fins a canvis estacionals, sense deixar de banda els cicles diaris.

L'espectre de radiació solar presenta diferents longituds d'ona, des dels 290-320 nm dels raigs UV-B, seguits dels raigs UV-A que s'ubiquen en un rang de 320-400 nm fins a arribar a la llum visible que està entre el rang 400-500 nm, i acabant als raigs infrarojos. Tots aquests raigs arriben a la superfície de la Terra i provoquen diferents alteracions als microorganismes.

Els processos d'inactivació produïts per la radiació solar en les bactèries en aigües naturals són molt complexes. No obstant hi ha dues vies diferenciades en aquests processos. Un procés fotobiològic en què es produeix una alteració de l'ADN i un procés de fotooxidació on es produeix una oxidació dels components cel·lulars de les bactèries (Whitman *et al.* 2004). Hi ha diversos estudis que demostren que l'oxigen i la matèria orgànica (lignines, àcids húmics o àcid fúlvic) poden accelerar aquest procés de fotooxidació (Reed i Meyer 2000) produint agents letals com el radicals d'oxigen i els peròxids d'hidrogen. Per aquesta raó els microorganismes productors de catalasa poden ser més resistents a la llum.

La porció d'espectre de la llum solar UV-B és la causant directa de l'acció fotobiològica de les bactèries degradant l'ADN. En canvi, a longituds d'ona més grans de 329 nm els processos de fotooxidació són més importants, que són causats pels raigs UV-A.

Encara que alguns processos fotobiològics són letals (Jagger 1995), algunes bactèries (entre elles *E. coli*) poden utilitzar una combinació de processos complexes de reparació, fotorecativació, i reparació postreplicativa (resposta SOS) per reparar l'ADN. Encara que les longituds d'ona de l'UV-A sembla ser que inhibeixen alguns d'aquests processos (Eisenstark 1989). Aquest fet s'observa en varis estudis, entre ells l'estudi de les inactivacions naturals aigües residuals i aigües de riu sotmeses a les mateixes condicions de radiació solar (Sinton *et al.* 2002). En aquest estudi es va observar una T_{90} més baixa tant en els coliformes fecals com dels fags somàtics en les aigües residuals que no pas en l'aigua de riu. Els diferents processos d'inactivació fotobiològics es poden anar reparant amb els mecanismes abans descrits. En canvi, en l'aigua residual la longitud d'ona que més afecta és l'UV-A que juntament amb la gran contribució de matèria orgànica, incrementa els processos de fotooxidació que són més letals perquè inhibeixen els processos de reparació (Sinton *et al.* 2002).

Altres estudis indiquen que la contribució a l'inactivació natural és exclusiva de la insolació. Van observar que les diferents inactivacions bacterianes eren independents a la temperatura. Es va observar la mateixa inactivació solar en el rang de 9°C a 26°C (Yukselen *et al.* 2002).

Adsorció a sòlids suspesos

En la natura, la població bacteriana lliure en l'aigua representa una proporció molt petita de la població total (0,02-0,045 %) (Leclerc *et al.* 1996). La major part de les bactèries es troben formant agregats, sobre partícules en suspensió inerts (minerals o orgàniques), vives (algues), fixades en la matèria grossa de l'aigua (troncs, rames d'arbres submergits, pedres, etc.) o en el sediment de l'ecosistema. D'aquesta manera, les poblacions bacterianes optimitzen l'energia alhora d'aconseguir l'aliment, poden realitzar un metabolisme més actiu, intercanviar aliments, factors de creixement i fins i

tot plàsmids entre les diferents poblacions (Dudman 1997; Freter 1984). D'aquesta manera els fenòmens d'agregació incrementen la supervivència bacteriana i viral en el medi ambient.

L'associació de partícules víriques a sòlids suspesos és de màxima importància en l'ecologia viral. Els virus estan carregats negativament amb una gran tendència a l'adsorció en qualsevol superfície. Aquesta adsorció viral a partícules es produeix en el tracte intestinal de les femtes, i en altres sòlids transportats per l'aigua. Aquests fenomen en l'aigua residual també es manté. S'ha comprovat que les aigües residuals, la major part dels virus es troben adsorbits o barrejats amb la matèria particulada (Berg 1983; Wellings *et al.* 1976).

5.1.2. Factors químics d'inactivació

Entre els factors químics que afecten a la inactivació de les bactèries destaquen l'oxigen dissolt, el potencial redox, el pH, les sals i els agents oxidats utilitzats en la desinfecció de l'aigua com el clor, l'ozó i l'UV entre d'altres.

Oxigen dissolt en l'aigua (DO)

L'oxigen es troba dissolt en l'aigua de riu. El peròxid d'hidrogen, els radicals de superòxids i els radicals hidroxil són derivats de l'oxigen que són altament reactius que tenen un marcat efecte bactericida (Carlsson *et al.* 1978). Reaccionen amb les molècules intracel·lulars crítiques per a la supervivència de les bactèries (Mendonca i Knabel 1994). En aquests casos normalment es produeix la fotooxidació de la molècula (McFeters 1989).

En una solució aquosa els radicals superòxids són moderadament actius. Però la seva elevada toxicitat és deguda a què reacciona amb els peròxids d'hidrogen donant lloc als radicals hidroxils, que és la forma més activa dels derivats de l'oxigen. Els radicals hidroxils poden oxidar instantàniament les proteïnes, els àcids nucleics i els lípids. El peròxid d'hidrogen és més reactiu que el radical superòxid i es difon

ràpidament a través de les membranes cel·lulars. Té com a dianes potencials les membranes cel·lulars, enzims, àcid nucleics i els processos de transport de membrana (Atlas i Bartha 2002; Stephens *et al.* 2000).

Les bactèries aeròbiques o anaeròbics facultatives l'efecte dels derivats de l'oxigen es contrastat pels enzims bacterians com la catalasa i la superòxid dismutasa. Les bactèries pertanyents al gènere *Bifidobacterium* no posseeixen l'enzim de la catalasa, únicament les espècies *B. indicum* i *B. asteroides* són catalasa positives quan creixen en condicions aeròbiques, tant en presència com en absència d'hemina en el medi (Scardovi 1986). D'aquesta manera s'entén la poca supervivència de les espècies anaeròbics en aigües on hi ha presència d'oxigen.

Potencial redox

Moltes reaccions enzimàtiques són reaccions d'oxidació-reducció en les que un compost es oxidat i l'altre reduït. La capacitat d'un microorganisme per a realitzar aquestes reaccions depèn de l'estat d'oxidació-reducció de l'ambient en que es troba. En una dissolució, la proporció de compostos oxidats en relació al compostos reduïts constitueix el potencial redox (E_h). Alguns microorganismes només poden viure en ambients oxidats i d'altres només en estats reduïts (Atlas i Bartha 2002). Un valor alt de E_h i positiu indica un ambient que afavoreix les reaccions d'oxidació; un valor baix i negatiu indica un ambient fortament reduït. Els microorganismes aerobis estrictes només són metabòlicament actius a potencials redox positius mentre que els microorganismes anaerobis estrictes sols són actius a potencials redox negatius. En canvi, els microorganismes anaerobis facultatius poden viure en un gran rang de potencials redox. El potencial redox està molt influït per la presència o absència de l'oxigen molecular (Atlas i Bartha 2002).

El pH i les sals

El pH és una altre factor que pot afectar a la supervivència de les bactèries i virus en aigües. Encara que el seu efecte en la supervivència dels microorganismes en l'ambient no ha estat gaire estudiat, s'han realitzat molts estudis a nivell de laboratori. Encara que els microorganismes poden créixer en un rang ampli de pH, la tolerància d'aquests té un cert límit. Variacions intenses del pH en el medi poden danyar als microorganismes alterant la membrana plasmàtica o inhibint l'activitat enzimàtica i de les proteïnes transportadores. A més a més, els canvis de pH externs poden modificar la ionització de les molècules dels nutrients, disminuint la disponibilitat d'aquests pels microorganismes. Com s'ha comentat anteriorment hi ha pocs treballs "in situ" sobre la influència del pH en la supervivència dels microorganismes. S'ha descrit que el pH, juntament amb la temperatura i la radiació solar són els factors més importants d'inactivació dels fags F-ARN específics en aigües de riu (Schaper *et al.* 2002).

El tipus i la concentració de les sals en aigües ambientals poden tenir una gran influència en la supervivència dels microorganismes en aigües ambientals. Els cations, en particular els cations multivalents com el Magnesi (Mg^{2+}) i el Calci (Ca^{2+}) poden ajudar a l'adsorció dels microorganismes i virus a una superfície sòlida. Una davallada de les concentracions de sals o de la força iònica en l'aigua, com en els períodes de pluges causen la desadsorció dels virus i de les bactèries de les partícules sòlides de l'aigua (Gerba i Bitton 1984). També hi ha pocs estudis "in situ" sobre l'efecte de la salinitat en la supervivència de les poblacions bacterianes en aigües superficials. No obstant, s'ha descrit que un augment de la salinitat en l'aigua potencia l'inactivació bacteriana juntament amb l'inactivació per irradiació solar en aigua de mar (Sinton *et al.* 2002). Aquesta major inactivació, també es va detectar en augmentar la concentració de sals en estudis d'inactivació realitzats al laboratori en cultius de coliformes fecals (Solié i Krustulović 1992). Altres estudis realitzats en la foscor, on es va incrementar la concentració de sals en cada una de les mostres es va observar que també es produïa una major inactivació d'*E. coli* i estreptococs fecals en les mostres amb una concentració de sal més elevada (Evison 1988).

Desinfectants

El tractament depurador de les aigües inclou una sèrie de processos físics, químics i biològics combinats per a l'eliminació de sòlids resuspesos, matèria orgànica, metalls i nutrients de l'aigua residual. Aquests processos normalment van acompanyats de processos de desinfecció que ajuden a assegurar una qualitat de l'aigua en el procés de la potabilització d'aquesta.

La desinfecció consisteix en la destrucció selectiva dels microorganismes que causen malalties. No tots els microorganismes són destruïts, fet que la diferencia de la esterilització. No s'ha d'oblidar que l'objectiu de la depuració o de la potabilització de l'aigua, no és obtenir aigua estèril sinó que l'aigua sigui lliure de patògens o en un segon terme que sigui potable.

Els desinfectants més utilitzats són els agents químics oxidants, entre ells el més representatiu és el clor degut a la seva amplia difusió en l'ús. L'ozó també és un desinfectant eficaç, amb un cost més elevat, no obstant l'efecte és menys problemàtic.

Matèria orgànica

La matèria orgànica d'un ecosistema sol ser el factor limitant pel creixement dels microorganismes heteròtrofs. En els sistemes aquàtics, la demanda química d'oxigen (DQO) s'utilitza com a índex del carboni total de la mostra. I la demanda biològica d'oxigen (DBO) permet determinar la concentració de matèria orgànica disponible. La presència de matèria orgànica en l'aigua encara no se sap quin efecte té sobre la supervivència dels diferents microorganismes. Alguns treballs indiquen que la influència de la matèria orgànica potencia la supervivència dels virus, en canvi d'altres estudis no detecten aquesta influència (Pedley *et al.* 2004). En canvi, la influència de la matèria orgànica en les bactèries pot tenir un paper positiu, si les condicions ambientals són favorables es pot produir un creixement de les diferents poblacions microbianes a nivell ambiental. Algunes teballs demostren que en aigües superficials en ambients tropicals hi ha un creixement de les bactèries indicadores de la contaminació fecal en presència d'aigües riques en matèria orgànica (Carrillo *et al.* 1985; Pedley *et al.* 2004).

5.1.3. Factors biològics d'inactivació

La inactivació per factors biològics de les poblacions bacterianes en hàbitats aquàtics és un factor molt important i complex. Els factors biològics juguen un paper molt important en la supervivència dels microorganismes en el medi natural. De manera global, està clarament demostrat que les diferents poblacions bacterianes presenten una major supervivència en medis artificials que no pas en naturals. L'eliminació de les bactèries en els medis aquàtics per factors biològics es diferencien per tres causes de depredació: per protozous, per fags i per bactèries. Ara bé, el factor més determinant és la depredació per protozous.

Diversos estudis demostren que la naturalesa d'aquests factors biològics són dependents de la temperatura i que estan lligats a l'activitat bacteriana en el medi ambient. La depredació per protozous, com s'acaba de comentar, és una de les causes més importants en la disminució de la població bacteriana en les aigües, perquè aquests són un dels majors consumidors de les bactèries (Clarholm 1984). S'ha estimat que un protozou pot consumir entre 150 a 900 grams de bactèries per metre quadrat a l'any (Stout i Heal 1967). A més a més, la supervivència d'aquests en les aigües superficials és molt elevada, fins i tot en condicions adverses. Els protozous són organismes dependents de l'aigua, unicel·lulars, amb una mida de 2 a 1000 µm. El temps de generació d'aquests està entre 2 a 12 h, fins i tot hi ha espècies que sobrepassen aquestes dotze hores. En els períodes desfavorables llargs, molt protozous poden sobreviure amb la formació d'ooquistes (Corliss i Esser 1974). D'altres treballs també senyalen que l'activitat dels protozous és un factor molt important en els estudis d'inactivació natural en aigües de riu realitzades a la foscor (Sinton *et al.* 2002).

La inactivació de les poblacions bacterianes per fags en aigües també es un factor molt important a tenir en compte. Si les condicions ambientals són favorables algunes poblacions bacterianes es poden multiplicar en l'aigua, en aquests casos aquestes poblacions poden ser regulades pels fags. Aquest fenomen es produeix sobretot en l'aigua de mar on la quantitat de virus és molt elevada, un bilió de virus per litre (Furhman 1999). En general, els fags són els responsables d'un 10-50% de la mortalitat de les bactèries en aigües superficials i d'un 50-100% en ambients on hi ha una

presència molt baixa d'oxigen, com els llacs (Furhman 1999; Proctor i Furhman 1990).

Finalment també es pot produir una depredació de les poblacions bacterianes per les pròpies bactèries. El gènere *Bdellovibrio* és un gènere depredador obligat que necessita del creixement i multiplicació de les bactèries Gram negatives en l'aigua per que són les seves preses (Shillo 1983). Les espècies de *Bdellovibrio* estan molt esteses pels ambients aquàtics i terrestres.

Hi ha diferents estudis d'inactivació natural en aigües on es compara la inactivació biològica en aigües respecte la inactivació per processos físico-químics. Herman va estudiar aquestes diferents inactivacions en les aigües d'un llac per diferents virus, va observar una inactivació més elevada dels virus poliovirus 1 i coxsackievirus A9 a una temperatura de 21-23°C que no pas en la mateixa aigua del llac però esterilitzada (els factors biològics de l'aigua van ser eliminats) (Herman 1972). Un altre estudi d'aquest tipus es va realitzar amb d'aigua riu, es va comparar la supervivència d'*E. coli* en aigua de riu i en la mateixa aigua riu esterilitzada (Flint 1987). Aquest autor va detectar que la supervivència d'*E. coli* va ser major en l'aigua de riu filtrada que no pas en l'aigua de riu natural. S'accepta per regla general que en l'aigua destil·lada, en l'aigua de consum i en l'aigua de mar estèril la inactivació natural és menor que no pas en aigües residuals, aigües superficials i aigua de mar (Labelle *et al.* 1980). Els factors inactivadors en general són termolàbils, i es relacionen en la major part dels casos amb partícules, bactèries i algues.

5.1.4. Inactivació natural de *Bifidobacterium*

El primer estudi d'inactivació natural sobre *Bifidobacterium* va consistir en diluir diferents mostres de femtes d'humanes en aigua de riu. Es va efectuar diferents enumeracions de les bifidobactèries, juntament amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal en aigües com *E. coli* i els enterococs, amb medis selectius (Gylleberg *et al.* 1960). Aquests recomptes es van realitzar als temps 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12 dies tan en condicions fredes (4°C) com en temperatures ambientals (20°C). En aquest estudi es va concloure que la supervivència de *Bifidobacterium* en aigua de riu era la mateixa que la dels coliformes fecals, a més a més, aquests no es multiplicaven al medi com els coliformes fecals, que en el segon dia de mostreig els valors obtinguts van ser més alts que els valors inicials. Un altre factor important van ser els valors alts detectats de *Bifidobacterium* en les mostres inicials de les femtes humanes (Gylleberg *et al.* 1960). En les mostres refrigerades les tres poblacions bacterianes estudiades van presentar un comportament molt similar, als 12 dies es va produir una reducció d'una unitat logarítmica en tots tres casos.

Altres estudis d'inactivació natural més específics van comparar la supervivència d'una soca tipus d'*E. coli* i d'una soca tipus de *B. adolescentis* en aigua d'un riu tropical (Carrillo *et al.* 1985). Aquests autors van observar que a les 48 h s'havia produït un descens del 50% de la població inicial de *B. adolescentis*, i a les 60 h encara no s'havia produït la reducció d'una unitat logarítmica d'aquesta població inicial. En canvi, la soca tipus d'*E. coli* va presentar un lleuger increment de la població inicial. Ara bé, com s'ha comentat en el capítol 2, l'enumeració de les bifidobactèries en el medi NY-6 es produïa una sobreestimació dels resultats a la falta de l'eficàcia d'aquest medi (Carrillo *et al.* 1985).

Muñoa i Parés (1988) van realitzar un experiment en que estudiaven la supervivència de *B. breve* en aigua de riu esterilitzada per filtració calculada a partir del recomptes obtinguts en tres medis de cultius diferents: el medi ric Reinforced Clostridial Agar (RCA) i els medis selectius per *Bifidobacterium* BIM-25 i BIM-50. Els recomptes amb el medi ric a les 72 h encara no s'havia produït una inactivació d'una unitat logarítmica de la població inicial de *B. breve*. En canvi, amb els medis selectius aquesta

reducció al mateix temps era de dos unitats logarítmiques (Muñoa i Pares 1988).

Degut als pocs estudis d'inactivació natural relacionades amb el gènere *Bifidobacterium* en aquests capítol final es vol valorar el comportament del *Bifidobacterium* i de les dues espècies de bifidobactèries, proposades com a indicadores de l'origen de la contaminació fecal en els capítols anteriors, "in situ" en aigua de riu, simulant al màxim les condicions ambientals per tal d'entendre el comportament d'aquests microorganismes en un ecosistema natural, com és l'aigua de riu, amb totes les tècniques desenvolupades al llarg de la memòria.

Per tant, els objectius d'aquest capítol han estat:

- Comparar la persistència de les poblacions bacterianes del gènere *Bifidobacterium* amb la resta de poblacions indicadores de la contaminació fecal, en aigua de riu "in situ" mitjançant diferents metodologies, tant moleculars com en el medi selectiu HBSA.
- Comparar la inactivació natural de dues soques tipus de *Bifidobacterium* en aigua de riu "in situ", proposades com a indicadores de l'origen de la contaminació fecal amb les poblacions naturals de *Bifidobacterium* en l'aigua de riu.
- Comparar la diferencia de supervivència d'una soca tipus de *Bifidobacterium* en dues condicions ambientals molt diferents en aigua de riu "in situ". En el primer cas en unes condicions naturals (corresponent al segon objectiu) i en el segon cas amb en aigua de riu autoclavada on es realitzarà l'experiment d'inactivació natural.

5.2. Materials i Mètodes

Atenent als diferents objectius proposats anteriorment aquest capítol s'ha dividit en tres parts ben diferenciades. En un primer bloc s'ha determinat la persistència de *Bifidobacterium* en aigua de riu juntament amb altres poblacions bacterianes indicadores de la contaminació fecal en aigües, com són els coliformes fecals, enterococs i les espores de clostridis sulfit-reductors. Aquesta persistència ambiental en aigües s'ha determinat mitjançant un assaig "in situ" en aigua de riu tant amb mètodes tradicionals (medis selectius) com amb mètodes moleculars (PCR múltiple ADO-DEN i PCR quantitativa en temps real).

El segon bloc d'estudi s'ha avaluat la persistència de dues soques tipus del gènere *Bifidobacterium* proposades com a microorganismes indicadors de contaminació fecal també en l'aigua de riu, *B. adolescentis* i *B. dentium*. A més a més, es va comparar la persistència d'aquestes dues soques amb la persistència de soques ambientals de *Bifidobacterium*. En aquest segon bloc també s'ha analitzat les diferents persistències de les dues espècies mitjançant l'assaig "in situ" en aigua de riu amb mètodes tradicionals (medis selectius) i amb mètodes moleculars (PCR aniuada i PCR quantitativa en temps reals).

Finalment en el tercer bloc es va avaluar la inactivació de la soca tipus de *B. adolescentis* DSM 20083^T en condicions exclusives físico-químiques en l'aigua de riu amb el mateix model realitzat en els dos blocs anteriors. També es va efectuar un seguiment molecular (PCR aniuada i PCR quantitativa en temps reals) i amb medis selectius.

Per tant aquest capítol que s'ha analitzat la inactivació de les diferents poblacions bacterianes “in situ” en aigua de riu mitjançant quatre experiments que cada un d'ells s'ha dividit en tres assaigs diferents :

A) Anàlisi comparatiu de la persistència del gènere *Bifidobacterium* amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal tradicionals “in situ” en aigua de riu.

B) Persistència de les soques tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T “in situ” en aigua de riu.

C) Persistència de la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T en condicions físico-químiques “in situ” en aigua de riu.

5.2.1. Model experimental per a l'estudi de la persistència de *Bifidobacterium* i de les poblacions microbianes descrites com indicadores de contaminació fecal en aigua de riu “in situ”

Per tal de determinar la supervivència de les diferents poblacions bacterianes en el medi aquàtic es va efectuar una sèrie d'estudis inactivació natural “in situ” en el riu Llobregat. El lloc concret va ser la cubeta d'entrada de la planta potabilitzadora d'Abrera (Figura 5.1) on les condicions de l'aigua reprodueixen amb gran fidelitat les condicions del riu degut al flux continu de l'aigua. En conseqüència, els valors de pH, temperatura, salinitat, oxigen dissolt, conductivitat són els mateixos que en el riu. Es va realitzar quatre experiments de manera independentment, dos a l'hivern i dos a l'estiu, aplicant un mateix model experimental per les diferents anàlisis. Cada un dels

experiments es va compondre de tres assaigs (Bloc A, B, C) per cada experiment. El model experimental va consistir en recollir cada 24 h dos tubs de diàlisi de cada una de les mostres dels tres assaigs realitzats per així determinar la inactivació de les diferents poblacions bacterianes estudiades durant dues setmanes. D'aquesta manera es va observar el comportament dels microorganismes "in situ" amb alguns dels paràmetres ambientals que influencien sobre ells. Al realitzar aquests assaigs en la cubeta de la potabilitzadora es van poder obtenir els diferents paràmetres físico-químics com el pH, conductivitat, oxigen dissolt, temperatura i també es va determinar la irradiació diària.

Figura 5.1. Cubeta d'anàlisis físico-química d'entrada a la potabilitzadora d'Abrera del riu Llobregat on es van realitzar els diferents experiments "in situ" de persistència.



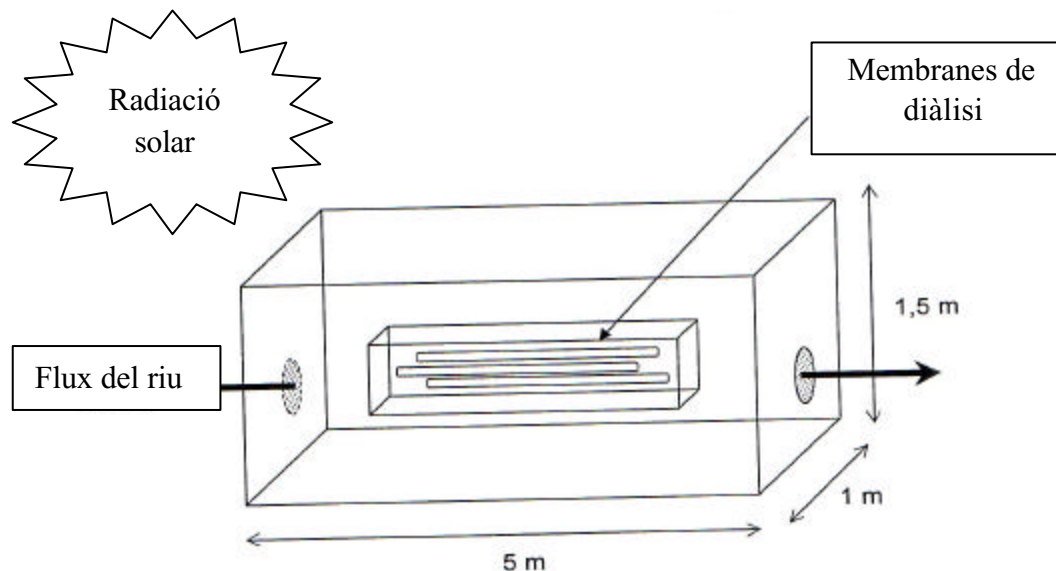
Els quatre experiments es van realitzar en membranes de diàlisi (Medicell Dialysis Tubing Visking). Aquestes es presenten en forma de tub allargat flexible, però resistent, de material porós que deixa passar el material de 14 kDa de diàmetre.

Per preparar les membranes de diàlisi es van tallar les diferents proporcions del tub de diàlisi d'una longitud de 30 cm cada una. La manipulació de les membranes es va realitzar sempre amb guants de làtex per evitar que les grasses de la pell obstruïssin els porus de la membrana. Es va seguir el protocol descrit en el Molecular Cloning (Sambrook i Russell 2001). Les membranes tallades es van bullir durant 10 min en una solució de rentat de bicarbonat sòdic al 2% EDTA 1mM pH 8.0 (Annex II).

Posteriorment es van rentar les membranes en aigua bidestil·lada durant 10 min més. A continuació es van tornar a bullir durant 10 min en una solució EDTA 1mM pH 8.0 (Annex II). Es van deixar refredar i es van guardar a 4°C per un màxim de 6 mesos. Els tubs de diàlisi sempre van estar submergits, tant en el moment de bullir les membranes com quan es van guardar a 4°C.

Tots els tubs de diàlisi es van introduir en una gàbia per protegir les membranes de les agressions de matèries grolleres transportades per l'aigua. Aquest recipient es va submergir dins l'aigua dins la cubeta d'anàlisi físico-químics a una profunditat de 20-25 cm estan sempre descoberta per mantenir les mateixes condicions d'insolació durant el temps de l'assaig. En la Figura 5.2 es mostra el muntatge de l'experiment situat a la cubeta d'entrada a la depuradora d'Abrera.

Figura 5.2. Esquema de l'experiment realitzat en aquest capítol. L'aigua del riu entra per la part dreta de la cubeta i surt per l'esquerra. En tot moment l'aigua del riu circula per tota la cubeta mantenint les mateixes condicions del riu i per tant les membranes de diàlisi en tot moment estan sotmeses a les mateixes condicions del riu. D'aquesta manera es pot realitzar els estudis "in situ" de les diferents poblacions bacterianes.



Els tubs de diàlisi es van omplir amb les suspensions adients segons els diferents anàlisis, com s'ha descrit esquemàticament en l'apartat 5.2. Cada un d'aquests tubs de diàlisi es va posar en la cubeta d'entrada de la potabilitzadora. Les suspensions distribuïdes en cada un dels tubs de diàlisi es corresponen als diferents assaigs realitzats que s'indiquen a continuació:

A) Anàlisi comparatiu de la persistència de *Bifidobacterium* amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal tradicionals “in situ” en aigua de riu

La determinació de la supervivència de *Bifidobacterium* i de la resta de poblacions bacterianes analitzades es va realitzar amb aigua residual de la EDAR de Gavà que es va diluir 1/50 amb aigua del riu Llobregat per aconseguir un nivells alts de contaminació fecal en el riu i així poder evidenciar més fàcilment els processos d'inactivació. Es va preparar un total de 16 tubs de diàlisi per experiment que es van omplir amb 15 ml de la barreja de l'aigua residual i de l'aigua del riu. Tots els tubs es van tancar dins una malla. La persistència de *Bifidobacterium* es va realitzar en el medi HBSA com s'ha descrit en l'apartat 2.2.1 de la memòria i es va realitzar una posterior confirmació de les colònies crescudes en el medi amb la tècnica de la hibridació colonial tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.2.2.2. D'aquesta manera es va poder determinar la persistència de les bifidobactèries totals i les bifidobactèries fermentadores del sorbitol.

Es va determinar també la inactivació dels diferents microorganismes indicadors tradicionals com el coliformes fecals que es van incubar en el medi mFC, els enterococs que es van incubar en els medis mEA i BEA i les espores de clostridis sulfit-reductors (clostridis) que es van enumerar en el medi SPS, totes aquestes enumeracions es van realitzar tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.2.1. També es va efectuar un seguiment molecular de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium*. Per aquest motiu es va realitzar l'extracció de l'ADN de cada una de les mostres de la barreja d'aigua residual i riu analitzades. El protocol d'extracció de l'ADN fou el descrit a l'apartat 3.2.3.3 amb el “QIAamp DNA blood mini kit”. Es van efectuar dos estudis moleculars diferents. Un a ser la detecció per PCR múltiple ADO-DEN de les dues espècies en l'aigua de riu

dopada que es va realitzar com s'ha descrit en l'apartat 3.2.6. I l'altre estudi va constar d'una quantificació de les dues poblacions bacterianes mitjançant la PCR quantitativa en temps real com s'ha descrit anteriorment en l'apartat 4.2.2. Finalment es van comparar les diferents proporcions de les bifidobàcteries totals i bifidobàcteries fermentadores de sorbitol descrites en l'apartat 2.2.3 de totes les mostres analitzades.

B) Persistència de les soques tipus *B. adolescentis* DSM 20083T i *B. dentium* DSM 20084T “in situ” en aigua de riu

La persistència de *B. adolescentis* i *B. dentium* es va determinar tan amb el medi selectiu Beerens com per les tècniques moleculars: PCR aniuada i PCR quantitativa en temps real. Es va incubar les dos soques tipus (*B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T) per separat a 37°C durant 48 h en el medi líquid RCM en condicions d'anaerobiosi. Es va realitzar una dilució 1/10 del cultiu pur de cada una de les dues espècies per separat amb l'aigua de riu. Per cada una de les espècies es van utilitzar 15 tubs de diàlisi per experiment on s'hi va afegir 10 ml de la barreja del cultiu i de l'aigua de riu. Els 30 tubs es van tancar també en una malla. Les enumeracions en el medi Beerens amb les dues soques tipus es van realitzar com s'ha descrit en l'apartat 2.2.1. En aquest medi específic hi creixen totes les espècies de *Bifidobacterium*, però en aquest cas es va utilitzar per a les enumeracions de les dues espècies. Al dopar l'aigua de riu amb unes concentracions tan elevades de les dues espècies, les bifidobactèries del riu no interfereixen en el recompte de *B. adolescentis* i *B. dentium* ja que la seva proporció és molt baixa respecte les concentracions de les soques tipus inoculades a l'aigua de riu. Es va realitzar una posterior confirmació de les colònies crescudes en el medi amb la tècnica de la hibridació colonial tal i com s'ha descrit en l'aparat 2.2.2.2. La persistència de les dues espècies també es va realitzar amb un seguiment molecular. Es va efectuar una extracció de l'ADN de cada una de les mostres analitzades utilitzant el protocol d'extracció d'ADN descrit a l'apartat 3.2.3.3 amb el “QIAamp DNA blood mini kit”. La detecció de cada una de les soques estudiades en l'aigua de riu contaminada artificialment es va realitzar per PCR aniuada amb iniciadors específics ja descrits en l'apartat 3.2.5. L'enumeració de les dues poblacions estudiades mitjançant la tècnica de la PCR en temps real es va realitzar tal i com s'ha descrit a l'apartat 4.2.2.

C) Persistència de les soques tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T en aigua de riu autoclavada “in situ”

L'anàlisi de la persistència de *Bifidobacterium* en aigua de riu autoclavada es va realitzar amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T. Com en l'apartat anterior es va efectuar una dilució 1/10 del cultiu pur incubat a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosis en el medi RCM amb l'aigua de riu, però en aquests cas l'aigua de riu va ser esterilitzada a l'autoclau a 121°C durant 20 min. Es van utilitzar 14 tubs de diàlisi per l'experiment on s'hi van afegir 10 ml de la barreja del cultiu i l'aigua de riu estèril, els tubs de diàlisi també es van posar dins d'una malla per evitar les partícules més grolleres del riu. També es va realitzar les diferents enumeracions de cada una de les mostres en el medi selectiu Beerens i es va efectuar una posterior confirmació de les colònies crescudes en el medi amb la tècnica de la hibridació colonial tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.2.2.2. Es va realitzar també l'anàlisi molecular amb la utilització de les tècniques de la PCR aniuada i la PCR quantitativa en temps real.

5.2.2. Anàlisis estadístiques

5.2.2.1 Càlcul de la T_{90} de les diferents poblacions bacterianes

La T_{90} és un paràmetre molt utilitzat en els estudis d'inactivacions bacterianes. Aquest representa el temps necessari per a inactivar el 90% dels microorganismes, o en altres termes, la disminució d'una unitat logarítmica en una població bacteriana. Es van determinar les cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes tan en les enumeracions en els diferents medis selectius com en el seguiment realitzat amb la PCR quantitativa.

Per a la realització d'aquestes cinètiques d'inactivació es va efectuar un model lineal de cada un dels diferents anàlisis per a cada una de les poblacions bacterianes estudiades. Es va escollir aquest model lineal per a poder simplificar i unificar les diferents inactivacions bacterianes i així poder comparar les cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes i també de les diferents metodologies.

El model lineal es va realitzar mitjançant una recta de regressió de les diferents poblacions bacterianes. Aquesta recta de regressió es va calcular mitjançant la reducció logarítmica de cada una de les poblacions en unitats logarítmiques respecte el temps de cada experiment. El valor inicial es va considerar zero per què la inactivació en l'estat inicial és nul·la.

Totes les rectes de regressió d'aquest model lineal mostren la mateixa equació:

$Y = -ax$ <p>Y = unitats logarítmiques d'inactivació a = pendent de la recta X = temps r^2 = coeficient de correlació</p>
--

D'aquesta manera pel càlcul de la T_{90} , el valor de Y correspon a -1 perquè el valor Y representa les unitats logarítmiques de disminució de les diferents poblacions bacterianes.

5.2.2.2. Gràfiques d'inactivació de les poblacions bacterianes

Es van realitzar totes les gràfiques de les cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes estudiant-se basant-se en la relació $\text{Log}_{10} N_0 - \text{Log}_{10} N_t$ en funció del temps. On:

N_t = valor de la població bacteriana en un temps determinat

N_0 = valor de la població bacteriana en el temps inicial.

5.2.2.3. Proves estadístiques

Els anàlisis estadístics es van realitzar amb el programa Statgraphics plus versió 5.0. Es va realitzar el test de la t Student's de mostres aparellades. El límit de significació va ser del 95% on les diferències significatives es van considerar a una $P < 0,05$.

A continuació es presenta un resum general dels estudis d'inactivacions de les diferents poblacions bacterianes realitzades en aquest capítol.

A) Anàlisi comparatiu de la persistència del gènere *Bifidobacterium* amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal tradicionals “in situ” en aigua de riu

Es va diluir aigua residual amb aigua de riu en una proporció 1/50.

- Recomptes en medis selectius:
 - coliformes fecals. Medi mFC (apartat 2.2.1)
 - enterococs. Medis mEA i BEA (apartat 2.2.1)
 - espores sulfit reductores: Medi SPS agar (apartat 2.2.1)
 - bifidobactèries totals. Medi HBSA (apartat 2.2.1)
 - bifidobactèries fermentadores de sorbitol. Medi HBSA (apartat 2.2.1)
 - confirmació amb hibridació colonial dels recomptes en el medi HBSA (apartat 2.2.2.2)
- Anàlisis moleculars:
 - PCR múltiple ADO-DEN (apartat 3.2.6)
 - PCR quantitativa de *B. adolescentis* i *B. dentium* (apartat 4.2.2)
- Anàlisis de la proporció de bifidobactèries totals respecte les bifidobactèries fermentadores de sorbitol (apartat 2.2.3)
- Anàlisis estadístics (apartat 5.2.2)
 - Gràfiques d'inactivacions de les diferents poblacions bacterianes
 - Càlcul de la T_{90} i T_{99} de les diferents poblacions bacterianes
 - Proves estadístiques

B) Persistència de les soques tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T “in situ” en aigua de riu

Es va realitzar una dilució 1/10 del cultiu pur d'una concentració de 8 unitats logarítmiques UFC/mL amb l'aigua de riu de cada una de les dues espècies.

- Recomptes en medis selectius:

bifidobactèries totals. Medi Beerens (apartat 2.2.1)

confirmació amb hibridació colonial dels recomptes en el medi Beerens

(apartat 2.2.2.2)

- Anàlisis moleculars:

PCR aniuada per *B. adolescentis* i *B. dentium* (apartat 3.2.5)

PCR quantitativa de *B. adolescentis* i *B. dentium* (apartat 4.2.2)

- Anàlisis estadístics (apartat 5.2.2)

Gràfiques d'inactivacions de les diferents poblacions bacterianes

Càlcul de la T₉₀ i T₉₉ de les diferents poblacions bacterianes

Proves estadístiques

C) Persistència de la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T en aigua de riu autoclavada “in situ”

Es va realitzar una dilució 1/10 del cultiu pur d'una concentració de 8 unitats logarítmiques/mL de la soca *B. adolescentis* DSM 20083^T en aigua de riu esterilitzada .

- Recomptes en medis selectius:

bifidobactèries totals. Medi Beerens (apartat 2.2.1)

confirmació amb hibridació colonial dels recomptes en el medi Beerens

(apartat 2.2.2.2)

- Anàlisis moleculars:

PCR aniuada per *B. adolescentis* (apartat 3.2.5)

PCR quantitativa de *B. adolescentis* (apartat 4.2.2)

- Anàlisis estadístics (apartat 5.2.2)

Gràfiques d'inactivacions de les diferents poblacions bacterianes

Càlcul de la T₉₀ i T₉₉ de les diferents poblacions bacterianes

Proves estadístiques

5.3. Resultats

5.3.1. Inactivació natural de les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* “in situ” mitjançant tècniques moleculars i medis selectius

L'apartat de resultats s'ha dividit en tres blocs diferenciats (A,B,C) tal i com s'han descrit també en l'apartat de Materials i Mètodes. Es va realitzar quatre experiments de manera independentment, dos a l'hivern (1,2) i dos a l'estiu (3,4), aplicant el mateix model lineal experimental descrit anteriorment. Els diferents paràmetres fisico-químics obtinguts durant el temps de mostreig estan descrits en la Taula 5.1. Aquestes mesures corresponen als valors obtinguts de les 9 a 10 del matí, que correspon l'hora en què es recollien les mostres.

Taula 5.1. Valors mitjans dels paràmetres fisico-químics de l'aigua del riu Llobregat durant els experiments d'inactivació natural detectats de les 9-10 h del matí.

Experiment	Temperatura (°C)	pH	Oxigen dissolt (ppm)	Conductivitat (mV)
1 Hivern	4,1-8,1	8,3-8,8	9,5-10,5	306-379
2 Hivern	10,5-11,6	8,2-8,5	8,2-9,6	330-378
3 Estiu	24,4-25,2	8,0-8,2	6,5-7,4	208-213
4 Estiu	21,1-23,0	8,1-8,3	7,5-8,6	246-256

A) Anàlisi comparatiu de la persistència del gènere de *Bifidobacterium* amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal tradicionals “in situ” en aigua de riu

En els experiments d'hivern (1,2) la temperatura va oscil·lar entre 4-11°C mentre que els experiments de l'estiu aquesta oscil·lació va ser menor de 21-25°C (Taula 5.1) en les hores en què es va efectuar la recollida de mostres. En tots quatre experiments les diferències de pH van ser de 8,0-8,8 sent valors homogenis en tots els casos a les hores en què es van mesurar. L'oxigen dissolt en els experiments d'hivern va ser de 8,2-11,5

ppm i als mesos de l'estiu aquest rang va ser de 6,5-8,6 ppm. Finalment el valors de la conductivitat van oscil·lar entre 306-379 mV als experiments de l'hivern i 208-256 mV a l'estiu.

En la Taula 5.2 es poden observar els diferents recomptes obtinguts per a cada un dels paràmetres microbiològics estudiats en aquest bloc pels quatre experiments: dels coliformes fecals, dels enterococs, de les espores de clostridis sulfít-reductors (clostridis), de les bifidobactèries totals i de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol.

Taula 5.2. Inactivació natural de les diferents poblacions bacterianes estudiades. Els recomptes es van realitzar en cada un dels medis selectius per a cada una de les diferents poblacions bacterianes i estan expressats en unitats logarítmiques de UFC/100mL. **CF:** Nombre de coliformes fecals. **ENT:** Nombre d'enterococs. **CL:** Nombre de espores de clostridis sulfít-reductors (clostridis). **BT:** Nombre de bifidobactèries totals en el medi HBSA. **BG:** Nombre de bifidobactèries fermentadores de sorbitol en el medi HBSA. **ND:** No determinat.

Experiment 1						Experiment 2					
Temps						Temps					
(Hores)	CF	ENT	CL	BT	BG	(Hores)	CF	ENT	CL	BT	BG
0	5,45	4,60	4,08	6,40	5,70	0	5,54	4,94	3,90	5,90	5,30
24	5,40	4,40	4,04	4,90	4,00	24	5,48	4,40	3,78	4,84	4,38
48	5,34	4,28	4,00	4,60	4,00	48	5,43	4,00	3,60	4,30	3,60
72	5,11	4,04	3,95	4,18	3,18	120	3,91	ND	ND	3,30	<3
168	3,74	3,18	3,65	<3	<3	144	3,86	ND	3,56	<3	<3
216	3,70	3,15	3,15	<3	<3	168	3,70	ND	3,48	<3	<3
240	3,65	2,62	3,00	<3	<3	264	3,53	3,23	2,95	<3	<3

Experiment 3						Experiment 4					
Temps						Temps					
(Hores)	CF	ENT	CL	BT	BG	(Hores)	CF	ENT	CL	BT	BG
0	5,34	4,34	3,76	6,40	5,40	0	5,85	4,63	3,70	5,68	4,78
24	5,06	4,10	3,58	3,90	3,00	24	5,48	4,04	3,62	3,48	2,00
48	5,04	3,00	3,45	<3	<3	48	5,27	3,00	3,38	<3	<2
72	4,73	2,78	3,30	<3	<3	72	4,76	2,90	ND	<3	<2
144	3,59	ND	3,26	ND	ND	144	3,53	ND	3,15	ND	ND
192	ND	ND	3,00	ND	ND	192	ND	ND	3,00	ND	ND

Els valors dels coliformes fecals inicials de tots quatre experiments van ser molt similars, situant-se al voltant de les 5,5 unitats logarítmiques UFC/100mL. En els experiments d'hivern (1,2), la reducció de dos unitats logarítmiques es va produir aproximadament a les 240 i 264 h respectivament. En les mostres d'estiu (3 i 4) aquesta reducció es va produir cap a les 144 h en els dos casos.

Els recomptes d'enterococs també van presentar unes enumeracions inicials molt similars de 4,5-5 unitats logarítmiques UFC/100mL. Cap a les 240 h es va produir la reducció de dos unitats logarítmiques en l'experiment 1, i en l'experiment 2 aquesta reducció va ser de 1,69 unitats logarítmiques. La reducció a l'estiu també va ser més ràpida que a l'hivern com en el cas dels coliformes. Aproximadament a les 72 h es va produir aquesta reducció de 2 unitats logarítmiques.

Les enumeracions de les espores de clostridis sulfit-reductors (clostridis) van ser al voltant dels 3,5-4 unitats logarítmiques UFC/100mL en tots els casos. Aquestes poblacions bacterianes en tots quatre experiments van presentar un reducció logarítmica d'una unitat cap a les 192 h. En els casos d'hivern (1 i 2) aquesta reducció es va detectar fins a les 240 i 264 h.

Les poblacions de bifidobactèries totals van presentar unes enumeracions més variables que les altres poblacions al voltant de 5-6 unitats logarítmiques UFC/100mL. En els experiments de l'hivern es va produir una inactivació de 2 unitats logarítmiques a prop de les 72 h en el primer experiment i en el segon es va detectar aquest reducció a prop de les 120 h. En els experiments de l'estiu la reducció d'unitats logarítmiques es va produir aproximadament a les 24 h en tots dos casos.

Finalment les enumeracions inicials de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol van ser sempre d'una unitat logarítmica menor als recomptes de les bifidobactèries totals exceptuant l'experiment 2 on les enumeracions inicials van ser del mateix ordre. La reducció de dos logaritmes en l'experiment 1 es va produir cap a les 72 h i en el segon cap a les 48 h. A l'estiu aquesta reducció va ser la mateixa que les bifidobactèries totals, es va donar al voltant de a les 24 h.

Es van efectuar quatre gràfiques de les cinètiques d'inactivació de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol, bifidobactèries totals, coliformes fecals, enterococs i espores de clostridis sulfit-reductors analitzades en els quatre experiments. També es van realitzar les diferents cinètiques d'inactivació mitjançant la recta de regressió lineal de l'inactivació de les poblacions bacterianes estudiades, basant-se en la relació $\text{Log}_{10} N_t / N_0$ com s'ha descrit a l'apartat 5.2.2.2.

En la Figura 5.4 es mostra les cinètiques d'inactivació de l'experiment 1 corresponents a la primera mostra d'hivern. Com s'observa a la gràfica la població bacteriana que va presentar una inactivació més baixa van ser les espores de clostridis sulfit-reductors. La pendent de la recta de regressió de l'inactivació dels clostridis va ser la més baixa de les cinc poblacions, de 0,004 amb un coeficient de regressió de 0,900. Els enterococs van ser la població bacteriana estudiada que va presentar una inactivació menor després dels clostridis. La recta de regressió va presentar una pendent de 0,008 amb un coeficient de regressió de 0,977, el més alt d'aquest experiment. Els coliformes fecals van tenir una persistència ambiental molt semblant al enterococs, la pendent de la recta de regressió va ser de 0,008 amb un coeficient de regressió de 0,934. Finalment trobem les bifidobactèries totals i les bifidobactèries fermentadores de sorbitol que són les poblacions bacterianes estudiades amb una inactivació natural més gran, les pendents d'aquestes dos poblacions van ser de 0,035 i 0,039 respectivament, amb els coeficients de regressió més baixos de 0,810 i 0,809.

En la Figura 5.5 s'observa la segona mostra d'hivern gràfica (experiment 2) de les cinètiques d'inactivació. S'observa que les cinètiques d'activació són molt similars a les obtingudes a l'experiment 1. La població bacteriana que va presentar una persistència més alta van ser una altra vegada les espores de clostridis sulfit-reductors. La pendent de la recta de regressió de la inactivació dels clostridis va ser també la més baixa de les cinc poblacions, de 0,003 i en aquest cas va presentar el coeficient de regressió de 0,888. Els enterococs també van ser la població bacteriana estudiada que va presentar una inactivació menor després dels clostridis. La recta de regressió va presentar una pendent de 0,007 amb un coeficient de regressió de 0,903. La persistència dels coliformes fecals va ser diferent de la persistència ambiental dels enterococs, la pendent de la recta de regressió va ser de 0,009 amb un coeficient de regressió de 0,849.

Figura 5.4. Cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes en l'**experiment 1**. S'observem les diferents rectes de regressió lineal de les poblacions bacterianes estudiades: coliformes fecals, enterococs, clostridis, bifidobactèries totals, bifidobactèries fermentadores de sorbitol. Detecció de l'espècie *B. adolescentis* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-), i detecció de l'espècie *B. dentium* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-).

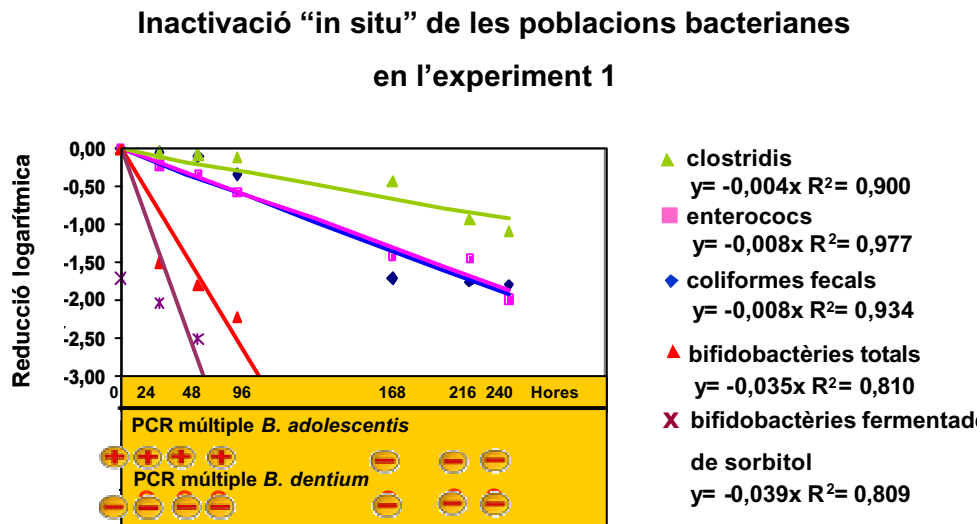
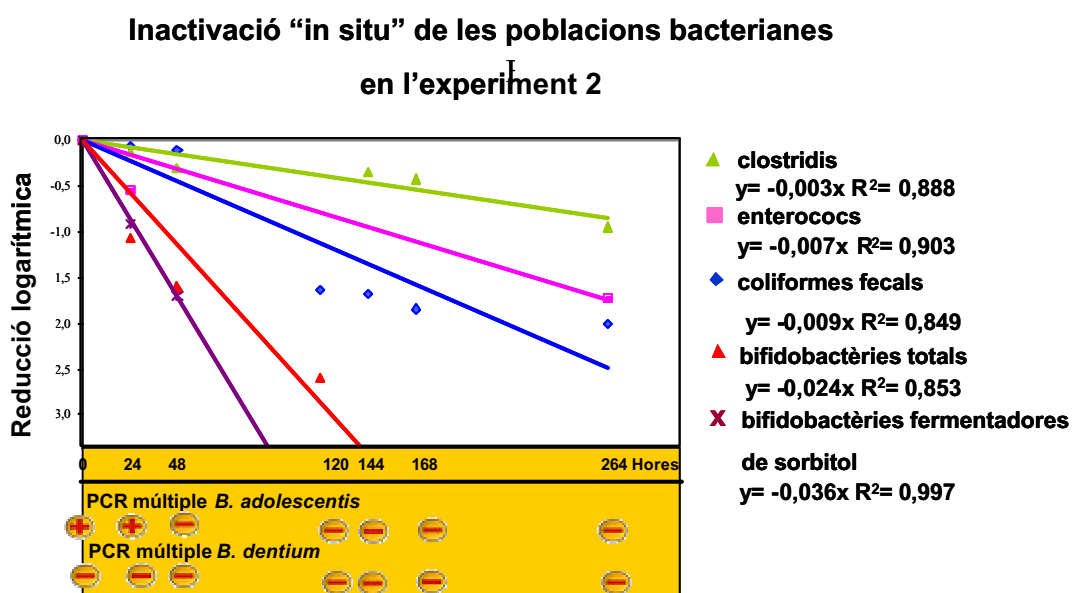


Figura 5.5. Cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes en l'**experiment 2**. S'observem les diferents rectes de regressió lineal de les poblacions bacterianes estudiades: coliformes fecals, enterococs, clostridis, bifidobactèries totals, bifidobactèries fermentadores de sorbitol. Detecció de l'espècie *B. adolescentis* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-), i detecció de l'espècie *B. dentium* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-).



Finalment, les bifidobactèries totals i les bifidobactèries fermentadores de sorbitol van tornar a ser les poblacions bacterianes estudiades amb unes taxes d'inactivació més altes, les pendents d'aquestes dos poblacions van ser de 0,024 i 0,036 amb un coeficient de regressió de 0,853 i 0,997.

En la Figura 5.6 s'observa les cinètiques d'inactivació de l'experiment 3, corresponent als experiments de l'estiu. Com en els casos anteriors, la població bacteriana que va presentar una inactivació més baixa van ser les espores de clostridis sulfit-reductors (clostridis). En aquest experiment la pendent de la recta regressió va ser de 0,004 i el coeficient de regressió de 0,841. En els experiments realitzats a l'estiu les següents poblacions amb una persistència més elevada van ser els coliformes fecals substituint el enterococs que a l'hivern havien estat la població més resistent després dels clostridis. La recta de regressió de les cinètiques d'inactivació va presentar una pendent de 0,011 amb un coeficient de regressió de 0,939 en l'experiment 3. En canvi el enterococs van presentar una supervivència més baixa. La pendent de la recta de regressió va ser de 0,023 amb un coeficient de regressió de 0,912. Finalment, es tornen a trobar les bifidobactèries totals i les bifidobactèries fermentadores de sorbitol com les poblacions bacterianes estudiades amb una inactivació natural més gran. Les pendents de les rectes de regressió d'aquestes dos poblacions van ser de 0,941 i 0,100 respectivament i uns coeficients de regressió de 0,993 i de 1 en les bifidobactèries fermentadores de sorbitol ja que només es van poder aconseguir dues dades de la recta degut a la seva baixa supervivència en l'aigua a l'estiu .

En la Figura 5.7 s'observa la última gràfica de l'estiu (experiment 4) de les cinètiques d'inactivació. S'observa que les cinètiques d'activació són molt similars a l'experiment 3. La població bacteriana que va presentar una persistència més alta va ser les espores sulfit-reductors de clostridis com en totes les mostres analitzades. La pendent de la recta regressió de la inactivació dels clostridis va ser també la més baixa de les cinc poblacions, de 0,004 amb un coeficient de regressió de 0,945. La persistència dels coliformes fecals va ser diferent de la persistència ambiental dels enterococs com en els casos 2 i 3, la pendent de la recta de regressió va ser de 0,011 amb un coeficient de regressió de 0,853. Els enterococs van presentar una persistència molt similar a l'experiment 3.

Figura 5.6. Cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes en l'experiment 3. S'observem les diferents rectes de regressió lineal de les poblacions bacterianes estudiades: coliformes fecals, enterococs, clostridis, bifidobactèries totals, bifidobactèries fermentadores de sorbitol. Detecció de l'espècie *B. adolescentis* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-), i detecció de l'espècie *B. dentium* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-).

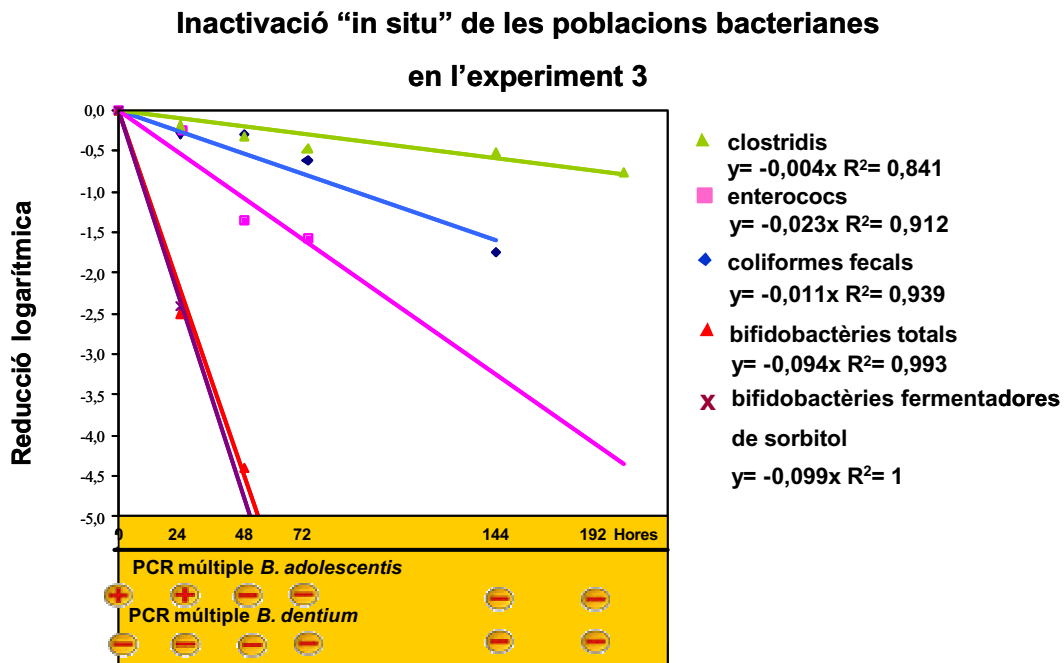
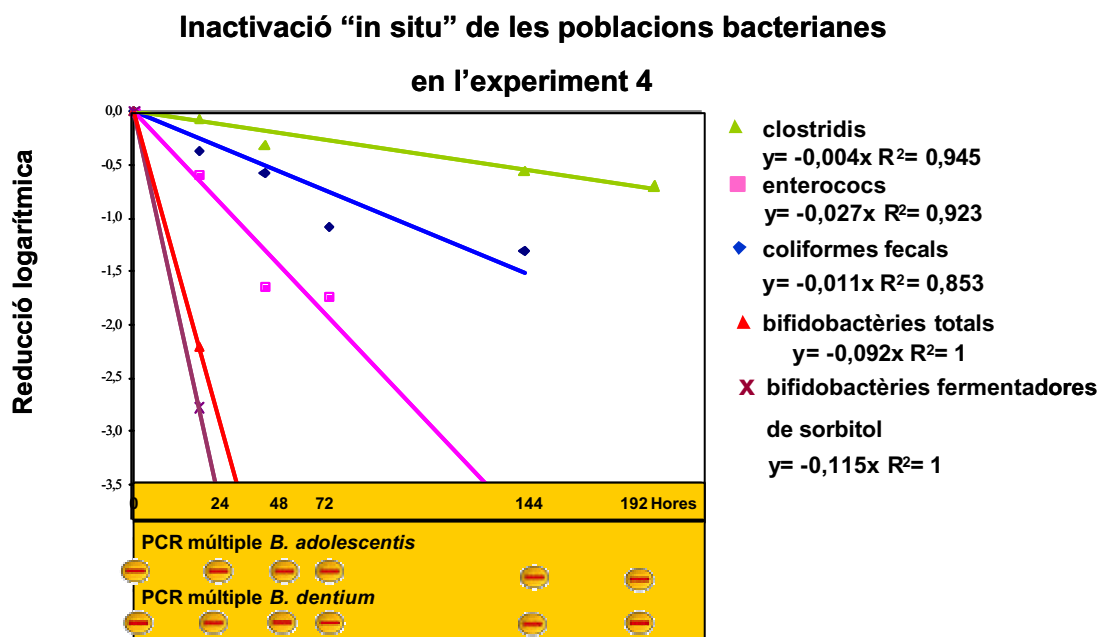


Figura 5.7. Cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes en l'experiment 4. S'observem les diferents rectes de regressió lineal de les poblacions bacterianes estudiades: coliformes fecals, enterococs, clostridis, bifidobactèries totals, bifidobactèries fermentadores de sorbitol. Detecció de l'espècie *B. adolescentis* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-), i detecció de l'espècie *B. dentium* per PCR múltiple ADO-DEN (+/-).



La recta de regressió de la cinètica d'inactivació va presentar una pendent de 0,027 amb un coeficient de regressió de 0,923. Finalment, les pendents de bifidobactèries totals i les bifidobactèries fermentadores de sorbitol van ser de 0,092 i 0,115 respectivament, i van tornar a ser les poblacions bacterianes estudiades amb unes taxes d'inactivació més altes. Els coeficient de regressió en els dos casos van de ser de 1, ja que només es van poder realitzar les enumeracions inicials i les enumeracions a les 24h.

A partir de les rectes de regressió de les inactivacions de les poblacions bacterianes analitzades es van calcular totes les T_{90} de les diferents poblacions (Taula 5.2).

Taula 5.2. Valors de T_{90} de les diferents poblacions bacterianes analitzades en els quatre experiments. **CF:** coliformes fecals **ENT:** enterococs **CL:** clostridis **BT:** bifidobactèries totals **BG:** bifidobactèries fermentadores de sorbitol.

Experiment	T_{90} (h)			
	Hivern		Estiu	
	1	2	3	4
CF	120,42	105,30	90,45	94,34
ENT	125,01	151,50	37,17	37,28
CL	256,41	312,50	238,40	263,15
BT	28,57	28,08	10,64	8,89
BG	25,18	27,77	10,10	8,63

La T_{90} més alta de totes les poblacions bacterianes va correspondre a la població dels clostridis, resultat que es dedueix de l'observat en les gràfiques de cinètiques d'activació descrites anteriorment, el rang va ser de 238,40 h a 312,50 h en tots quatre experiments. La població de coliformes fecals va presentar una diferenciació entre les T_{90} dels experiments de l'hivern (105,30 h-120,42 h) i les mostres de l'estiu (3 i 4) on la T_{90} va ser de 90,45 h i de 94,34 h respectivament. Les poblacions d'enterococs també van presentar una diferenciació estacional. Les T_{90} de l'hivern van ser 125,01 h i 151,50

h. En canvi les T_{90} de l'estiu els valors obtinguts van ser de 37 h. Finalment, com s'ha observat en les gràfiques de cinètiques d'inactivacions, les persistències ambientals més baixes van correspondre a les bifidobactèries totals i bifidobactèries fermentadores de sorbitol. En aquests casos també es va produir una diferenciació estacional. Els rangs de la T_{90} a l'hivern de les bifidobactèries va ser de 25,18h a 41,66 h i l'estiu de 8,63 h a 10,64h.

Paral·lelament també es va realitzar un seguiment molecular de les inactivacions de *B. adolescentis* i *B. dentium* en les mostres d'aigua residual diluïdes 1/50 en l'aigua de riu. Es va efectuar una extracció d'ADN de cada una de les mostres analitzades per a la realització dels anàlisis moleculars. En la Taula 5.3 es detallen els resultats de la PCR múltiple ADO-DEN i de les PCR quantitatives en temps real en els quatre experiments d'aquestes dues espècies de *Bifidobacterium*. La presència de *B. adolescentis* utilitzant la PCR múltiple ADO-DEN va ser detectada en totes les mostres inicials analitzades exceptuant la mostra 4 (Figura 5.7). El llindar de detecció d'aquesta tècnica com s'ha indicat en el capítol 3 és de 10^3 UCF/100mL. En l'experiment 1 es va detectar la presència *B. adolescentis* fins a les 72 h (Figura 5.4). En canvi, en els experiments 2 i 3 només es va detectar fins a les 24 h (Figures 5.5, 5.6). La detecció de *B. dentium* no es va produir en cap de les quatre experiments i en conseqüència no es va poder determinar el temps de desaparició d'aquesta espècie en les mostres analitzades (Figures 5.4, 5.5, 5.6, 5.7).

La quantificació de *B. adolescentis* i *B. dentium* no es va poder realitzar en cap de les mostres ambientals analitzades. La sensibilitat de la metodologia com s'ha comentat anteriorment en la posta a punt de la PCR en temps real va ser de 10^4 cèl·lules/100mL. En tots els casos analitzats de l'experiment 1 el llindar de detecció va ser superior a la concentració d'ADN de les dues espècies en les mostres, per tant no es va poder quantificar els valors d'ADN perquè aquests van estar per sota del llindar de detecció. No es va augmentar la concentració de l'aigua residual en la barreja per poder detectar aquestes espècies per PCR quantitativa en temps real perquè en el bloc B d'aquest capítol es va dopar l'aigua de riu amb unes concentracions suficients per tal de determinar la inactivació natural d'aquestes dues espècies amb aquesta tècnica. Per aquest motiu no es van realitzar més PCRs en temps real dels experiments 2, 3 i 4 en les

mostres d'aigua de riu contaminada amb aigua residual.

Taula 5.3. Detecció i quantificació de *B. adolescentis* i *B. dentium* de les mostres d'aigua residual diluïda 1/50 en aigua de riu. **PCR múltiple ADO:** PCR específica per *B. adolescentis*. **PCR múltiple DEN:** PCR específica per *B. dentium*. **[ADO]:** Enumeració de *B. adolescentis* per PCR en temps real en unitats logarítmiques de cèl·lules/100mL. **[DEN]:** Enumeració de *B. dentium* per PCR en temps real unitats logarítmiques de cèl·lules/100mL. **ND:** No determinat.

Experiment 1					Experiment 2				
(Hores)	PCR múltiple ADO	PCR múltiple DEN	[ADO]	[DEN]	(Hores)	PCR múltiple ADO	PCR múltiple DEN	[ADO]	[DEN]
0	+	-	<10 ⁴	<10 ⁴	0	+	-	ND	ND
24	+	-	<10 ⁴	<10 ⁴	24	+	-	ND	ND
48	+	-	<10 ⁴	<10 ⁴	48	-	-	ND	ND
72	+	-	<10 ⁴	<10 ⁴	120	-	-	ND	ND
168	-	-	<10 ⁴	<10 ⁴	144	-	-	ND	ND
216	-	-	<10 ⁴	<10 ⁴	168	-	-	ND	ND
240	-	-	<10 ⁴	<10 ⁴	264	-	-	ND	ND

Experiment 3					Experiment 4				
(Hores)	PCR múltiple ADO	PCR múltiple DEN	[ADO]	[DEN]	(Hores)	PCR múltiple ADO	PCR múltiple DEN	[ADO]	[DEN]
0	+	-	ND	ND	0	-	-	ND	ND
24	+	-	ND	ND	24	-	-	ND	ND
48	-	-	ND	ND	48	-	-	ND	ND
72	-	-	ND	ND	72	-	-	ND	ND
144	-	-	ND	ND	144	-	-	ND	ND
192	-	-	ND	ND	192	-	-	ND	ND

B) Persistència de les soques tipus *B. adolescentis* DSM 20083^T i *B. dentium* DSM 20084^T “in situ” en aigua de riu

En el segon assaig dels quatre experiments es va determinar la persistència de *B. adolescentis* i *B. dentium* amb el medi selectiu Beerens i amb les tècniques moleculars: la PCR aniuada específica per espècie i la PCR quantitativa en temps real. Es va utilitzar el mateix model experimental realitzat anteriorment. En aquesta ocasió es va incubar cada una de les dues soques per separat a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosis i es va realitzar una dilució 1/10 de cada un dels cultius crescuts amb aigua de riu.

Els valors inicials de *B. adolescentis* en tots quatre experiments van estar als voltants de 7-7,5 unitats logarítmiques d'UFC/100mL tant en el recomptes en el medi Beerens com amb la tècnica de la PCR quantitativa (Taula 5.4). En les mostres d'hivern, la reducció de dos unitats logarítmiques es va produir

aproximadament entre les 48 h i 72 h en el medi Beerens. En les mostres d'estiu (3 i 4) cap a les 24 h es va produir una reducció de tres unitats logarítmiques en el medi Beerens. En canvi, amb la tècnica de la PCR quantitativa en temps real la reducció de dues unitats logarítmiques en l'experiment 1 es va produir aproximadament a les 240 h i en l'experiment 2 cap a les 144 h. En l'experiment 3 la reducció de dos unitats logarítmiques va esdevenir a les 72 h amb aquesta tècnica. En el quart experiment no es va poder realitzar la PCR quantitativa per motius tècnics. En tots quatre experiments es va detectar sempre la presència *B. adolescentis* per PCR aniuada específica per aquesta espècie.

Taula 5.4. Recomptes de *B. adolescentis* en els experiments d'inactivació "in situ" tant en el medi Beerens com amb la tècnica de la PCR en temps real en els quatre experiments. **Beerens:** Recompte de *B. adolescentis* en el medi Beerens (log UFC/100mL). **PCR en temps real:** Recompte de *B. adolescentis* amb la PCR quantitativa (log cèl·lules /100mL). **PCR aniuada:** PCR específica qualitativa per a *B. adolescentis*. **ND:** No determinat.

Experiment 1				Experiment 2			
Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada	Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada
0	7,53	7,32	+	0	7,18	6,98	+
24	6,65	6,89	+	24	6,11	6,48	+
48	ND	6,49	+	48	5,26	5,87	+
72	4,95	6,65	+	120	<10 ³	5,78	+
168	<10 ³	6,56	+	144	<10 ³	<10 ⁴	+
216	<10 ³	6,17	+	168	<10 ³	<10 ⁴	+
240	<10 ³	5,86	+	264	<10 ³	<10 ⁴	+

Experiment 3				Experiment 4			
Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada	Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada
0	7,34	7,12	+	0	7,56	ND	+
24	4,14	ND	+	24	4,55	ND	+
48	<10 ³	6,15	+	48	<10 ³	ND	+
72	<10 ³	5,39	+	72	<10 ³	ND	+
144	<10 ³	<10 ⁴	+	144	<10 ³	ND	+
192	<10 ³	<10 ⁴	+	192	<10 ³	ND	+

En la Taula 5.5 es mostren els recomptes de *B. dentium* realitzats en aquest assaig amb les mateixes tècniques utilitzades per a la detecció de *B. adolescentis* abans mencionades: el medi selectiu Beerens, la PCR quantitativa en temps real i la PCR aniuada qualitativa.

Els valors inicials de *B. dentium* en tots els experiments van estar als voltant de 7 unitats logarítmiques d'UFC/100mL. El recomptes en el medi Beerens van coincidir majoritàriament amb els recomptes de *B. adolescentis*. En les mostres d'hivern la reducció de dos unitats logarítmiques també es va produir a les 48 h, i en les mostres d'estiu (3 i 4) aquesta reducció es va produir a les 24 h. En l'experiment 1, la reducció de les dos unitats logarítmiques amb la tècnica de la PCR quantitativa en temps real es va produir a les 240 h i en l'experiment 2 i 4 a les 144 h. En l'experiment 3, la reducció de dos unitats logarítmiques va esdevenir a les 72 h. En tots quatre experiments es va detectar sempre la presència de *B. dentium* per PCR aniuada específica per aquesta espècie.

Taula 5.5. Recomptes de *B. dentium* en els experiments d'inactivació "in situ" tant en el medi Beerens com amb la tècnica de la PCR en temps real. **Beerens:** Recomppte de *B. dentium* en el medi Beerens (log UFC/100mL). **PCR en temps real:** Recomppte de *B. dentium* amb la PCR quantitativa específica (log cèl·lules/100mL). **PCR aniuada:** PCR específica qualitativa per *B. dentium*.

Experiment 1				Experiment 2			
Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada	Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada
0	7,87	7,63	+	0	7,38	6,94	+
24	6,54	6,78	+	24	6,34	6,12	+
48	5,00	6,60	+	48	5,26	5,34	+
72	<10 ³	6,11	+	120	<10 ³	5,87	+
168	<10 ³	6,36	+	144	<10 ³	<10 ⁴	+
216	<10 ³	6,29	+	168	<10 ³	<10 ⁴	+
240	<10 ³	5,81	+	264	<10 ³	<10 ⁴	+

Experiment 3				Experiment 4			
Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada	Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada
0	7,60	6,91	+	0	7,76	6,91	+
24	4,40	6,05	+	24	4,40	6,05	+
48	<10 ³	5,99	+	48	<10 ³	5,99	+
72	<10 ³	4,60	+	72	<10 ³	5,42	+
144	<10 ³	<10 ⁴	+	144	<10 ³	<10 ⁴	+
192	<10 ³	<10 ⁴	+	192	<10 ³	<10 ⁴	+

En aquests experiments també es van realitzar l'estudi de les cinètiques d'inactivació. En la Figura 5.8 es presenten les dos gràfiques de les cinètiques d'inactivació de *B. adolescentis* analitzades en els experiments 1 i 2. En aquestes gràfiques també estan indicades les rectes de regressió de l'inactivació de *B. adolescentis* estudiades basant-se en la relació $\text{Log}_{10} N_t / N_0$ com ja s'ha descrit a l'apartat 5.2.2.2. Les dos metodologies analitzades van proporcionar resultats molt diferents. Com s'observa a la gràfica la cinètica d'inactivació més baixa va correspondre a la tècnica de la PCR quantitativa en temps real. La pendent de la recta de regressió en l'experiment 1 va ser de 0,006 amb un coeficient de regressió de 0,881 i en l'experiment 2 la pendent va ser de 0,018 amb un coeficient de regressió de 0,867. En canvi amb la utilització del medi Beerens aquesta inactivació va ser més elevada, en els experiments 1 i 2 les pendents de les rectes van ser de 0,037 i 0,041 respectivament amb uns coeficients de regressió de 0,953 i 0,995. En totes les mostres analitzades amb la tècnica de la PCR aniuada es va detectar la presència de *B. adolescentis*.

En la Figura 5.9 s'observa les cinètiques d'inactivació de *B. adolescentis* amb les rectes de regressió realitzades a l'estiu corresponents als experiments 3 i 4. En aquests experiments també es va produir aquesta diferenciació de la persistència de *B. adolescentis* amb les dues metodologies analitzades. A més a més, en tots els casos es va produir un augment de totes les pendents de les rectes de regressió realitzades indicant un descens en la persistència en l'aigua a l'estiu. Com s'observa a la gràfica la cinètica d'inactivació més baixa va correspondre una altra vegada a la tècnica de la PCR en temps real. La pendent d'aquesta recta de regressió va ser de 0,023 amb un coeficient de regressió de 0,985. En canvi, amb la utilització del medi Beerens en els experiments 3 i 4 aquesta la pendent de les rectes van ser de 0,133 i 0,125 respectivament amb uns coeficients de regressió de 1 en tots dos casos, ja que només es van poder quantificar dos punts.

Figura 5.8. Cinètiques d'inactivació de *B. adolescentis* a l'hivern corresponents als experiments 1 i 2. S'indiquen les rectes de regressió lineal de les diferents metodologies: Medi Beerens i PCR quantitativa per a l'enumeració de *B. adolescentis*.

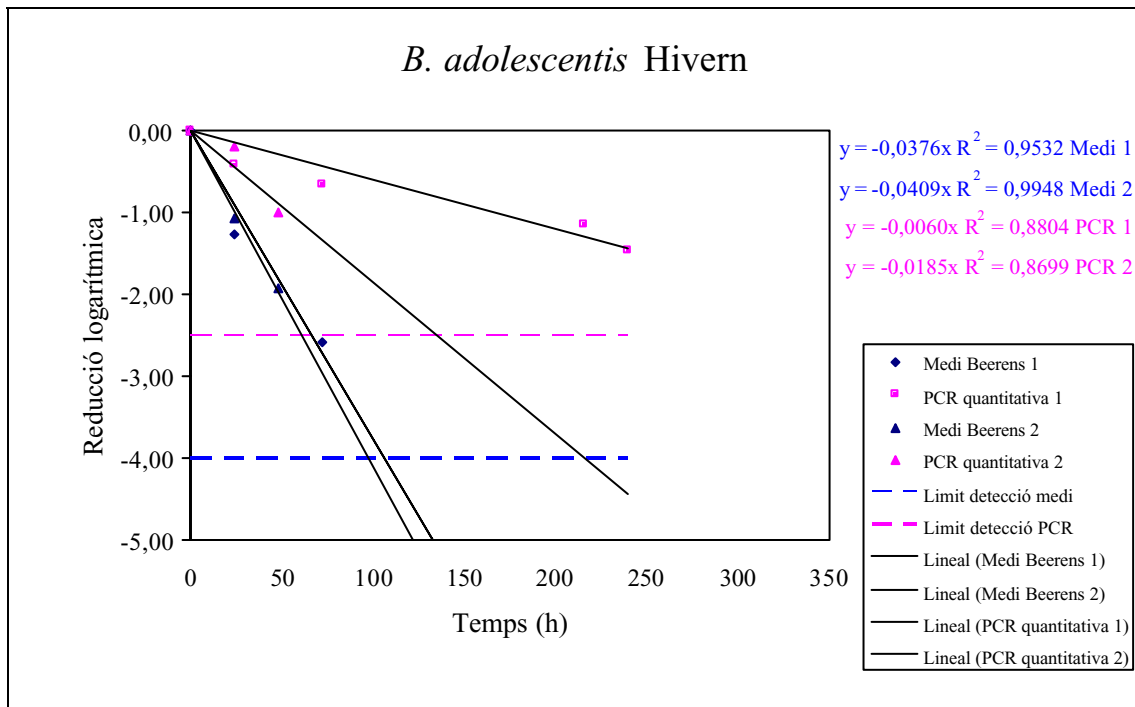
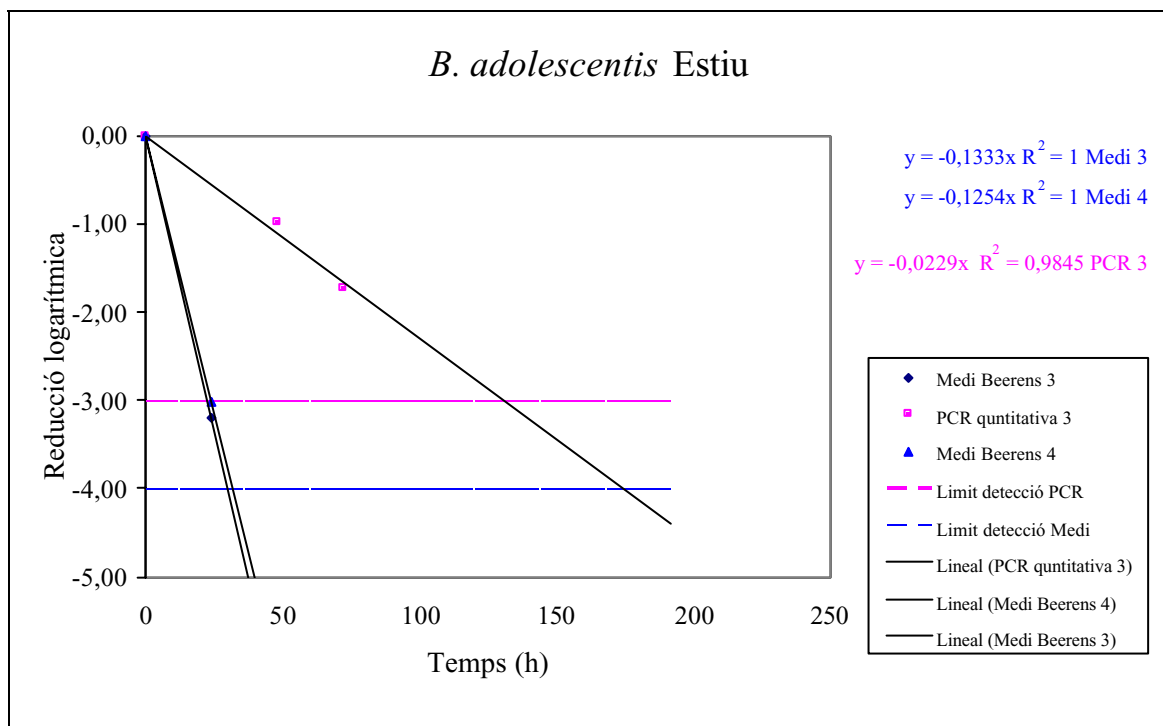


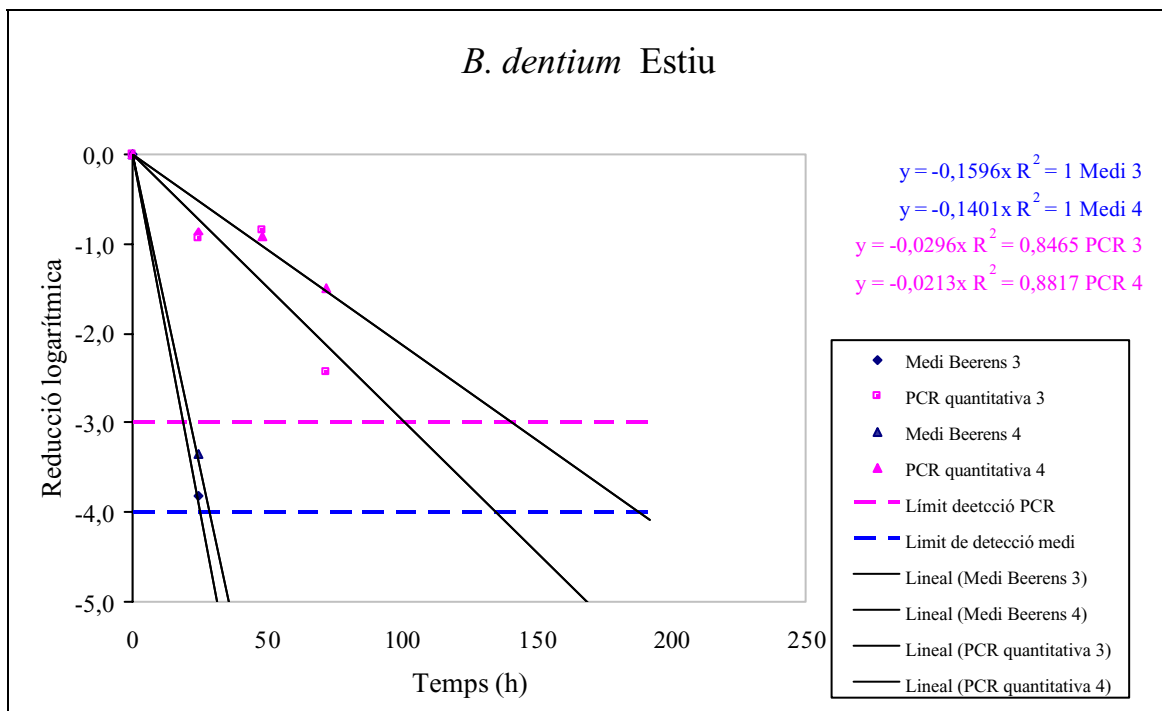
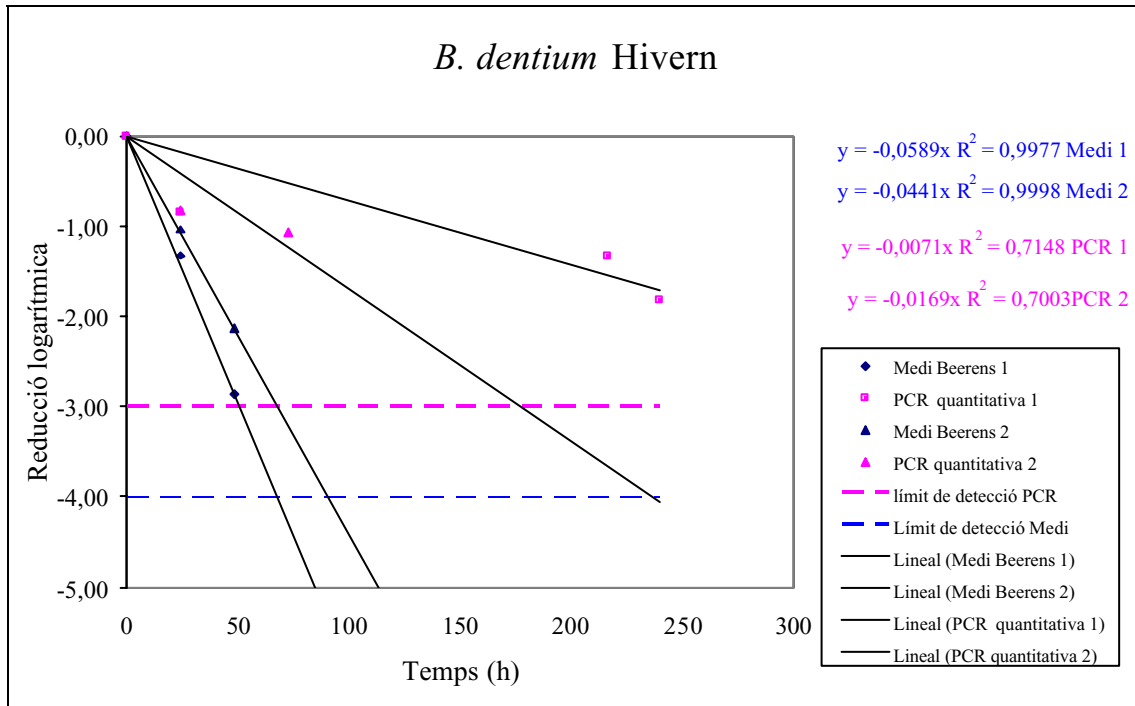
Figura 5.9. Cinètiques d'inactivació de *B. adolescentis* a l'estiu corresponents als experiments 3 i 4. S'indiquen les rectes de regressió lineal de les diferents metodologies: Medi Beerens i PCR quantitativa per a l'enumeració de *B. adolescentis*.



Es van realitzar les cinètiques d'inactivació de *B. dentium* de la mateixa manera que es van efectuar amb *B. adolescentis* en els quatre experiments. En la Figura 5.10 es s'observa les diferents inactivacions de *B. dentium* amb les corresponents rectes de regressió lineal realitzades a l'hivern corresponents als experiments 1 i 2. Les dos metodologies utilitzades també van mostrar resultats molt diferents. Com s'observa en les gràfiques de les cinètiques d'inactivació la persistència més alta correspon als anàlisis realitzats amb la tècnica de la PCR en temps real. En l'experiment 1 la pendent de la recta de regressió va ser de 0,008 amb un coeficient de regressió de 0,715 i en l'experiment 2 la pendent va ser de 0,017 amb un coeficient de regressió de 0,700. En canvi, amb la utilització del medi Beerens, en els experiments 1 i 2 les pendents de les rectes van ser de 0,059 i 0,044 respectivament amb uns coeficients de regressió de 0,997 i 0,999. En totes les mostres analitzades es va detectar la presència de *B. dentium*.

En la Figura 5.10 s'observen les cinètiques d'inactivació de *B. dentium* realitzades a l'estiu corresponents als experiments 3 i 4. En aquests experiments també es va produir aquesta diferenciació de la persistència utilitzant les dues metodologies. A més a més, en tots els casos també es va produir un augment de totes les pendents de les rectes de regressió realitzades a l'estiu respecte les pendents d'inactivació realitzades a l'hivern. Com s'observa a la gràfica, la cinètica d'inactivació més baixa va correspondre una altra vegada a la tècnica de la PCR en temps real. En els experiments 3 i 4 les pendents de les rectes de regressió van ser de 0,030 i 0,021 respectivament amb uns coeficients de regressió de 0,846 i 0,882. En canvi, amb la utilització del medi Beerens en els experiments 3 i 4 aquesta inactivació va ser major, les pendents de les rectes van ser de 0,160 i 0,140 respectivament amb uns coeficients de regressió de 1 perquè només es van poder mesurar dos punts per la inactivació tant alta.

Figura 5.10. Cinètiques d'inactivació de *B. dentium* corresponents a l'hivern, experiments 1, 2 i l'estiu experiment 3, 4. S'han indicat les diferents rectes de regressió lineal de les diferents metodologies (PCR quantitativa i el medi Beerens) utilitzades per a l'enumeració de *B. dentium*.



En la Taula 5.6 es detallen les diferents T_{90} calculades pels quatre experiments calculades partir de les rectes de regressió obtingudes de les dues espècies estudiades.

Taula 5.6. Valors de T_{90} de les dues espècies estudiades amb les dues metodologies en els quatre experiments realitzats. **ADO M:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 en el medi Beerens. **ADO P:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 mitjançant la PCR quantitativa. **DEN M:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. dentium* DSM 20084 en el medi Beerens. **DEN P:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. dentium* DSM 20084 mitjançant la PCR quantitativa.

Experiment	T_{90} (h)			
	Hivern		Estiu	
	1	2	3	4
ADO M	26,59	24,44	7,56	7,97
ADO P	166,66	54,05	43,66	ND
DEN M	16,97	22,67	6,26	7,13
DEN P	140,84	59,17	33,78	46,94

Les T_{90} més altes van correspondre en tots els casos als experiments en què es va utilitzar la tècnica de la PCR quantitativa en temps real, tant a l'hivern com a l'estiu com s'havia observat en les gràfiques de les cinètiques d'inactivació descrites anteriorment. En els experiments d'hivern (1 i 2) la T_{90} de *B. adolescentis* van ser de 166,25 h i 55,00 h respectivament, en canvi a l'estiu la única T_{90} calculada va ser de 42,73 h. Un cas molt similar va ocórrer amb *B. dentium*, les T_{90} a l'hivern (125,00 h i 59,17 h) van ser més elevades que a l'estiu. Les T_{90} a l'estiu van estar entre el 34,48 h i 47,61 h.

Les T_{90} calculades en el medi Beerens per a les dues espècies analitzades són molt similars. A l'hivern les T_{90} de *B. adolescentis* van ser de 17,85 h i 13,88 h. Aquests valors comparats amb els obtinguts amb la tècnica de la PCR en temps real són molt baixos. I el mateix va ocórrer amb l'espècie *B. dentium* on les T_{90} van ser de 16,94 i 23,25 h. A l'estiu les T_{90} van tornar a disminuir com els altres casos anteriors, però no tant com amb la tècnica de la PCR quantitativa. Aquestes T_{90} a l'estiu per *B. adolescentis* van ser de 10,00 h i 8,33 h i per *B. dentium* van ser de 11,11 h i 10,98 h.

C) Persistència de las soca tipus de *B. adolescentis* DSM 20083^T en aigua de riu autoclavada “in situ”

En el tercer assaig es va analitzar la persistència de *B. adolescentis* amb aigua de riu autoclavada. Es va utilitzar el mateix model experimental realitzat anteriorment. Es va esterilitzar l'aigua de riu a l'autoclau, en què es va realitzar la dilució 1/10 del cultiu de *B. adolescentis* incubat a 37°C en condicions d'anaerobiosi durant 48 h en el medi ric RCM. L'estudi de la persistència d'aquest experiment va ser el mateix realitzat en el bloc anterior. Es va efectuar un seguiment de la inactivació *B. adolescentis* “in situ” amb el medi selectiu Beerens i per tècniques moleculars: PCR aniuada específica per espècie i per PCR en temps real.

En la Taula 5.7 es mostren els recomptes de *B. adolescentis* realitzats en aquest assaig amb les diferents tècniques utilitzades: el medi selectiu Beerens, la PCR quantitativa en temps real desenvolupada en aquest treball i la PCR aniuada qualitativa.

Els valors inicials de *B. adolescentis* en tots quatre experiments van estar als voltant de 7,5 unitats logarítmiques d'UFC/100mL tant en el recomptes en el medi Beerens com amb la tècnica de la PCR quantitativa. En les mostres d'hivern (1 i 2) la reducció de dos unitats logarítmiques es va produir cap a les 24 h i 48 h en el medi Beerens. En les mostres d'estiu (3 i 4) es va produir una reducció de quatre unitats logarítmiques aproximadament a les 24 h en el recompte en medi Beerens. En canvi, amb la PCR quantitativa en temps real aquesta reducció en l'experiment 1 es va produir al voltant de les 216 h i en l'experiment 2 cap a les 120 h. En l'experiment 3 i 4 es va detectar aquesta reducció de dos unitats logarítmiques aproximadament a les 144 h. En tots quatre experiments es va detectar sempre la presència *B. adolescentis* per la tècnica de la PCR aniuada específica per aquesta espècie.

Taula 5.7. Recomptes de la *B. adolescentis* DSM 20083^T en els experiments d'inactivació "in situ" en condicions fisico-químiques tant en el medi Beerens com amb la tècnica de la PCR en temps real en els quatre experiments amb aigua de riu estèril. **Beerens:** Recompte de *B. adolescentis* en el medi Beerens (logaritme UFC/100mL). **PCR en temps real:** Recompte de *B. adolescentis* amb la PCR quantitativa (logaritme cèl·lules/100mL). **PCR aniuada:** PCR específica qualitativa per *B. adolescentis*. **ND:** No determinat.

Experiment 1				Experiment 2			
Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada	Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada
0	7,70	7,33	+	0	7,93	7,81	+
24	5,60	6,89	+	24	6,32	6,17	+
48	4,87	6,56	+	48	4,67	6,10	+
72	<10 ³	6,58	+	120	<10 ³	5,84	+
168	<10 ³	6,45	+	144	<10 ³	5,40	+
216	<10 ³	5,80	+	168	<10 ³	<10 ⁴	+
Experiment 3				Experiment 4			
Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada	Temps (h)	Medi Beerens	PCR en temps real	PCR aniuada
0	7,48	7,62	+	0	7,24	7,29	+
24	4,23	6,54	+	24	4,87	6,29	+
48	<10 ³	6,48	+	48	<10 ³	5,78	+
72	<10 ³	6,56	+	72	<10 ³	5,45	+
144	<10 ³	5,15	+	144	<10 ³	5,05	+

En aquest assaig es va realitzar l'estudi de les cinètiques d'inactivació a l'hivern i a l'estiu. En la Figura 5.11 es presenten les dues gràfiques de les cinètiques d'inactivació de *B. adolescentis* en aigua de riu autoclavada analitzades en els quatre experiments. En aquestes gràfiques també estan indicades les rectes de regressió de la inactivació de *B. adolescentis*. Les cinètiques d'inactivació de *B. adolescentis* i les corresponents rectes de regressió lineals realitzades a l'hivern corresponents als experiments 1 i 2. Les dues metodologies analitzades van proporcionar resultats molt diferents com s'ha observat en tots els anàlisis realitzats en aquest capítol. Com s'observa en la gràfica, la cinètica d'inactivació més baixa va correspondre a la tècnica de la PCR en temps real. En l'experiment 1, la pendent de la recta de regressió va ser de 0,006 amb un coeficient de regressió de 0,885 i en l'experiment 2 la pendent va ser de 0,016 amb un coeficient de regressió de 0,775. En canvi, en els experiments 1 i 2 amb la

utilització del medi Beerens aquesta inactivació va ser més elevada, com tots els casos analitzats, les pendents de les rectes van ser de 0,065 i 0,067 respectivament amb uns coeficients de regressió de 0,913 i 0,999. En totes les mostres analitzades amb la tècnica de la PCR aniuada es va detectar la presència de *B. adolescentis*.

En la Figura 5.12 es mostren les cinètiques d'inactivació de *B. adolescentis* corresponents als experiments 3 i 4 a l'estiu. En aquests experiments també es va produir aquesta diferenciació de la persistència de *B. adolescentis* amb les dues metodologies analitzades. A més a més, en tots els casos es va produir un augment de totes les pendents de les rectes de regressió realitzades indicant un descens en la persistència en l'aigua a l'estiu. Com s'observa a la gràfica la cinètica d'inactivació més baixa va correspondre una altra vegada a la tècnica de la PCR en temps real. En els experiments 3 i 4 les pendents de les rectes de regressió van ser de 0,017 i 0,035 respectivament amb uns coeficients de regressió de 0,845 i 0,959. En canvi amb la utilització del medi Beerens les pendents de les rectes van ser de 0,135 i 0,098 amb uns coeficients de regressió de 1.

Figura 5.11. Cinètica d'inactivació de *B. adolescentis* a l'hivern corresponents a l'experiment 1 i 2. Es mostren les diferents rectes de regressió lineal de les diferents metodologies, medi Beerens i PCR quantitativa per a l'enumeració de *B. adolescentis*.

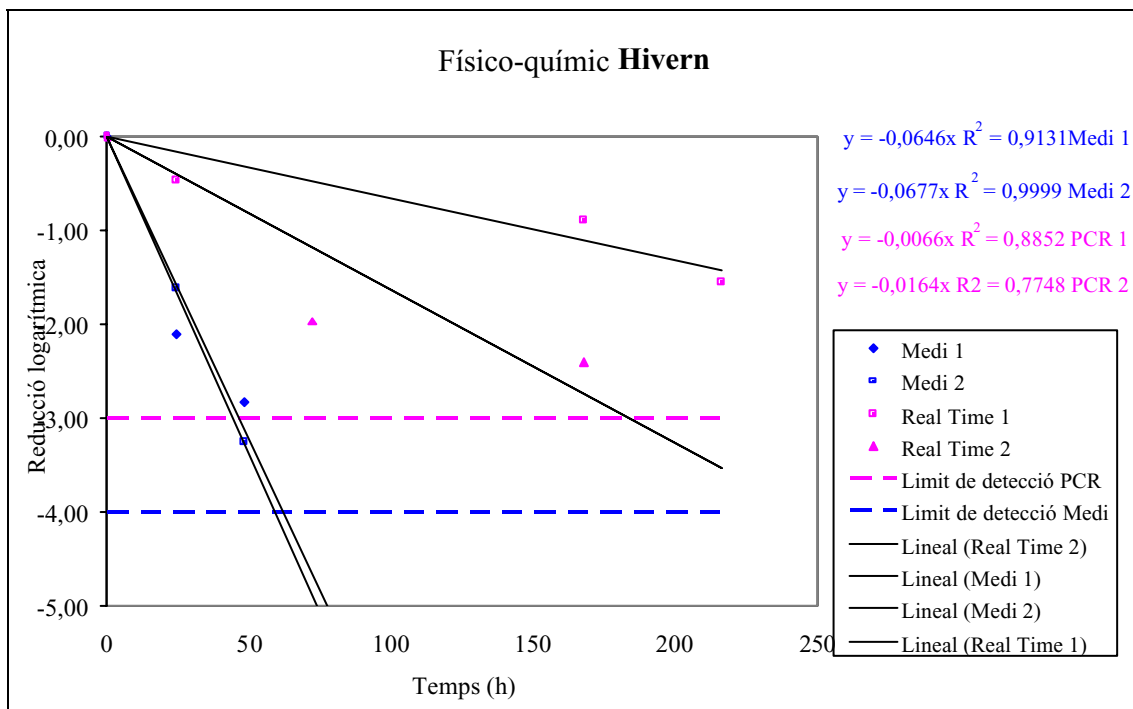
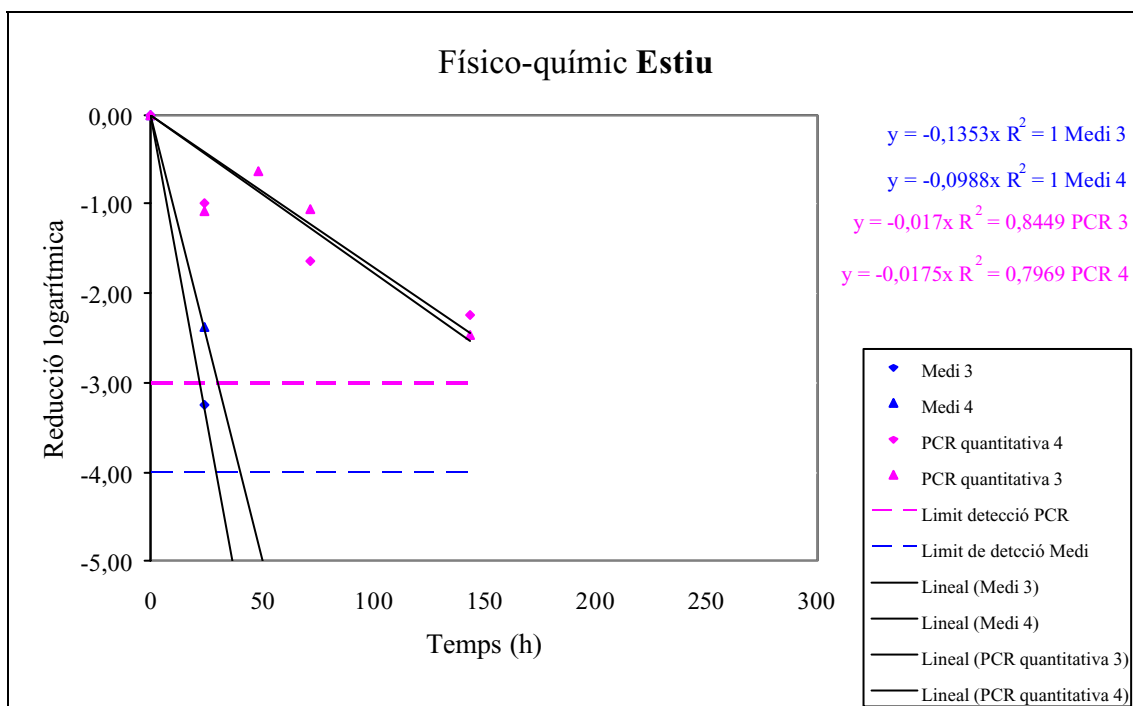


Figura 5.12. Cinètica d'inactivació de *B. adolescentis* a l'estiu corresponents a l'experiment 3 i 4. Es mostren les diferents rectes de regressió lineal de les diferents metodologies, medi Beerens i PCR quantitativa per a l'enumeració de *B. adolescentis*.



A partir de les rectes de regressió obtingudes en les diferents metodologies es van calcular les T_{90} . En la Taula 5.8 es detallen les diferents T_{90} calculades pels quatre experiments.

Taula 5.8. Valors de T_{90} de *B. adolescentis* en aigua de riu esterilitzada amb les dues metodologies en els quatre experiments realitzats. **ADO MA:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 en el medi Beerens en aigua de riu esterilitzada. **ADO PA:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 mitjançant la PCR quantitativa en aigua de riu esterilitzada.

Experiment	T_{90} (h)			
	Hivern		Estiu	
	1	2	3	4
ADO MA	15,47	14,77	7,39	10,12
ADO PA	153,84	60,97	57,11	58,87

Les T_{90} més altes van correspondre en tots els casos als experiments en què es va utilitzar la tècnica de la PCR quantitativa en temps real, tant a l'hivern com a l'estiu com ja s'havia observat en les gràfiques de les cinètiques d'inactivació descrites anteriorment. En els experiments d'hivern (1 i 2) la T_{90} de *B. adolescentis* van ser de 153,84 h i de 60,97 h respectivament, en canvi a l'estiu les T_{90} calculades van ser de 57,11 h i de 58,87 h.

Les T_{90} calculades en el medi Beerens per a les dues espècies analitzades són molt similars. A l'hivern les T_{90} de *B. adolescentis* van ser de 15,47 h i de 14,77 h. Aquests valors comparats amb els obtinguts amb la tècnica de la PCR en temps reals són molt baixos. A l'estiu les T_{90} van tornar a disminuir com els altres casos anteriors, en l'experiment 3 va ser de 7,39 h i en l'experiment 4 de 10,12 h.

5.3.2. Resum final de les T_{90} de les cinètiques d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes analitzades "in situ" en aigua de riu

En aquest últim apartat de resultats d'aquest capítol es recullen totes les T_{90} obtingudes de les diferents poblacions bacterianes i amb les diferents metodologies emprades en l'estudi d'aigua de riu "in situ". En la Taula 5.9 s'observen les mitjanes de totes les T_{90} dels diferents assaigs realitzats en aquests capítol per a les diferents poblacions bacterianes en aigua de riu.

La població bacteriana més resistent ha estat la que correspon a les espores de clostridis sulfit-reductors amb unes T_{90} de 251 h i 284 h a l'estiu i hivern respectivament. Posteriorment, les poblacions més resistents són els enterococs i coliformes fecals amb unes T_{90} de 37-138 h en el cas dels enterococs i de 92-113 h en el cas dels coliformes fecals.

Les poblacions de *Bifidobacterium* van presentar la menor persistència de les poblacions bacterianes estudiades, tant en l'anàlisi mitjançant la PCR quantitativa en temps real com amb les tècniques de cultiu. Les T_{90} de la PCR quantitativa en les dues espècies de *Bifidobacterium* van ser més altes que les obtingudes amb els medis selectius, presenten uns valors aproximats de 41 h a 111 h en les diferents mostres analitzades. Finalment les T_{90} obtingudes amb els diferents medis selectius per a *Bifidobacterium* van presentar la persistència més baixa, amb uns valors aproximats de 7 h a 29 h.

Taula 5.9. Valors de mitjos de les T_{90} de les diferents poblacions bacterianes analitzades en els quatre experiments. **CF:** coliformes fecals **ENT:** enterococs **CL:** clostridis **BT:** bifidobactèries totals **BG:** bifidobactèries fermentadores de sorbitol. **ADO M:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 en el medi Beerens. **ADO P:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 mitjançant la PCR quantitativa. **DEN M:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. dentium* DSM 20084 en el medi Beerens. **DEN P:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. dentium* DSM 20084 mitjançant la PCR quantitativa. **ADO MA:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 en el medi Beerens en aigua de riu esterilitzada. **ADO PA:** Experiment realitzat amb la soca tipus *B. adolescentis* DSM 20083 mitjançant la PCR quantitativa en aigua de riu esterilitzada

Assaig		T_{90} (h)	
		Hivern	Estiu
Bloc A	CF	113	92
	ENT	138	37
	CL	284	251
	BT	29	10
	BG	27	10
Bloc B	ADO M	26	8
	ADO P	111	44
	DEN M	20	7
	DEN P	100	41
Bloc C	ADO MA	15	9
	ADO PA	108	57

5.4. Discussió

Tenint en compte que el gènere *Bifidobacterium* i certes espècies d'aquests gènere com *B. adolescentis* i *B. dentium* es perfilen com uns bons microorganismes indicadors de l'origen de la contaminació fecal en aigües, es fa necessari conèixer el seu comportament envers els diferents fenòmens d'inactivació natural. Per aquesta raó, s'ha realitzat l'estudi ecològic d'aquest gènere en aigua de riu "in situ" juntament amb les poblacions bacterianes descrites com a indicadores de contaminació fecal.

És sabut que en els ambients aquàtics les poblacions microbianes pateixen processos d'inactivació natural i per tant es redueix la càrrega d'aquestes poblacions en l'aigua (Barcina *et al.* 1997; Noble *et al.* 2004). Diferents seminaris en els anys 1960s i 1970s identificaven la importància de la radiació solar com l'agent més important d'inactivació natural i que *E. coli* era més persistent que els coliformes totals (Gameson i Gould 1975). Avui en dia aquesta informació es pren com a certa, però amb certs matisos. La inactivació natural de les poblacions bacterianes en ambients aquàtics és deguda a la suma de diversos factors ambientals complexos que estan molt interrelacionats entre ells i que són molt específics.

Tant en les aigües subterrànies com en les superficials es troben substàncies en dissolució (orgànica o inorgànica), partícules suspeses i organismes vius. Els microorganismes s'associen fortament a la matèria en suspensió, com s'ha comentat en la introducció d'aquest capítol, només una petita part de les poblacions bacterianes es troben en vida lliure en els diferents tipus d'aigües (Leclerc *et al.* 1996).

Els sistemes fluvials són ecosistemes oberts, reben diferents aportos naturals d'altres ecosistemes i de la contaminació fecal d'origen humà i animal. En aquest sentit, és important destacar la tendència de la pròpia natura a restablir l'ordre alterat mitjançant el desenvolupament de processos d'autodepuració a fi de recuperar-se dels aportos autòctons i al·lòctons de matèria orgànica, transformant-la en sals minerals aprofitades pels productors primaris. Així, els fenòmens d'autodepuració i fotoinactivació eliminen la càrrega contaminant de les aigües.

L'autodepuració dels sistemes fluvials naturals involucra una sèrie de fenòmens complexos que impliquen l'adsorció de les bactèries i dels fags als sediments, processos de depredació, de dilució dels microorganismes en l'aigua, d'inactivacions per l'efecte de la temperatura i de la radiació solar. Tots aquests processos afavoreixen a les espècies més resistents o més ben adaptades.

Persistència de les diferents poblacions bacterianes en aigua de riu “in situ” determinada mitjançant sembra en medis selectius

En aquest capítol final s'han aplicat totes les tècniques desenvolupades durant el treball de tesi per a la detecció i quantificació de *Bifidobacterium* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal en aigües. Hi ha pocs treballs de camp en què es determini la supervivència de *Bifidobacterium* en aigües. Per a determinar i poder comparar la supervivència de *Bifidobacterium* “in situ” en aigua de riu amb les altres poblacions bacterianes proposades com a indicadores de contaminació fecal s'ha realitzat un model experimental per a calcular el paràmetre T_{90} de cada una de les poblacions bacterianes i així poder analitzar les diferents inactivacions de les poblacions estudiades (apartat 5.3.2). Aquest és el paràmetre utilitzat en la majoria de treballs de camp per a estudiar les inactivacions naturals “in situ” en aigua. En aquest estudi “in situ” en l'aigua de riu, no es poden controlar tots els paràmetres que afecten a les poblacions bacterianes analitzades, per aquest motiu es pot parlar de “quasiexperiments” perquè no controlem tots els factors ambientals que interaccionen amb les bactèries. En aquest cas, al treballar en una cubeta (on es poden mesurar diferents paràmetres físico-químics), per on transcorre l'aigua del riu amb un flux constant s'han pogut determinar les diferents aportacions de cada d'un dels paràmetres analitzats a les diferents poblacions bacterianes.

El model aplicat en aquest estudi ha estat el model de cinètiques d'inactivació de primer ordre per a poder comparar les diferents inactivacions de les poblacions bacterianes. Aquest model és una aproximació del comportament de les poblacions en el medi ambient, però en el medi ambient aquestes poblacions es comporten de diferent manera, no segueixen un model lineal d'inactivació perquè estan afectades per un gran nombre de factors com s'ha anat comentant al llarg del capítol.

Durant l'estiu va augmentar la temperatura de l'aigua (21,1-25,2°C) respecte la temperatura de l'hivern com a resultat de l'absorció solar per part de l'aigua. La radiació solar diària també va augmentar degut a un augment de la franja horària amb més sol i de la inclinació dels raigs solars. En canvi, la resta de paràmetres físico-químics analitzats, l'oxigen dissolt, el pH, i la conductivitat van presentar unes condicions similars tant en les dades recollides a l'hivern com a l'estiu en la franja horària de mostreig, de les nou del matí a les 10. En aquest cas al recollir les mostres a primera hora del matí, no es va detectar la pujada del pH a les hores puntes de la radiació solar. Aquesta pujada del pH és provocada pel creixement dels microorganismes fotosintètics, l'augment del pH normalment és més pronunciat als mesos d'estiu on la radiació solar és més elevada tan en durada com en intensitat.

Com s'ha comentat en la introducció del capítol l'augment de la temperatura és un dels factors més inactivadors de les bacteries i virus en les aigües ambientals juntament amb la radiació solar. Aquest fet s'ha pogut detectar en els diferents experiments realitzats a l'hivern i a l'estiu. Els anàlisis estadístics realitzats amb el test *t* Student's de les T_{90} de les diferents poblacions bacterianes ens indiquen que hi ha una diferència significativa ($P < 0,05$) de les inactivacions de totes les poblacions bacterianes a l'hivern respecte les inactivacions de l'estiu, període en que són més altes. Aquests resultats estan d'acord amb la gran majoria de treballs d'inactivacions "in situ" en aigües realitzats en diferents microorganismes (Duran *et al.* 2002; Schaper *et al.* 2002; Sinton *et al.* 1994; Sinton *et al.* 1999; Sinton *et al.* 2002; Whitman *et al.* 2004; Yukselen *et al.* 2002).

Les inactivacions de les poblacions bacterianes analitzades en els diferents medis selectius durant l'hivern van mostrar el següent ordre d'inactivació:

CL > ENT > CF > BT = BG = ADO M > DEN M > ADO MA

Major resistència

Menor resistència

Aquesta classificació es deriva de l'estudi de T_{90} mitjanes de les cinètiques d'inactivació de totes les poblacions bacterianes estudiades sobre medis selectius que es detallen a l'apartat 5.3.2 (Taula 5.9).

El gènere *Bifidobacterium* va presentar la taxa de supervivència més baixa respecte la resta de microorganismes analitzats, les T_{90} mitges de l'hivern van ser de 29 i 27 h per a les bifidobactèries totals i les bifidobactèries fermentadores de sorbitol respectivament. Només hi ha un treball descrit que descriu la inactivació natural "in situ" de *Bifidobacterium* en aigües de riu. Estudis realitzats en un riu tropical van comparar la supervivència d' *E. coli* i *Bifidobacterium* en unes cambres de difusió. En aquest estudi es va disposar de dos cultius purs de *B. adolescentis* i d'*E. coli* aïllats de l'aigua residual, a unes concentracions de 10^8 cèl·lules/mL per a cada una de les dues soques. Els cultius es situaven en unes cambres de difusió estèrils en el riu. Posteriorment, van realitzar una sèrie de recomptes cada 12 h fins a les 60 h i van determinar que les densitats de *B. adolescentis* descendien un 50% en 48 h. Per poder comparar aquest estudi amb el realitzat en aquest capítol, s'ha calculat la T_{90} del riu tropical. Aquesta T_{90} va ser de 66 h, és un valor molt superior a la T_{90} obtinguda de les bifidobactèries totals a l'hivern. A més a més, tenint en compte que les T_{90} de l'estiu, que seria l'ambient d'un riu tropical, són encara molt més baixes, aquest resultat no concorda amb els realitzats en aquest estudi. L'explicació d'aquesta T_{90} tant elevada és la utilització del medi NY-6 per a els recomptes de *B. adolescentis*. Com s'ha comentat en el capítol 2, aquest medi presenta molta inespecificitat, que pot produir un creixement de la microbiota acompanyant present en el riu. En aquest cas es pot produir una sobreestimació dels recomptes de *Bifidobacterium* en aquest medi, aquest fet està descrit per diferents autors (Carrillo *et al.* 1985; Resnick i Levin 1981a).

Els assaigs realitzats en aquesta memòria tots els recomptes en medis selectius, HBSA i Beerens, per a les enumeracions de bifidobactèries es va realitzar una confirmació de les colònies crescudes en cada un dels medis amb la tècnica de la hibridació colonial amb la sonda específica Bif. Amb aquesta confirmació es va poder eliminar la sobreestimació que es produeix amb els recomptes realitzats en els diferents medis selectius per a *Bifidobacterium* en aigües.

Encara que no s'han detectat diferències significatives, s'ha observat una major supervivència de les soques ambientals de *Bifidobacterium* respecte les soques tipus incubades al laboratori en els mesos d'hivern. Aquest fet és d'esperar ja que les soques ambientals estan més adaptades a viure en unes condicions desfavorables que no pas les soques incubades al laboratori on les condicions de creixement són les òptimes. Al dipositar aquestes cèl·lules al riu amb les membranes de diàlisis pateixen un estrès més intens per què provenen d'un estat òptim de creixement i han de canviar tota l'activitat metabòlica per a condicionar-se a les noves condicions adverses. Per aquest motiu la supervivència en l'aigua de riu és més baixa, en canvi, les cèl·lules provinents de l'aigua residual presenten una menor regulació del metabolisme ja que en tot moment estan en unes condicions d'estrès.

L'anàlisi dels indicadors de contaminació fecal coincideix amb altres estudis d'inactivació natural en aigües. Estudis realitzats en el mateix riu Llobregat i en la mateixa cubeta físico-química on es compara la supervivència de diferents fags amb els microorganismes indicadors de contaminació fecal, van observar que les espores de clostridis sulfít-reductors presentaven una major supervivència en l'aigua de riu, seguides dels enterococs i dels coliformes fecals a l'hivern (Duran *et al.* 2002). En l'anàlisi de les mostres en aquest capítol s'observa que els enterococs tenen una persistència major als coliformes fecals, i que tots dos grups necessiten d'un major temps d'inactivació (138 i 113 h respectivament) que no pas les diferents poblacions bacterianes de *Bifidobacterium*. Aquesta major persistència dels enterococs respecte els coliformes fecals en aigües fredes, és a dir en els mesos d'hivern, està corroborada per varis estudis: estudis d'inactivació on també es comparava la diferent persistència dels indicadors microbians de contaminació fecal respecte els fags provinents d'aigües residuals i aigües superficials en aigües de mar (Sinton *et al.* 2002). En l'anàlisi de l'aigua residual, que seria el mateix cas descrit en aquest capítol, la T_{90} dels enterococs va ser de 12,6 h respecte les 7,7 h dels coliformes fecals. Aquestes T_{90} són molt més baixes a les obtingudes en aquest treball perquè els estudis d'inactivació es van realitzar en aigua de mar on les condicions són molt més desfavorables que no pas en un riu. Altres treballs també observen una persistència major dels enterococs on es descriu una T_{90} de 121,2 h pels coliformes fecals i de 177,1 h pels enterococs en aigües superficials (Noble *et al.* 2004).

Les inactivacions de les poblacions bacterianes analitzades en els diferents medis selectius durant l'estiu van mostrar el següent ordre d'inactivació:

CL > CF > ENT > BT ~ BG = ADO MA = ADO M = DEN M

Major resistència

Menor resistència

Aquesta classificació també es deriva de l'estudi de T_{90} mitjanes de les cinètiques d'inactivació de totes les poblacions bacterianes estudiades sobre medis selectius que es detallen a l'apartat 5.3.2 (Taula 5.9).

Tots els indicadors s'inactiven més ràpidament durant l'estiu, degut sobretot a les diferents característiques de l'aigua en les dues estacions (temperatura i radiació solar) de manera que la inactivació es presenta com un fenomen integrat, degut possiblement a fenòmens de fotoxidació generats per la radiació solar i la matèria orgànica i catalitzats per l'oxigen (Duran *et al.* 2002; Sinton *et al.* 2002). L'efecte de l'oxigen dissolt en l'aigua en aquest estudi no es va poder detectar perquè no es detecten diferències significatives de les concentracions d'oxigen dissolt en l'aigua a l'hivern i a l'estiu en les hores registrades. Altres estudis tampoc han detectat una correlació entre l'oxigen dissolt i la inactivació dels diferents indicadors microbians (Sinton *et al.* 1999). Per aquest motiu podem afirmar que els principals factors d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes en aquest treball han estat la temperatura i la llum solar, però no factors únics. Com s'ha comentat en la introducció del capítol la inactivació natural per processos biològics com la depredació per part de protozous tampoc es pot menysprear. La inactivació natural dels microorganismes en aigües depèn de la suma de tots els factors ambientals. Altres autors, però afirmen que només la temperatura és el factor predominant d'inactivació de les bactèries en aigües (Yukselen *et al.* 2002).

Les tendències d'inactivació es mantenen entre els microorganismes indicadors tradicionals i les poblacions bacterianes de *Bifidobacterium*. Tot i així, hi ha variats canvis respecte les inactivacions observades a l'hivern. A l'estiu la persistència dels coliformes fecals ha estat més elevada que la dels enterococs, la T_{90} ha estat aproximadament de 92 h mentre que la T_{90} dels enterococs ha estat de 37 h. Aquesta major inactivació dels enterococs a l'estiu respecte els coliformes fecals també s'ha detectat en altres estudis (Noble *et al.* 2004). La influència de la radiació solar és més important en el grup d'enterococs que no pas en els coliformes fecals. Tot i així, la gran part de treballs detecten una major resistència dels enterococs a l'estiu. Aquest fet és degut a què les inactivacions de les poblacions bacterianes és una suma de factors ambientals. En aquests cas és senzillament degut a la paret cel·lular. Els enterococs són Gram positius amb paret cel·lular molt més gruixuda que no pas la dels coliformes fecals que són Gram negatius, la paret cel·lular d'aquests és molt més fina i per tant són més susceptibles a la depredació de microorganismes que no pas els enterococs. Amb l'augment de la temperatura l'activitat dels microorganismes també augmenta, i per tant la depredació dels microorganismes també augmenta respecte temperatures fredes, com és el cas de l'hivern.

Les poblacions de bifidobactèries han presentat unes inactivacions molt elevades. Les diferències d'inactivacions respecte l'hivern s'han reduït fins el punt que totes les poblacions de *Bifidobacterium*, ja siguin de mostres naturals o soques tipus de col·lecció presenten unes inactivacions iguals.

No es van detectar diferències significatives en la persistència de la soca tipus de *B. adolescentis* entre l'aigua de riu autoclavada i l'aigua de riu natural, en contra del que s'esperava (Herman 1972; Flint 1987). La inactivació de la soca estudiada per processos naturals va ser aproximadament del mateix ordre que la inactivació en l'aigua autoclavada. Les T_{90} en tots dos casos van rondar de les 8 h a l'estiu i de 15-26 h hores a l'hivern. Aquesta inactivació per processos naturals s'hauria d'haver incrementat a l'estiu, ja que amb l'augment de la temperatura augmenta l'activitat dels microorganismes. En conseqüència, l'acció de la depredació per part dels protozous, fags i bacteries també augmenta, i els processos de competència entre les pròpies bacteries pels recursos augmenten. Tots aquests factors influeixen negativament en la

supervivència de les bactèries en aigües amb unes temperatures elevades en condicions naturals. En canvi, a temperatures altes, en una aigua autoclavada aquesta reducció no hauria de ser tant pronunciada com en aigües naturals ja que els factors mencionats anteriorment no interaccionen.

Detecció de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* per PCR múltiple ADO-DEN

La detecció de les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* en l'aigua residual diluïda en aigua riu mitjançant la tècnica de la PCR múltiple ADO-DEN ha estat eficaç en tres dels quatre experiments per a l'espècie *B. adolescentis*. En canvi, la presència de *B. dentium* no va ser detectada en cap dels quatre experiments. Aquest fet es d'esperar, ja que com s'ha comentat en els capítols anteriors la presència de *B. dentium* en l'ambient és més reduïda que no la de *B. adolescentis*. Encara que en el capítol 3 es detectessin 10 mostres de 12 d'aquesta espècie, en aquests experiments d'inactivacions de poblacions bacterianes d'aigües residuals en aigua de riu (bloc A) es van realitzar una dilució 1/50 de l'aigua residual i per tant la reducció de la concentració d'aquesta espècie en la mostra fa que estigui per sota del llindar de detecció de la PCR múltiple ADO-DEN i que no es pugui detectar. En l'experiment 1, es va detectar *B. adolescentis* fins a les 72 h aproximadament. Va ser l'experiment on es va detectar una inactivació menor d'aquesta espècie mitjançant aquesta tècnica. Aquesta dada s'explica per que va ser l'experiment on les condicions ambientals van ser favorables per la persistència de les diferents poblacions bacterianes, les temperatures del riu van ser molt baixes, van estar entre 4°C - 8°C i durant les dues setmanes de mostreig va ploure, per tant la irradiació solar també va ser baixa.

La detecció de *B. adolescentis* en els assaigs dels blocs B i C va ser satisfactòria en tots els casos. En l'estudi de la inactivació d'aquesta espècie en l'aigua de riu (bloc B) es va detectar aquesta espècie en totes les mostres, tant les de l'hivern fins a les 240 h i 264 h aproximadament, en els experiments 1 i 2, i a l'estiu fins a les 192 h en els dos experiments. En el bloc C on l'aigua de riu estava autoclavada *B. adolescentis* també va ser detectada fins a les 216 h i 168 h en els experiments 1 i 2 de l'hivern i fins a les 144 h en els altres experiments de l'estiu. En aquests casos es va detectar sempre *B.*

adolescentis per que la concentració inicial va ser molt elevada, al voltant de 7 unitats logarítmiques per 100 mL. En els casos de l'estiu si s'hagués pogut seguir l'anàlisi (no es va seguir perquè les membranes de diàlisi es degradaven molt més aviat que no pas a l'hivern) sí que s'hagués pogut detectar un descens d'aquesta espècie mitjançant la tècnica de la PCR aniuada.

La detecció de *B. dentium* també va ser satisfactòria en tots els casos en els assaigs dels blocs B i C. En aquest cas, les dues espècies van presentar un comportament molt similar, això és degut a que les concentracions inicials de les dues espècies eren molt similars, al voltant de 7 unitats logarítmiques per 100 mL, i no com en les aigües ambientals on la concentració de *B. dentium* és molt més baixa. Per tant podem afirmar que les dues espècies presenten unes persistències similars, no hi ha diferències significatives ($P > 0,05$). En l'estudi de la inactivació d'aquesta espècie en l'aigua de riu (bloc B) es va detectar aquesta espècie en totes les mostres, tant les de l'hivern fins a les 240 h i 264 h en els experiments 1 i 2, i a l'estiu fins a les 192 h en els dos experiments, igual que l'espècie de *B. adolescentis*. En els casos de l'estiu si s'hagués pogut seguir l'anàlisi, també s'hagués pogut detectar un descens d'aquesta espècie mitjançant la tècnica de la PCR aniuada.

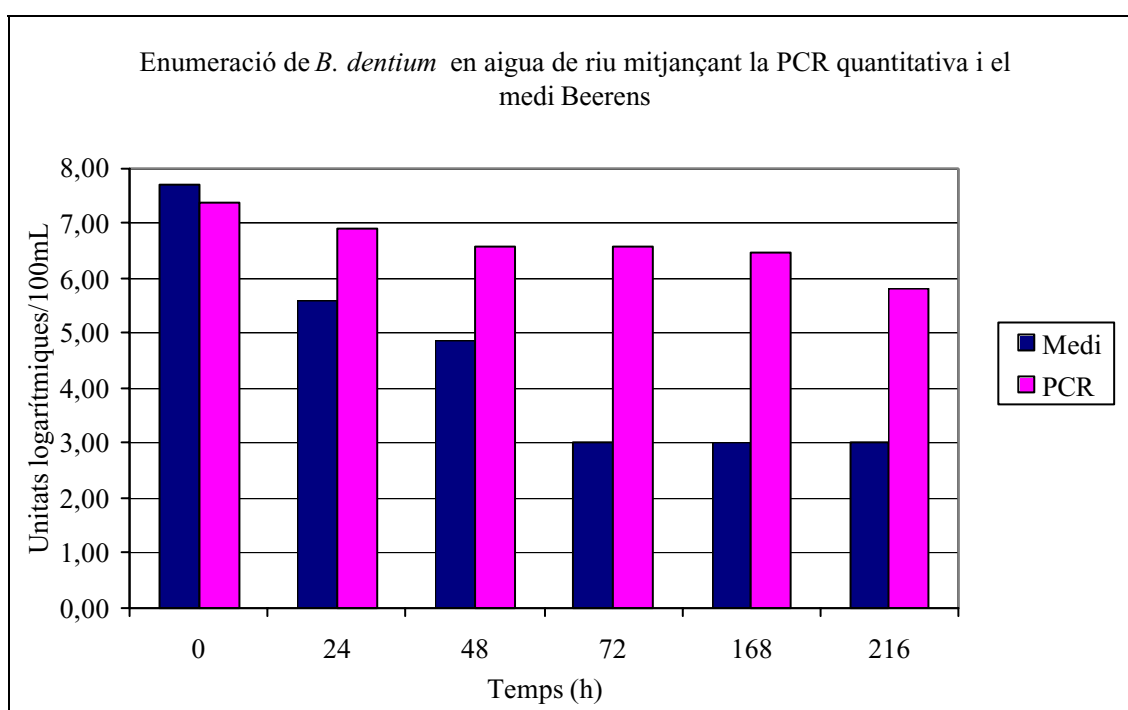
Persistència de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* mitjançant la PCR quantitativa en temps real i en medis selectius per a *Bifidobacterium*

Les persistències de les dues espècies de *Bifidobacterium* en l'aigua de riu amb aquestes dues tècniques utilitzades van mostrar unes diferències significatives ($P < 0,05$). Aquest fet és d'esperar per que amb els medis selectius només podem quantificar les cèl·lules viables mentre que amb la tècnica de la PCR quantitativa detectem tots els microorganismes independentment del seu estat. Ara bé, aquestes dues tècniques quan les cèl·lules estan actives i viables, no pateixen cap tipus d'estrès ambiental, quantifiquen de la mateixa manera. Enriquiments de mostres ambientals d'aigua de mar per quantificar l'espècie *V. vulnificus* presenten unes enumeracions molt similars amb les dues tècniques (Panicker *et al.* 2004), en aquest cas totes les cèl·lules de la mostra

han estat en un cultiu ric que ha permès reactivar les cèl·lules de la mostra, d'aquesta manera totes les cèl·lules poden créixer en el medi selectiu corresponent. Aquest fet també es dona en els recomptes de cultius purs en medis rics, a l'estar totes les cèl·lules viables, i en unes condicions de creixement òptimes, els recomptes en medis i amb la tècnica de la PCR quantitativa en temps real són molt similars, fins i tot, els recomptes amb medis de cultiu les enumeracions són una mica més elevades (Matsuki *et al.* 2004; Requena *et al.* 2002). Els recomptes de bifidobactèries en productes làctics amb les dues tècniques també donen resultats molt similars, amb unes enumeracions una mica superiors amb la utilització de medi (Vitali *et al.* 2003), per que en aquest cas les cèl·lules també estan en unes condicions òptimes, i poden créixer en els medis de cultiu. Per contra, quan es realitzen estudis ambientals on les cèl·lules estan sotmeses a unes condicions desfavorables, els recomptes amb aquestes dues tècniques varien molt (Huijsdens *et al.* 2002; Izhar *et al.* 2003). Com s'ha comentat en el capítol 4, els recomptes de les bactèries de la mucosa gastrointestinal amb les dues tècniques van mostrar una diferència de fins a tres unitats logarítmiques superiors amb la tècnica de la PCR que no pas amb els recomptes amb medis rics, en aquest cas varies de les cèl·lules de la mucosa no estan en unes condicions òptimes de creixement. Segons aquest estudi un gran percentatge de les cèl·lules adherides a la mucosa intestinal estan mortes o en un estat de VBNC (Huijsdens *et al.* 2002). Un altre estudi a nivell ambiental on es comparen els recomptes de *Mycobacterium* i *Pseudomonas* en fluids de residus metàl·lics, mostra que els recomptes en medis selectius per aquestes dues espècies en quasi totes les diferents mostres van ser nuls, en canvi els recomptes amb la PCR quantitativa van detectar entre 2 i 5 unitats logarítmiques de cada una de les dues espècies (Izhar *et al.* 2003).

En aquest treball s'han detectat totes les condicions possibles de l'estat d'una cèl·lula. Com es pot observar en la Figura 5.13 els recomptes inicials de la soca *B. dentium* DSM 20084^T del cultiu incubat al laboratori en unes condicions òptimes amb les dues metodologies són molt similars, al voltant dels 7,5 unitats logarítmiques. En aquest punt inicial de l'experiment totes les cèl·lules són viables, per tant, com s'ha comentat anteriorment, els recomptes són molt similars i fins i tot el recompte amb el medi selectiu Beerens és més elevat. A mesura que augmenta el temps d'exposició de la soca en el medi ambient, és a dir, que les condicions ambientals són més desfavorables, la distància entre els recomptes amb la tècnica de la PCR quantitativa en temps real i els recomptes amb el medi Beerens augmenten (Figura 5.13).

Figura 5.13. Recomptes de *B. dentium* en un dels experiments d'inactivació "in situ" en aigua de riu contaminada artificialment tant en el medi Beerens com amb la tècnica de la PCR en temps real. **Medi:** Recompte de *B. dentium* en el medi Beerens (unitats logarítmiques UFC/100mL). **PCR:** Recompte de *B. dentium* amb la PCR quantitativa específica (unitats logarítmiques cèl·lules/100mL).



A les 72 h amb el medi Beerens no es pot quantificar la mostra, el límit de detecció del medi està en les 3 unitats logarítmiques UFC per 100mL. En canvi, amb la tècnica de la PCR quantitativa en temps real es segueix quantificant la mostra, tot i que el límit de detecció d'aquesta tècnica és una unitat logarítmica superior a la del medi. En aquest cas es realitza una quantificació de la mostra fins a les 216 h.

Per tant, amb aquestes dues tècniques, es detecten unes inactivacions diferents per al mateix microorganisme. Les T_{90} de *B. adolescentis* i *B. dentium* amb les dues tècniques van ser estadísticament diferents ($P < 0,01$). Per tant en aquest estudi s'ha determinat el rang de supervivència de les espècies de *B. adolescentis* i *B. dentium* mitjançant el paràmetre T_{90} en aigua de riu. En un extrem trobaríem la T_{90} obtinguda amb el medi Beerens corresponent a les cèl·lules viables de la mostra, i a l'altre extrem trobaríem la T_{90} obtinguda amb la PCR quantitativa en temps real que correspon a totes les cèl·lules, tant les cèl·lules viables, com les cèl·lules en estat VBNC, i les cèl·lules mortes. En aquest cas, també s'inclou tot el material genètic de les dues espècies de les cèl·lules degradades. En aquest cas, el rang de les T_{90} de *B. adolescentis* en aigua de riu a l'hivern va ser de 26 h a 130 h.

Conclusions

1. Els medis selectius analitzats per a *Bifidobacterium*, Beerens, HBSA i BFM, van presentar unes enumeracions molt similars en aigües residuals, proporcionant una elevada especificitat per a les bifidobactèries. No obstant, el medi Beerens i HBSA van recuperar un nombre significativament igual i més elevat de bifidobactèries cultivables.
2. La hibridació colonial amb la sonda Bif permet una confirmació pràctica de les enumeracions, donant una correcció de la fracció de creixement no específic que donen el medis utilitzats.
3. La proporció de les colònies de *Bifidobacterium* fermentadores de sorbitol respecte el nombre de colònies totals crescudes en el medi HBSA és una eina eficaç per a la determinació de l'origen de la contaminació fecal.
4. Les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* van presentar una elevada especificitat per a les aigües d'origen humà, tot i que no es pot descartar la presència de *B. adolescentis* en alguna espècie d'aviram.
5. El desenvolupament de la PCR múltiple ADO-DEN per a les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* és una eina molecular complementària per a caracteritzar l'origen de la contaminació fecal en aigües. Presenta un llindar de detecció 10^3 UCF/100mL.
6. L'ús combinat de la PCR múltiple ADO-DEN amb la proporció de les bifidobactèries fermentadores de sorbitol i bifidobactèries totals en el medi HBSA proporciona una determinació més contrastada de l'origen de la contaminació fecal en aigües que l'ús separat de les dues tècniques.
7. Les PCRs quantitatives específiques desenvolupades permeten la quantificació de les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* proposades com a indicadors de la contaminació fecal humana en aigües residuals d'origen humà. Aquesta tècnica presenta un llindar de detecció més alt que la de la PCR múltiple ADO-DEN

essent de 10^4 UCF/100mL.

8. Hi ha una diferencia significativa ($P < 0,05$) en les inactivacions de totes les poblacions bacterianes a l'estiu respecte les inactivacions a l'hivern on són més baixes. L'ordre de persistències de les diferents poblacions analitzades en aigua de riu "in situ" en els diferents medis selectius a l'estiu va variar essent de major a menor: les espores de clostridis de sulfit-reductors, els coliformes fecals, els enterococs, i finalment les diferents poblacions de bifidobactèries. A l'hivern aquest ordre de persistències va variar només entre els coliformes fecals i els enterococs, aquests últims van presentar una persistència més gran que no pas el coliformes.
9. No es van observar diferències significatives entre les persistències de les soques tipus i les soques ambientals de *Bifidobacterium*, tot i que les persistències de les soques ambientals van ser més elevades.
10. No es van observar diferències significatives entre les persistències de l'espècie de *B. adolescentis* en aigua natural i en aigua autoclavada.
11. Les tècniques de la PCR quantitativa desenvolupada en aquest treball per les espècies *B. adolescentis* i *B. dentium* permet el seguiment de la seva persistència en l'entorn quan les cèl·lules deixen de ser cultivables en els medis selectius. No obstant, no faciliten informació sobre la seva viabilitat.
12. El gènere *Bifidobacterium* és potencialment un bon indicador de l'origen de la contaminació fecal recent en aigües. La seva baixa persistència en l'entorn fa però menys operatiu el seu ús quan la contaminació fecal és remota en el temps.

Annex I

DETERMINACIONS BACTERIOLÒGIQUES
--

TÈCNICA DE FILTRACIÓ EN MEMBRANA PER A LA DETERMINACIÓ DE BACTÈRIES

OBJECTIU

Retenir les bactèries sobre una membrana de 0,45 µm de diàmetre de porus i fer-los créixer damunt medis de cultiu per tal d'obtenir un recompte de bactèries en un volum determinat de mostra.

PROCEDIMENT

- Seleccionar el volum de mostra a analitzar.
- Filtrar la mostra. Amb unes pinces esterilitzades a la flama es col·loca la membrana de 0,45 µm de diàmetre de porus i 47 mm de diàmetre d'èsters de cel·lulosa (HAWG 047 00, Millipore) sobre el portafiltres de la rampa de filtració, la qual es troba connectada a l'aixeta d'aigua corrent a través de la trompa de buit. Col·locar damunt l'embut, assegurant-se que no hi hagi pèrdues. Filtrar la mostra intentant que aquesta quedi uniformement distribuïda damunt el filtre. Quan s'han de filtrar volums de mostra inferiors als 10 mL és recomana afegir solució estèril isotònica (PBS o Ringer ¼) a la mostra per tal de tenir un volum mínim de 10 mL.
- Transferir el filtre cara a munt a una placa de Petri que contingui el medi sòlid adient per al cultiu del microorganisme que es vol testar.
- Incubar les plaques cara avall a la temperatura indicada el temps necessari per al creixement del microorganisme a estudi.
- Realitzar el recompte de les colònies que han crescut damunt el filtre que compleixin amb les característiques del microorganisme a estudi.
- En funció del volum de mostra analitzat realitzar els càlculs necessaris per tal d'expressar els resultats en ufc per 100 mL.

DETERMINACIÓ DE COLIFORMES FECALS

OBJECTIU

Detecció i recompte de coliformes termotolerants entenent com a coliformes aquelles bacteries Gram negatives, no formadores d'espores, oxidasa negatiu, anaeròbiques facultatives que fermenten la lactosa (activitat β -galactosidasa) amb producció d'àcid i gas en (21 ± 3) hores. Són termotolerants ja que a més de reunir aquestes condicions ho fan creixent a $(44,5 \pm 0,2)$ °C. Coneguts com a coliformes fecals pel seu paper com a indicadors de contaminació fecal.

PROCEDIMENT

- Després de concentrar el volum de mostra necessari per a cada anàlisi aplicant la tècnica de filtració en membrana disposar la membrana sobre plaques amb medi mFC i incubar les plaques en posició invertida a $(44,5 \pm 0,2)$ °C durant (21 ± 3) hores.
- Comptar les colònies que creixen damunt el filtre i que mostren coloració blava corresponents als coliformes fecals. Les colònies de coliformes no fecals que creixen en medi mFC presenten color gris o crema.

m FC Agar

- | | |
|-----------------------------|---------|
| - m FC Agar (267720, Difco) | 52 g |
| - àcid rosòlic 1% | 10 mL |
| - Aigua destil·lada | 1000 mL |

Ressuspendre per agitació el mFC agar i escalfar-lo fins a l'ebullició. Mantenir l'ebullició durant 1 minut per tal que es dissolgui completament i en aquest moment afegir l'àcid rosòlic. Mantenir l'agitació i l'ebullició durant 1 minut més. El medi així preparat és estable a (5 ± 3) °C durant 30 dies.

Solució d'àcid rosòlic 1%

- | | |
|---|-------|
| - Àcid rosòlic (Bacto Rosolic Acid, 3228-09-1, Difco) | 0,1 g |
| - NaOH 0,2 M | 10 mL |

Afegir l'àcid rosòlic a la solució de NaOH i dissoldre per agitació.

DETERMINACIÓ D'ENTEROCOCS FECALS

OBJECTIU

Detecció i recompte d'enterococs fecals que es caracteritzen per ésser bacteries Gram positives, no esporulades, catalasa negatives amb capacitat per fermentar la glucosa amb producció d'àcid a (36 ± 2) °C en (21 ± 3) hores. Els enterococs són un subgrup dels estreptococs que es caracteritzen per la capacitat de créixer a pH 9,6 amb NaCl 6,5%. Poden créixer a 10°C i a 45°C, resisteixen temperatures de 60°C durant 30 minuts i tenen la capacitat de reduir un 0,1% de blau de metilè. Els enterococs fecals, a més de complir aquestes característiques hidrolitzen l'esculina produint dihidroxi-6,7-cumarina.

PROCEDIMENT

- Després de concentrar el volum de mostra necessari per a cada anàlisi aplicant la tècnica de filtració en membrana disposar la membrana sobre plaques amb medi m Enterococcus Agar i incubar les plaques en posició invertida a (36 ± 2) °C durant (44 ± 4) hores.
- Les colònies d'enterococs damunt el medi mEnterococcus presenten una coloració vermell fosc. Transferir les membranes en les que hagin crescut colònies damunt el filtre a plaques que continguin medi Bilis Esculina i incubar de nou a $(44,5 \pm 0,5)$ °C durant de 3 a 4 hores. Les colònies corresponents a enterococs fecals adquireixen una coloració fosca per la hidròlisi de l'esculina i la combinació del producte d'aquesta reacció amb els ions ferro (III) del medi.

m Enterococcus Agar

- m Enterococcus Agar (274620, Difco) 42 g
- Aigua destil·lada 1000 mL

Ressuspendre per agitació el mEnterococcus Agar escalfant-lo fins a l'ebullició. Mantenir l'ebullició durant 1 minut per tal que es dissolgui completament. Refredar fins a 50 °C aproximadament i dispensar immediatament a les plaques. El medi així preparat és estable a (5 ± 3) °C durant 30 dies.

Agar Bilis Esculina

- Bile Esculin Agar (287920, Difco) 64 g
- Aigua destil·lada 1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. El medi així preparat és estable a (5 ± 3) °C durant 30 dies.

DETERMINACIÓ D'ESPORES DE CLOSTRIDIS SULFITO-REDUCTORS

OBJECTIU

Detecció i recompte d'espores de clostridis sulfit-reductors mitjançant la tècnica d'inòcul en massa. Els clostridis són bacils Gram positius, anaeròbics estrictes capaços de produir espores, que pertanyen al gènere *Clostridium*.

PROCEDIMENT

- Selecció del volum de mostra a analitzar i disposar-lo en tubs estèrils de 50 mL de capacitat.
- Ajustar el volum de la mostra a 25 mL amb aigua destil·lada estèril.
- Realitzar el xoc tèrmic a 80°C durant 10 minuts per tal de destruir les formes vegetatives del bacteri i activar la germinació de les espores.
- Deixar refredar les mostres a temperatura ambient i afegir l'agar SPS 2x temperat a 55°C (25 mL aproximadament deixant el mínim d'aire possible). Agitar per inversió un parell de vegades.
- Deixar solidificar a temperatura ambient i incubar els tubs a $(44,5 \pm 0,2)$ °C durant (21 ± 3) hores.
- Recompte de les colònies negres que es trobin dins l'agar. El color negre de les colònies es deu a la reducció del sulfit i la precipitació del sulfur de ferro.

SPS Agar

- SPS Agar (01-050, Scharlau) 41,3 g
- Aigua destil·lada 1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts.

DETERMINACIÓ DE MICROORGANISMES ANEROBIS A 37°C

OBJECTIU

Detectar i enumerar els microorganismes heterotrofs presents en una mostra.

PROCEDIMENT

- Preparar les dilucions de la mostra emprant com a diluent una solució isotònica per als bacteries (Ringer ¼).
- Aplicar el mètode de sembra de les diferents dilucions a testar i dipositar els filtres damunt plaques de medi ric (sCBA).
- Incubar les plaques a (36 ± 2) °C durant 48 hores.
- Passat el període d'incubació realitzar el recompte de totes les colònies que han crescut damunt el medi.

sCBA (Columbia Blood Agar suplementat)

Medi basat en el medi Columbia Blood Agar (Difco, Detroit, Mich.).

Medi Columbia Blood Agar	44,0 g
Glucosa	5,0 g
L-cisteïna-HCl	0,5 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Barrejar tots los components i esterilitzar en el autoclau i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts.

RCM (Reinforced Clostridial Medium)

- RCM (Oxoid, Hampshire, Anglaterra) 30 g
- Aigua destil·lada 1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. Dispensar en tubs de 20 mL. La solució és estable a (5 ± 3) °C durant 30 dies.

DETERMINACIÓ DELS MICROORGANISMES DE *BIFIDOBACTERIUM*

HBSA (Human *Bifidobacterium* Sorbitol Agar)

Medi selectiu i diferencial per a la recuperació de *Bifidobacterium* en mostres fecals i mostres d'aigües (Mara i Oragui 1983).

	g/L
Sorbitol	10,0
Polipeptona	10,0
Extracte de llevat	20,0
Clorur de sodi	3,2
Bromocresol de porpra	0,1
Casaminoàcids	8,0
Aigua destil·lada	1000mL

1. Bullir la solució amb 1 litre d'aigua destil·lada durant 10 minuts.
2. Afegir àcid naldíxic a 30 mg/L i cisteïna a 0,40 g/L.
3. Ajustar el pH 6,9 amb NaOH 1M.
4. Afegir 15 g/L d'agar, i esterilitzar a l'autoclau a 121°C durant 15 min.
5. Després d'esterilitzar el medi afegir 10 IU polimixina B i 50 µg/mL de sulfat kanamicina en condicions estèrils.

BFM (*Bifidobacterium* medium)

Medi selectiu per a la quantificació de *Bifidobacterium* en mostres d'aigües ambientals i productes làctics (Nebra i Blanch 1999).

	g/L
Extracte de carn	2,0
Extracte de llevat	7,0
Midó	2,0
L-cisteïna-HCl	0,5
Clorur de sodi	5,0
Peptona	5,0
Triptona	2,0
Lactulosa	5,0
Riboflavina	1mg
Tiamina	1mg
Blau de metilè	16mg
Clorur de liti	2,0
Àcid propiònic 99%	5mL
H ₂ O destil·lada	1000mL

El mètode de preparació és el següent: barrejar tots els components exceptuant l'àcid propiònic i resuspendre-ho en aigua destil·lada. El medi s'esterilitza a l'autoclau a 121°C durant 15 minuts. Es deixa refredar fins a 55°C i s'hi afegeix l'àcid propiònic, i s'ajusta el pH a 5,5 amb NaOH 10M estèril.

Beerens Agar

Medi descrit para el aïllament selectiu del gènere *Bifidobacterium* (Beerens 1990). Basat en el medi Columbia Blood Agar (Difco, Detroit, Mich.).

	g/L
Medi Columbia Blood Agar	44,0
Glucosa	5,0
L-cisteïna-HCl	0,5
Àcid propiònic (99%)	5 ml
Aigua destil·lada	1000 ml

Barrejar tots los components, excepte l'àcid propiònic, i esterilitzar en el autoclau a 121°C durant 15 min. Un cop refredat a 55°C, afegir l'àcid propiònic i ajustar el pH a 5,0 amb NaOH.

DILUENTS

Ringer 1/4

- Ringer	2,5 g
- Aigua destil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació y esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 15 minuts. La solució és estable a temperatura ambient durant 6 mesos.

Annex II

ANÀLISI DE L'ADN. ELECTROFORESI EN GEL D'AGAROSA

OBJECTIU

Permetre la visualització dels fragments d'ADN per tal de poder-ne fer l'anàlisi corresponent en els diferents estudis.

PROCEDIMENT

Preparar el gel dissolent la quantitat d'agarosa (Agarosa grau biologia molecular, GK-AME-250, Genotek) necessària en TBE 1x (Annex II).

Escalfar la barreja amb l'ajuda d'un microones fins al grau d'ebullició agitant de tant en tant per tal que quedi una suspensió homogènia.

Deixar refredar a temperatura ambient fins a 50-55°C aproximadament i disposar la solució en una safata de metacrilat on s'afegirà una pinta per tal que es produeixi la formació dels pous de càrrega.

Un cop solidificat el gel dipositar la safata dins una cubeta d'electroforesi amb tampó TBE 1x de manera que el tampó cobreixi completament el gel.

Procedir amb la càrrega de les mostres;

Barrejar el volum de solució d'ADN a analitzar amb el tampó de càrrega (Annex II) i dipositar la barreja resultant amb l'ajuda d'una micropipeta a l'interior dels pous.

Reservar un dels pous per carregar un marcador de pesos moleculars. Cal diluir la quantitat de marcador necessària especificada pel fabricant en aigua bidestil·lada estèril abans de barrejar-lo amb el tampó de càrrega i dipositar-lo dins el pou del gel d'agarosa.

Iniciar l'electroforesi aplicant el voltatge i temps necessaris a la cubeta d'electroforesi on es te el gel d'agarosa. El gel ha de quedar totalment cobert pel tampó TBE 1x.

Un cop finalitzada l'electroforesi submergir el gel en una solució de bromur d'etidi (Annex 2) durant 15-20 minuts.

Recuperar el gel i fer-ne l'observació en un transil·luminador de llum ultravioleta per tal de visualitzar les bandes corresponents a l'ADN.

TBE 10 ×

- Tris base (A2264, AppliChem)	109 g
- àcid bòric (203667, Calbiochem)	55,6 g
- EDTA (Titrplex® III, 1.08418.1000 Merck)	92 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació en 400 mL d'aigua bidestil·lada. Ajustar el pH a 8,3 amb NaOH 1M. Ajustar a un volum final de 1 litre amb aigua bidestil·lada. Esterilitzar a (121 ± 3 °C) durant 20 minuts.

TBE 1 ×

A partir de la solució concentrada de TBE 10 × dissoldre 1:10 (v:v) la solució de TBE 10 × en aigua bidestil·lada estèril. Dissoldre per agitació. Cal preparar la solució immediatament abans de la seva utilització.

Tampó de càrrega

- Solució de sacarosa 40%	
- Sacarosa (5476, Merck)	40 g
- Aigua destil·lada	100 mL
- Blau de bromofenol (12370, US Biochemical Corp.)	250 mg

Dissoldre per agitació. La solució és estable a (5 ± 3) °C.

Bromur d'Etidi 1%

- Bromur d'Etidi (A1151, AppliChem) 1 g
- Aigua bidestil·lada 100 mL

Dissoldre per agitació. Mantenir la solució a (5 ± 3) °C protegida de la llum. En aquestes condicions és estable durant llargs períodes de temps.

Bromur d'etidi 0,002 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

- Solució 1% de bromur d'etidi 200 μL
- Aigua destil·lada 1000 mL

Barrejar suaument per agitació. Mantenir a temperatura ambient protegida de la llum. Es recomana reemplaçar la solució quan es detecti una disminució de l'activitat del producte.

Marcadors d'ADN

- Lamda DNA/ *EcoR* I + *Hind* III

Marcador de pes molecular de 500 pb a 21.000 pb

- Phi X174 DNA/ *Hae* III

Marcador de pes molecular de 100 pb a 1.300 pb

TAMPONS I REACTIUS EMPRATS EN LES TÈCNiques DE
BIOLOGIA MOLECULAR

Extracció d'ADN de mostres ambientals

Solució de lisi

- Tris-HCl 10mM	0,3 g
- Sacarosa 250 mM	21,4 g
- Lisozim (5 mg/mL)	1,25 g
- Aigua bidestil·lada	250mL

Dissoldre per agitació. Esterilitzar a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ durant 20 minuts.

Solució desnaturalitzant (Hidròxid sòdic 0,1 M)

- Na OH	0,5 N
- Aigua bidestil·lada	1,5 M

Dissoldre per agitació. Esterilitzar a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ durant 20 minuts. Guardar a temperatura ambient

Solució neutralitzant (Acetat Sòdic 0,1 M pH 6,0)

- Acetat sòdic	2,73 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació i ajustar el pH a 6,0 amb àcid acètic Esterilitzar a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ durant 15 minuts.

Tampó de rentat 2XSSC, 0,1 % SDS

- 20x SSC	170 mL
- SDS 10%	30 mL
- Aigua bidestil·lada estèril	300 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

Extracció d'ADN de soques tipus**Solució A (pH 8,3)**

-KCl	100 mM
-MgCl ₂	2,5 mM
-Tris-HCl	10 mM

Dissoldre per agitació i ajustar el pH a 8,0 amb àcid acètic glacial. Esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts

Solució B (pH 8,3)

- MgCl ₂	2,5 mM
-Tris-HCl	10 mM
-Tween-20	1%
-Nonidet P	40 %

Dissoldre per agitació i ajustar el pH a 8,0 amb àcid acètic glacial. Esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts

TE (Tris-EDTA), pH 8,0

- Tris	0,24g
- EDTA	0,07 g
- Aigua Bidestil·lada	250 mL

Dissoldre per agitació i ajustar el pH a 8,0 amb àcid acètic glacial. Esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts

Hibridació molecular

Tris-HCl 1M pH 9,5

- Tris base (A2264, AppliChem)	60,57 g
- Aigua bidestil·lada	500 mL

Dissoldre per agitació, ajustar el pH a 9,5 amb HCl i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

Tampó 1

- Àcid maleic	11,6 g
- NaCl	8,8 g
- Aigua bidestil·lada	1000 mL

Dissoldre per agitació. Ajustar el pH a 7,5 amb NaOH en pols. Esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

Tampó de Rentat (Protocol detecció de digoxigenina)

- Tampó 1 1000 mL
- Tween 20 (109280, Merck) 3 g

Afegir el Tween 20 al tampó 1 prèviament esterilitzat. Dissoldre per agitació. La solució és estable a temperatura ambient.

Tampó 2

- Tampó 1 900 mL
- Solució estoc de Blocking Reagent 100 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

Tampó 3

- Tris-HCl 1M pH 9,5 100 mL
- NaCl 1 M estèril 100 mL
- MgCl₂ 1 M estèril 50 mL
- Aigua bidestil·lada estèril 750 mL

Dissoldre per agitació tots els components en condicions d'asèpsia. És preferible preparar la solució immediatament abans de la seva utilització.

Solució estoc de Blocking Reagent

- Blocking Reagent (1 096 176, Roche) 10 g
- Tampó 1 100 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts. La solució és estable a (5 ± 3) °C. Cal comprovar l'esterilitat abans de la seva utilització.

Tampó de revelat amb substrat luminiscent

- Tampó 3 1 mL
- CSPD 10 µL

Dissoldre per agitació. Preparar immediatament abans de la seva utilització.

SDS 10%

- Sodium dodecyl sulfate 100 g
- Aigua bidestil·lada 1000 mL

Dissoldre per agitació i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

20x SSC

- NaCl 175,3 g
- Citrat sòdic (tri-sodio citrato 2-hidrato, 141655, Panreac) 88,2 g
- Aigua bidestil·lada 1000 mL

Dissoldre per agitació. Ajustar el pH a 7,0 i esterilitzar a (121 ± 3) °C durant 20 minuts. La solució és estable a temperatura ambient.

Tampó de rentat 5x SSC, 0,1% SDS

- 20x SSC 125 mL
- SDS 10% 5 mL
- Aigua bidestil·lada estèril 370 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

3x SSC, 0,1% SDS

- 20x SSC 75 mL
- SDS 10% 5 mL
- Aigua bidestil·lada estèril 445 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

2x SSC, 0,1% SDS

- 20x SSC 50 mL
- SDS 10% 5 mL
- Aigua bidestil·lada estèril 445 mL

Barrejar els components prèviament esterilitzats en condicions asèptiques. La solució és estable a temperatura ambient.

Bibliografia

- Abbaszadegan, M., Huber, M. S., Gerba, C. P. i Pepper, I. L.** (1997). Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock-induced mRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 324-328.
- Allsop, K. i Strickler, D. J.** (1985). An assessment of *Bacteroides fragilis* group of organisms as indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 95-99.
- Anderson, J.** (2001). Prospects for international guidelines for water recycling. *Water* **21**. August, 16-21.
- Anònim.** (1991). Directriu 91/492/CEE.
- Anònim.** (1994). Guidance on the preservation and hiling of samples. I.S.O 5667/3.
- Anònim.** (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20th edition. American Public Health Association, American Works Association and Water Environmental Federation Washington, D. C.
- Anònim.** (1998). Directriu 98/83/CEE.
- Anònim.** (2002). Directriu 2002/0254/CEE.
- Anònim.** (2004a). Microbial aspects. *In* Guidelines for drinking water quality pp. 121-144.
- Anònim.** (2004b). Real Decreto 140/2003. BOE 45 21/02/2003.
- Arany, C. B., Hackney, C. R., Duncan, S. E., Kator, H., Webster, J., Pierson, M., Boling, J. W. i Eigel, W. N.** (1995). Improved recovery of stressed *Bifidobacterium* from water and frozen yogurt. *J. Food Protect.* **58**, 1142-1146.

- Arunachalam, K. D.** (1999). Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Res.* **19**, 1559-1597.
- Atlas, R. M. i Bartha, R.** (2002). Ecología fisiológica de los microorganismos: adaptaciones a las condiciones ambientales. *In* Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed: Atlas, R.M. and Bartha, R. pp. 279-327. Madrid: Pearson Educación.
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schloter, M. i Munch, J. C.** (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J. Microbiol. Methods.* **49**, 235-245.
- Bahaka, D., Neut, C., Khattabi, A., Monget, D. i Gavini, F.** (1993). Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 565-573.
- Ballongue, J.** (1998). Bifidobacteria and probiotic action. *In* Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Ed: Salminen, S. and Von Wright, A. pp. 519-587. New York: Marcel Dekker.
- Barcina, I., Lebaron, P. i Vives-Rego, J.** (1997). Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**, 1-9.
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T. i McMurdo, M .E.** (2004). Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3575-3581.
- Beerens, H.** (1990). An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 155-157.

- Beerens, H.** (1998). Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**, 203-207.
- Beerens, H., Brac-de-la-Perriere, B. H. i Gavini, F.** (2000a). Evaluation of the hygienic quality of raw milk based on the presence of bifidobacteria: The cow as a source of faecal contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **54**, 163-169.
- Beerens, H., Gavini, F. i Neut, C.** (2000b). Effect of exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. *Anaerobe.* **6**, 65-67.
- Berg, G.** (1983). Viral pollution of the environment. *Water Res.* **21**, 28-32.
- Bernhard, A. E. i Field, K. G.** (2000). Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1587-1594.
- Bertrand, I., Gantzer, C., Chesnot, T. i Schwartzbrod, J.** (2004). Improved specific for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. *J. Microbiol. Methods.* In Press.
- Biavati, B., Sgorbati, B. i Scardovi, V.** (1992). The genus *Bifidobacterium*. In *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Ed: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. pp. 817-833. New York: Springer-Verlag.
- Bissonnette, G. K., Jezeski, J. J., McFeters, G. A. i Stuart, D. G.** (1975). Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. *Appl. Microbiol.* **29**, 186-194.

- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. i Noller, H. F.** (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**, 107-127.
- Bürgmann, H., Widmer, F., Singler, W. i Zeyer, J.** (2003). mRNA Extraction and Reverse Transcription-PCR Protocol for Detection of nifH Gene Expression by *Azotobacter vinelandii* in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1928-1935.
- Cabelli, V. J., Kennedy, H. i Levin, M. A.** (1976). *Pseudomonas aeruginosa*- fecal coliform relationships in estuarine and fresh recreational waters. *J. water poll. control federation.* **48**, 367-376.
- Calci, K. R., Burkhardt, W., Watkins, W. D. i Rippey, S. R.** (1998). Occurrence of Male-Specific Bacteriophage in Feral and Domestic Animal Wastes, Human Feces, and Human-Associated Wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 5027-5029.
- Candela, M., Vitali, B., Matteuzzi, D. i Brigidi, P.** (2003). Evaluation of the rrn operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 229-232.
- Carlsson, J., Nyberg, G. i Wrethen, J.** (1978). Hydrogen peroxide and superoxide radical formation in anaerobic broth media exposed to atmospheric oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 223-229.
- Carrillo, M., Estrada, E. i Hazen, T.C.** (1985). Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 468-476.
- Chaiyanan, S., Chaiyanan S., Huq, A. , Maugel, T. i Colwell, R. R.** (2001). Viability of the Nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 331-341.

- Chang, J. H., Kwon, I. K. i Kim, H. U.** (1983). Studies on the bifidobacteria in breast-fed Korean infant gut. *J. Dairy. Sci.* **5**, 111-116.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. i Collins, J. K.** (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbiol.* **35**, 1-27.
- Chevalier, P., Roy, D. i Savoie, L.** (1991). X-alpha-gal-based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. *J. Microbiol. Methods* **13**, 75-83.
- Cho, J. C., Cho, H. B. i Kim, S. J.** (2000). Heavy contamination of a subsurface aquifer and a stream by livestock wastewater in a stock farming area, Wonju, Korea. *Environ. Pollut.* **109**, 137-146.
- Clarholm, M.** (1984). Heterotrophic, Free-Living Protozoa: Neglected Microorganism with an important task in regulating bacterial populations. *In* Microbial Ecology. Ed: Klug, M. J i Reddy, C. A. pp. 321-326.
- Clesceri, L. S.** (1998). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20th edition. American Public Health Association, American Works Association and Water Environmental Federation Washington, D. C.
- Close, M. E, Hodgson, L. R., Todd, G.** (1989). Field evaluation of fluorescent whitening agents and sodium tripolyphosphate as indicators of septic tank contamination in domestic wells. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.* **23**, 563-568.
- Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A. i Palmer, L. M.** (1985). Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically. *Bio/Technology.* **3**, 317-320.

- Corliss, J. O. i Esser, C. S.** (1974). Comments on the role of the cyst in the life cycle and survival of free-living protozoa. *In* Trans, Am. Microsc. Soc. pp. 578-593.
- Crociani, F., Biavati, B., Alessandrini, A., Chiarini, C. i Scardovi, V.** (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 564-571.
- De Vries, W. i Stouthamer, A. H.** (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J. Bacteriol.* **93**, 574-576.
- De Vries, W. i Stouthamer, A. H.** (1969). Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Mikrobiol.* **65**, 275-287.
- Deman, J. C., Rogosa, M. i Sharpe, M. E.** (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135.
- Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M. i Palmer, C. J.** (2002). Influence of Soil on Fecal Indicator Organisms in a Tidally Influenced Subtropical Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1165-1172.
- Devriese, L. A., Collins, M. D. i Wirth R.** (1991). The genus *Enterococcus*. *In* The prokaryotes. pp. 1465-1477. Springer-Verlag, New York
- Devriese, L. A., Kerckhove, A. V., Kilpper-Bälz, R. i Schleifer K. H.** (1987). Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 257-259.
- Domingo, J. W., Siefring, S. C. i Haugland, R. A.** (2003). Real-time PCR method to detect *Enterococcus faecalis* in water. *Biotech. Lett.* **25**, 261-265.

- Donaldson, K. A., Griffin, D. W. i Paul, J. H.** (2002). Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from Florida keys using real-time RT-PCR. *Water Res.* **36**, 2505-2514.
- Dong, X., Cheng, G. i Jian, W.** (2000a). Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**, 386-390.
- Dong, X., Xin, Y., Jian, W., Liu, X. i Ling, D.** (2000b). *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 119-125.
- Dudman, W. F.** (1997). The role of surface polysaccharides in natural environments. *In* Surface carbonhydrates of the prokaryotics cells. Ed: I. W. Sutherland. Academic Press, London.
- Dufour, A. P., Strickland, E. R. i Cabelli, V. J.** (1981). Membrane filter method for enumerating *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1152-1158.
- Duran, A. E., Muniesa, M., Mendez, X., Valero, F., Lucena, F. i Jofre, J.** (2002). Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 338-347.
- Ehrmann, M., Ludwig, W. i Schleifer, K. H.** (1994). Reverse dot blot hybridization: a useful method for the direct identification of lactic bacteria in fermented food. *FEMS Microbiol.Lett.* **117**, 143-149.
- Eisenstark, A.** (1989). Bacterial genes involved in response to near-ultraviolet radiation. *Adv. Genet.* **26**, 99-147.
- Evison, L. M.** (1988). Comparative studies on the survival of indicator organisms and pathogens in fresh and sea water. *Water Sci.Technol.* **20**, 309-315.

- Evison, L. M. i James A.** (1973). A comparison of the distribution of intestinal bacteria in british and east african water sources. *J. Appl. Bacteriol.* **36**, 109-118.
- Evison, L. M. i Morgan, S.** (1978). Further studies on *Bifidobacterium* as indicator of faecal pollution in water. *Progress water technol.* **10**, 341-350.
- Fanedl, L., Nekrep, F. V. i Avgustin, G.** (1998). Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans. *Can. J. Microbiol.* **44**, 1094-1101.
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzoti, L., Rossi, F., Dellaglio, F. i Torriani, S.** (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **82**, 59-70.
- Feachem, R. G.** (1975). An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res.* **9**, 689-690.
- Figueras, M. J., Inza, I. i Guarro, J.** (1998). Evaluation of the oxolinic acid-esculin-azide medium for isolation and enumeration of fecal streptococci in a routine monitoring program for bathing waters. *Can. J. Microbiol.* **44**, 998-1002.
- Flint, K. P.** (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 261-270.
- Franks, A., Harnsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J. i Schut, F.** (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3336-3345.

- Freter, R.** (1984). Factors affecting conjugal plasmid transfer in natural bacterial communities. *In Current Perspective in Microbial Ecology*. Ed: Klug, M. J. i Reddy, C. A. Reddy. Amer. Soc. Micr. Publish., Washington.
- Furhman, J. A.** (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*. **399**, 541-548.
- Furuse, K., Osawa, S., Kawashiro, J., Tanaka, R., Ozama, Z., Sawamura, S., Yanagawa, T., Nagao, T. i Watanabe, I.** (1983). Bacteriophages distribution in human faeces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukemic diseases. *J. Ge. Virol.* **64**, 2039-2043.
- Gameson, A. L. i Gould, D. J.** (1975). Effects of solar radiation on mortality of some terrestrial bacteria in sea water. *In Discharge of Sewage from Sea Outfalls*. Ed. Gamseon, A. L. H. pp. 209-219.
- Gavini, F. i Beerens, H.** (1999). Origin and identification of bifidobacteria strains isolated from meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 81-85.
- Gavini, F., Pourcher, A. M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C. i Izard, D.** (1991). Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 548-557.
- Gerba, C. P.** (1987). Recovery of viruses from sewage, effluents and water. *In Methods for recovering viruses from the environment*. Ed. Berg. pp. 1-51.
- Gerba, C. P. i Bitton, G.** (1984). Microbial pollutants: Their survival and transport pattern to groundwater. *In Groundwater Pollution Microbiology*. Ed: Bitton, G. and Gerba, C. P. pp. 65-88.

- Gesche, E., Vallejos, A. i Saez, M.** (2003). Eficiencia de Anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. Método de Número Más Probable (NMP). *Arch. med. vet.* **35**, 99-107.
- Gilpin B. J., James, T., Nourozi, F., Saunders, D., Scholes, P. i Savill, M.** (2003). The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification. *Water Sci.Tech.* **47**, 39-43.
- Glick, M. C., Sall, T., Zilliken, F. i Mudd, S.** (1960). Morphological changes of *L. bifidus* var. *penn.* produced by a cell-wall precursor. *Biochim. Biophys. Acta.* **37**, 363-365.
- Gómez, Z. A., Kociubinski, G., Pérez, P. i De Antoni, G.** (1998). Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J. Food Protection.* **61**, 865-873.
- Gourmelon, M., Cillard, J. i Pommepeuy, M.** (1994). Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 105-112.
- Grabow, L.** (1985). Disease and personality. *Med. Monatsschr. Pharm.* **8**, 42-51.
- Grabow, W. O. K.** (1998). Microbiology of drinking water treatment; reclaimed wastewater. *In Drinking Water Microbiology Progress and Recent Developments.* Ed: Springer Verlag i McFeters G. A. 259-264. New York, N.Y.
- Gregori, G., Denis, M., Lefevre, D. i Romano, J. C.** (2003). Viability of heterotrophic bacteria in the Bay of Marseilles. *C. R. Biol.* **326**, 739-750.
- Gueimonde, M., Tolkko, S., Korpimaki, T. i Salminen, S.** (2004). New Real-Time Quantitative PCR Procedure for Quantification of Bifidobacteria in Human Fecal Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4165-4169.

- Guelin, A.** (1952). Bacteriophages and intestinal bacteria in sea fish and the problem of polluted waters. *Ann. Inst. Pasteur.* **83**, 46-56.
- Gylleberg, H., Niemelä, S. i Sormunen, T.** (1960). Survival of bifid bacteria in water as compared with that of coliform bacteria and enterococci. *Appl. Microbiol.* **8**, 20-22.
- Hagedorn, C., Crozier, J. B., Mentz, A. M., Booth, A. M., Graves, A. K., Nelson, N. J. i Reneau Jr, R. B.** (2003). Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 792-799.
- Hagedorn, C., Robinson, S. L., Filtz, J. R., Grubbs, S. M., Angier, T. A. i Reneau Jr, R. B.** (1999). Determining Sources of Fecal Pollution in a Rural Virginia Watershed with Antibiotic Resistance Patterns in Fecal Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5522-5531.
- Hardina, C. M. i Fujioka, R. S.** (1991). The environmental sources of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's Streams. *Environ. toxicology water quality.* 185-195.
- Harmsen, H. J. M., Gibson, G. R., Elfferich, P., Raangs, G. C., Wilbeboer-Veloo, A. C. M., Argaiz, A., Roberfroid, M. i Welling, G. W.** (1999). Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**, 125-129.
- Hartemink, R., Kok, B. J., Weenk, G. H. i Rombouts, F.M.** (1996). RB agar, a new selective medium for bifidobacteria. *J. Microbiol. Methods* **27**, 33-43.
- Harwood, V. J., Wiggins, B. A., Hagedorn, C., Ellender, R. D., Gooch, J., Chapman, A. C., Robinson, B. J. i Thompson, B. C.** (2003). Phenotypic library-based microbial source tracking methods efficacy in the california collaborative study. *J. Water Health.* **4**, 153-166.

- Havelaar, A. H., Van Olphen, M. i Drost, Y.** (1993). F-Specific RNA Bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2956-2962.
- Herman, D.** (1972). Experience with coliform and enteric organisms isolated from industrial wastes. Wastes, U.S. EPA. Seminari: The Significance of Fecal Coliforms in Industrial, Denver. pp 26-40.
- Hoefel, D., Grooby, W. L., Monis, P. T., Andrews, S. i Saint, C.P.** (2003). Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J. Microbiol. Methods.* **55**, 585-597.
- Holland, D. F.** (1920). Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bact.* **5**, 215-229.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. i Gelfand, D. H.** (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Pro. Natl Acad. Sci.USA.* **88**, 7276-7280.
- Hosono, A., Wardoyo, R. i Otani, H.** (1990). Inhibitory effects of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Bol. Chem.* **54**, 1639.
- Hoyles, L., Inganas, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCartney, A. L. i Collins, M. D.** (2002). *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 995-999.
- Hrudey, S. E., Payment P., Huck, P. M., Gillham, R. W. i Hrudey, E. J.** (2003). A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci. Technol.* **47**, 7-14.

- Hughes, D. B., Hoover, D. i Dallas G.** (1995). Viability and Enzymatic Activity of Bifidobacteria in Milk. *J. Dairy Sci.* **78**, 268-276.
- Huijsdens, X. W., Linskens, R. K., Mak, M., Meuwissen, S. G. M., Vandebroucke-Grauls, C. M. i Savelkoul, P. H.** (2002). Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4423-4427.
- Hunger, W.** (1986). Esculin cellobiose agar for the isolation and bacterial counting of lactobacillus-acidophilus. *Milchwissenschaft.* **41**, 283-285.
- Ibekwe, A. M. i Grieve, C. M.** (2002). Detection and quantification of *Escherichia coli* 0157:H7 in environmental samples by real time PCR. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 421-431.
- Izhar, H. H., Jagjit, K. S. i Yadav, S.** (2003). Real-time PCR assays for genus-specific detection and quantification of culturable and non-culturable mycobacteria and pseudomonads in metalworking fluids. *Mol. Cel. Probes.* **18**, 67-73.
- Jagals, P. i Grabow, W.** (1996). An evaluation of sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution of environmental water. *Water SA.* **22**, 235-238.
- Jagger, J.** (1995). Solar-UV actions on living cells. Prager, New York.
- Jian, W. i Dong, X.** (2002). Amplification of bacterial heat shock protein 60 gene using inverse PCR method. *Weishengwu Xuebao.* **42**, 56-61.
- Jian, W., Zhu, H. i Dong, X.** (2001). New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1633-1638.

- Jofre, J., Blasi, J. M., Bosch, A. i Lucena, F.** (1989). Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteriodes fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. *Water Sci. Tech.* **21**, 15-19.
- Kang, D. H. i Siragusa, G. R.** (2001). A rapid twofold dilution method for microbial enumeration and resuscitation of uninjured and sublethally injured bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**, 232-236.
- Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M. i Meile, L** (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1268-1273.
- Kellogg, D. E., Sninsky, J. J. i Kwok, S.** (1990). Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Analytical Biochem.* **189**, 202-208.
- Kojima, M., Suda, S., Hotta, S. i Hamada, K.** (1968). Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.* **95**, 710-711.
- Kojima, M., Suda, S., Hotta, S. i Hamada, K.** (1970). Induction of pleomorphy and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.* **102**, 217-220.
- Kullen, M. J., Brady, L. J. i O'Sullivan, D. J.** (1997). Evaluation of using a short region of the recA gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**, 377-383.
- Labelle, R., Gerba, C. P., Goyals, S. M., Melnick, J. L., Cech, I. i Bogdan, G. C.** (1980). Relationships between enviromental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediemnts. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 588-596.

- Lane, D. J.** (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *In* Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Ed: Stackebrandt, E. i Goodfellow, M. pp. 115-147. West Sussex: Wiley-Interscience.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H. i Welling, G. W.** (1995). Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3069-3075.
- Lauer, E. i Kandler, O.** (1976). Mechanismus der variation des verhältnisses acetat/lactat bei der vergärung von glucose durch Bifidocacterien. *Arch. Mikrobiol.* **110**, 271-277.
- Leblond-Bourget, N., Philippe, H., Mangin, I. i Decaris, B.** (1996). 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 102-111.
- Leclerc, H., Devriese, L. A. I Mossel, D.A.** (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 459-466.
- Leeming, R., Bate, N., Hewlett, R. i Nichols, P. D.** (1998). Discriminating faecal pollution: A case study of stormwater entering Port Phillip Bay, Australia. *Water Sci. Technol.* **38**, 15-22.
- Lim, K. S., Huh, C. S., Baek, Y. J. i Kim, H. U.** (1995). A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. *J. Dairy. Sci.* **78**, 2108-2112.
- Long, S. C. i Arango, C.** (2001). Evaluation of enumeration media for sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of human fecal contamination of drinking water. Comunicació personal.

- López-Gutiérrez, J. C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G. i Philippot, L.** (2004). Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environmental by real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*. **57**, 399-407.
- Lynch, P. A., Gilpin, B. J., Sinton, L. W. i Savill, M.G.** (2002). The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 526-533.
- Mackenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Addis, D. G., Fox, K. R., Rose, J. B. i Davis, J. P.** (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England J. Medicine*. **331**, 161-167.
- Manero, A. i Blanch, A. R.** (2002). Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridisation with 16S rDNA probes. *J. Microbiol. Methods*. **50**, 115-121.
- Mangin, I., Bouhnik, Y., Bisetti, N. i Decaris, B.** (1999). Molecular monitoring of human intestinal *Bifidobacterium* strain diversity. *Res. Microbiol.* **150**, 343-350.
- Mar Lleo, M., Pierobon, S., Tafi, M. C., Signoretto, C. i Canepari, P.** (2000). mRNA Detection by Reverse Transcription-PCR for Monitoring Viability over Time in an *Enterococcus faecalis* Viable but Nonculturable Population Maintained in a Laboratory Microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4564-4567.
- Mara, D. D. i Oragui, J. I.** (1983). Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 349-357.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M. i Oyaizu, H.** (1999). Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4506-4512.

- Matsuki, T., Watanabe, K. i Tanaka, R.** (2003). Genus- and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **4**, 61-69.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. i Tanaka, R.** (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 167-173.
- McCartney, A. L., Wenzhi, W. i Tannock, G. W.** (1996). Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4608-4613.
- McFeters, G. A.** (1989). Detection and significance of injured indicator and pathogenic bacteria in water. *In* Injured index and pathogenic bacteria: occurrence and detection in foods, water and feeds. Ed: Ray, B., McFeters, G. A., Kippin, J. S. and LeChevallier, M. W. pp. 179-210.
- McFeters, G. A., Kippin, J. S. i LeChevallier, M.W.** (1986). Injured coliforms in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1-5.
- Meile, L., Rohr, L. M., Geissmann, T. A., Herensperger, M. i Teuber, M.** (2001). Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/ D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (xfp) from *Bifidobacterium lactis*. *J. Bacteriol.* **183**, 2929-2936.
- Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S. i Teuber, M.** (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 57-64.

- Mendonca, A. F. i Knabel, S. J.** (1994). A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk containing background microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4001-4008.
- Michel, C., Kravtchenko, T. P., David, A., Gueneau, S., Kozlowski, F. i Cherbut, C.** (1998). In vitro prebiotic effects of Acacia gums onto the human intestinal microbiota depends on both botanical origin and environmental pH. *Anaerobe.* **6**, 266-267.
- Mitsuoka, T.** (1990). Bifidobacteria and their role in human health. *J. Industrial Microbiol.* **6**, 263-268.
- Mitsuoka, T., Segal, T. i Yamamoto, T.** (1965). Eine Verbesserte Methodik der qualitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Hyg.* **195**, 455-469.
- Miyake, T., Watanabe, K., Watanabe, T. i Oyaizu, H.** (1998). Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol. Immunol.* **42**, 661-667.
- Mocé-Llivina, L., Muniesa-Perez, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F. i Jofre, J.** (2002). Survival of bacterail indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1452-1456.
- Moro, E.** (1900). Über die nach Gram-färbbaren bacillen des säuglingsstuhles. *Wien. Lin. Wschr.* **13**, 114.
- Mossel, D. A.** (1958). The suitability of bifidobacteria as part of more exted bacterial association, indicating faecal contamination foods. Proc. 7th. International Congr. Microbiol. Abstr. Of papers, 440.

- Mossel, D. A.** (1982). Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **48**, 609-611.
- Mullie, C., Odou, M. F., Singer, E., Romond, M. B. i Izard, D.** (2003). Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**, 129-136.
- Muñoz, F. J. i Pares, R.** (1988). Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1715-1718.
- Nebra, Y. i Blanch, A. R.** (1999). A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5173-5176.
- Nebra, Y., Jofre, J. i Blanch, A. R.** (2002). The effect of reducing agents on the recovery of injured *Bifidobacterium* cells. *J. Microbiol. Methods.* **49**, 247-254.
- Nebra, Y., Bonjoch, X. i Blanch, A. R.** (2003). Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2651-2656.
- Noble, R. T., Lee, I. M. i Schiff, K. C.** (2004). Inactivation of indicator microorganisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 464-472.
- O'Riordan, K. i Fitzgerald, G. F.** (1997). Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 259-264.
- Oragui, J. I. i Mara, D. D.** (1983). Investigation of the survival characteristics of *Rhodococcus coprophilus* and certain fecal indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 356-360.

Orla-Jensen, S. (1924). Le classification des bactéries lactiques. *Le Lait* **4**, 468-480.

Pacher, B. i Kneifel, W. (1996). Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Int. Dairy Journal* **6**, 43-64.

Panicker, G., Myers, M. L. i Bej, A. K. (2004). Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Shellfish and Gulf of Mexico Water by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 498-507.

Payment, P. (1991). Fate of human enteric viruses, coliphages, and *Clostridium perfringens* during drinking-water treatment. *Can. J. Microbiol.* **37**, 154-157.

Payment, P. i Franco, E. (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2418-2424.

Pedley, S., Yates, M., Schijven, J. F., West, J., Horwrd, G. i Barrett, M. (2004). WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. *In* Protecting Groundwater for Health: managing the Quality of Drinking-water Sources. pp. 23-30.

Pourcher, A. M., Devriese, L. A., Hernadez, J. F. i Delattre, J. (1991). Enumeration by miniaturized method of *Escherichia coli*-streptococcus-bovis and enterococci as indicators of the origin of fecal pollution of waters. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 525-530.

Proctor, L. M. i Fuhman, J. A. (1990). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature.* **343**, 60-62.

Rada, V. i Petr, J. (2000). A new selective medium for the isolation of glucosa non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J. Microbiol. Methods* **43**, 127-132.

- Reed, R. S. i Meyer, V.** (2000). Solar photo-oxidative disinfection of drinking water: preliminary field observations. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 432-436.
- Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M. A., Tanaka, R., Watanabe, K. i Tannock, G. W.** (2002). Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2420-2427.
- Resnick, I. G. i Levin, M. A.** (1981a). Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 433-438.
- Resnick, I. G. i Levin, M. A.** (1981b). Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 427-432.
- Richards, G. P., Watson, M. A. i Kingsley, D. H.** (2004). A SBYR green, real-time RT-PCR methods to detect and quantitative Norwalk virus in stools. *J. Virol. Methods.* **116**, 63-70.
- Roach, P. D., Olson, M. E., Whitley, G. i Wallis, P. M.** (1993). Waterborne Giardia cyst and Cryptosporidium oocysts in the Yukon, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 67-73.
- Rodriguez, G. G, Phipps, D., Ishiguro, K. I Ridgway, H. F.** (1992). Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1801-1808.
- Rodtong, S. i Tannock, G. W.** (1993). Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3480-3484.
- Rogosa, M.** (1974). Genus III. *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472. In Bergey's manual of determinative bacteriology. Ed: Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. pp. 669-676. Baltimore: Williams and Wilkins Company.

- Rowbotham, T. J. i Cross, T.** (1977). Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *J. General Microbiol.* **100**, 231-240.
- Roy, D., Desjardins, M. L. i Mondou, F.** (1995). Selection of bifidobacteria for use under cheese-making conditions. *Milchwissenschaft.* **50**, 139-142.
- Roy, D., Ward, P. i Champagne, G.** (1996). Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 11-29.
- Roy, D. i Sirois, S.** (2000). Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**, 17-24.
- Rybka, S. i Kailasapathy, K.** (1996). Media for the enumeration of yogurt bacteria. *Int. Dairy J.* **6**, 839-850.
- Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M. i Benno, Y.** (2002). Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **52**, 1945-1951.
- Sambrook, J. i Russell, D. W.** (2001). *In* Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 39. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M. i De Vos, W.M.** (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 504-513.

- Scardovi, V.** (1986). Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. pp. 1418-1434. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Scardovi, V. i Crociani, F.** (1974). *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**, 6-20.
- Scardovi, V. i Trovatelli, L. D.** (1965). The Fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Micr.* **15**, 19-29.
- Scardovi, V., Trovatelli, L. D., Zani, G., Crociani, F. i Matteuzzi, D.** (1971). Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **21**, 276-294.
- Schaper, M., Duran, A. E. i Jofre, J.** (2002). Comparative Resistance of Phage Isolates of Four Genotypes of F-Specific RNA Bacteriophages to Various Inactivation Processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3702-3707.
- Schaper M. i Jofre, J.** (2000). Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *J. Virol. Methods* **89**, 1-10.
- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D. i Arigoni, F.** (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14422-14427.
- Scott, T. R., Rose, J. B., Jenkis, T. M., Farash S. M. i Lukasik, J.** (2002). Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5796-5803.

- Sebald, M., Gasser, F. i Werner, H.** (1965). DNA base composition and classification. Application to group of bifidobacteria and to related genera. *Ann. Inst. Pasteur* **109**, 251-269.
- Sheridan, G. E., Masters, C. I., Shallcross, J. A. i Mackey, B. M.** (1998). Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1313-1318.
- Shillo, M.** (1983). *Bdellovibrio* as predator. In Microbial ecology. Ed: Klug, M. J. and Reddy, C. A. pp. 334-339.
- Silvi, S., Rumney, C. J. i Rowland, I. R.** (1996). An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 561-564.
- Simpson, J. M., Santo-Domingo, J. W. i Reasoner, D. J.** (2002). Microbial source tracking: State of the science. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 5279-5288.
- Sinton, L. W., Finlay, R. K. i Hannah, D. J.** (1998). Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *New Zeal. J. Mar. Fresh. Res.* **32**, 323-348.
- Sinton, L. W., Davies-Colley, R. J. i Bell, R. G.** (1994). Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2040-2048.
- Sinton, L. W., Finlay, R. K. i Lynch, P. A.** (1999). Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage-Polluted Seawater *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3605-3613.

- Sinton, L. W., Hall, C. H., Lynch, P. A. i Davies-Colley, R. J.** (2002). Sunlight Inactivation of Fecal Indicator Bacteria and Bacteriophages from Waste Stabilization Pond Effluent in Fresh and Saline Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1122-1131.
- Solié, M. i Krstulović, N.** (1992). Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Mar. Pollut. Bull.* **24**, 411-416.
- Solo-Gabriele, H. M., Wolfert, M. A., Desmarais, T. R. i Palmer, C. J.** (2000). Sources of *Escherichia coli* in a Coastal Subtropical Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 230-237.
- Sonoike, K., Mada, M. i Mutai, M.** (1986). Selective agar medium for counting viable cells of bifidobacteria in fermented milk. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **27**, 238-244.
- Stackebrandt, E. i Goodfellow, M.** (1991). Introduction. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Ed: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. West Sussex: Wiley-Interscience.
- Stackebrandt, E. i Ludwig, W.** (1994). The importance of choosing outgroups references organisms in phylogenetic studies: the *Atopobium* case. *System. Appl. Microbiol.* **17**, 39-43.
- Stephens, P. J., Druggan, P. i Caron, G. N.** (2000). Stressed *Salmonella* are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media. *Int. J. Food Microbiol.* **60**, 269-285.
- Stout, J. i Heal, O. W.** (1967). Protozoa. In A Burges and F. Raw (ed.), *Soil biology*. pp. 149-195. Academic Press, Inc., New York.

- Tabak, K. H., Bloomhuff, i Bunch, R. L.** (1972). Coprostanol: a positive tracer or fecal pollution. *Dev. Ind. Microbiol.* **13**, 296-207.
- Tamime, A. Y., Marshall-Valerie, M. E. i Robinson, R. K.** (1995). Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* **62**, 151-187.
- Tanaka, R. i Mutai, M.** (1980). Improved medium for selective isolation and enumeration of *Bifidobacterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 866-869.
- Tannock, G.W.** (1997). Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D. *Trends Biotechnol.* **15**, 270-274.
- Tartera, C., Lucena, F. i Jofre, J.** (1989). Human origin of *Bacteroides-fragilis* bacteriophages present in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2696-2701.
- Teixeira, L. M., Carvalho, M. G., Espinola, M. M. B., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Brenner, D. J. i Facklam, R. R.** (2001), *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1737-1743.
- Teraguchi, S., Uehara, M., Ogasa, K. i Mitsuoka, T.** (1978). Enumeration of bifidobacteria in dirty products. *J. Clinic. Microbiol.* **33**, 753-761.
- Tissier, H.** 1900. Recherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourisson. Tesis.
- Toranzos, G. A. i McFeters, G. A.** (1997). Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. *In* Manual of environmental microbiology. Ed: Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D. and Walter, M.V. pp. 184-194. Washington: ASM Press.

- Tyagi, S., Bratu, D. P. i Kramer, F. R.** (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotech.* **16**, 49-53.
- Uyttendaele, M., Vanwilldemeersch, K. i Debevere, J.** (2003). Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 386-391.
- Venema, K. i Maathuis, A. J.** (2003). A PCR-based method for identification of bifidobacteria from the human alimentary tract at the species level. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**, 143-149.
- Ventura, M., Elli, M., Reniero, R. i Zink, R.** (2001a) Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 113-121.
- Ventura, M., Reniero, R. i Zink, R.** (2001b). Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2760-2765.
- Ventura, M., Sinderen, D., Fitzgerald, G. F. i Zink, R.** (2004) .Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **84**, 205-223.
- Ventura, M. i Zink, R.** (2002). Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6429-6434.
- Vincent, D., Roy, D., Mondou, F. i Dery, C.** (1998). Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 185-193.

- Vitali, B., Candela, M., Matteuzzi, D. i Brigidi, P.** (2003). Quantitative detection of probiotic *Bifidobacterium* strains in bacterial mixtures by using real-time PCR. *Syst. Appl. Microbio.* **26**, 269-276.
- Wang, R. F., Cao, W. W. i Cerniglia, C. E.** (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1242-1247.
- Wang, R. F., Kim, S. J., Robertson, L. H. i Cerniglia, C. E.** (2002). Development of a membrane-array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol. Cell Probes.* **16**, 341-350.
- Wellings, F. M., Lewis, A. L. i Mountain, C. W.** (1976). Demonstration of solids-associated virus in wastewater and sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 354-358.
- Werner, H., Gasser, F. i Sebald, M.** (1966). DNA-basenbestimmungen an 28 Bifidus stämmen und anstämmen morphologisch ähnlicher gattungen. *Zbl. Bak. I. Orig.* **198**, 504-516.
- Whitman, R. L., Nevers, M. B., Korinek, G. C. i Byappanahalli, M. N.** (2004). Solar and Temporal Effects on *Escherichia coli* Concentration at a Lake Michigan Swimming Beach. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4276-4285.
- Wierzchos, J., Los Rios, A., Sancho, L. G. i Ascaso, C.** (2004). Viability of endolithic micro-organisms in rocks from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica established by confocal and fluorescence microscopy. *J. Microscopy.* **216**, 57-61.
- Wiggins, B. A.** (1996). Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3997-4002.

- Yamamoto, T., Morotomi, M. i Tanaka, R.** (1992). Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4076-4079.
- Yukselen, M. A., Calli, B., Gokyay, O. i Saatci, A** (2002). Inactivation of coliform bacteria in black sea water due to solar radiation. *Environ. Int.* **29**, 45-50.
- Zhu, H., Qu, F. i Zhu, L.H.** (1993). Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5279-5280.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. i De Vos, W. M.** (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854-3859.