



U
UNIVERSITAT DE BARCELONA
B

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Captació bacteriana de coure

M^aCarme Montero i Fabré 2007



FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Programa de doctorat: Medicaments, alimentació i salut (Facultat de Farmàcia)

BIENNI 2000-2002

Captació bacteriana de cuore

Memòria presentada per **M^aCarme Montero i Fabré** per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona.

Directora:

Dra. M^aDolors Simon Pujol

Doctorand:

M^aCarme Montero i Fabré

Per mi acabar aquesta tesi és tancar una porta d'una etapa que no sempre ha estat fàcil. Han passat ja quasi deu anys d'ençà que vaig entrar al Departament de Microbiologia quan encara feia quart de carrera buscant la Dra Simon perquè m'havia escollit per realitzar un treball pràctic. El temps passa volant, és cert. Però els sentiments, les situacions viscudes i sobretot les persones que han compartit amb mi part d'aquest camí, a nivell professional o a nivell personal, tenen un espai en els meus records que ara intentaré posar en paraules.

I voldria començar amb un agraïment comú per tot el suport rebut durant aquella dissortada època en què la meva família i jo vàrem haver de viure una experiència que poc ens imaginàvem que ens podria passar. Pel vostre interès, per les trucades, per les visites, a tots, moltes gràcies.

A la Dra. Dolors Simon, directora d'aquesta tesi, li he d'agrair el fet d'haver-me ajudat a arribar fins aquí. Gràcies per donar-me la possibilitat d'aprendre tot el que sé, per transmetre'm la inquietud pel món de la microbiologia. Pel suport rebut durant aquest temps i en l'escriptura d'aquesta memòria.

Al Dr. Francisco Congregado, com a primer professor que vaig tenir a les aules de Microbiologia, li he d'agrair haver-me acostat al món dels microorganismes. Gràcies per l'interès demostrat durant els anys de la beca d'aliments, per la seva ajuda i col·laboració.

A tots els professors i membres del Departament de Microbiologia. De tots he après molt a les classes de microbiologia ambiental, virologia, microbiologia clínica, les pràctiques, els cursos de doctorat. Gràcies a tots pel vostre exemple i la vostra dedicació. En el record em quedaran per sempre les classes magistrals de microbiologia industrial del Dr. Guinea.

A la Dra. Carme Fàbrega, Cap del Servei de Farmàcia de l'Hospital Sant Joan de Déu per creure en aquest projecte i en mi mateixa. Vull agrair-li tot el suport rebut durant tots aquests anys, per les facilitats "horàries" d'aquestes últimes setmanes, per escoltar-me i animar-me quan més ho he necessitat. Gràcies de tot cor.

Als meus germans grans de laboratori. En Pere Calafat per tantes hores compartides, per ensenyar-me, per la seva paciència en els meus inicis. Per tots els bons records d'aquella època. A la Pili Garcia pel seu exemple i l'ajuda rebuda. A l'Alberto Gómez per les converses, pels consells, per la seva amistat malgrat la distància.

Als companys del laboratori amb els qui he compartit tantes estones. A la Núria Coderch, en David, la Bea, la Carmen, la Flori, en Jaume, l'Escar, la Maria, en Víctor, l'Ajo, la Merche. Pels companys amb qui he compartit aquesta etapa final de la tesi, a l'Albert, la Noelia, l'Aintzane i en Joan. Pels somriures de la Glòria, per l'eficàcia de la M^aJesús, pel suport "logístic" de la Lucia amb tots els tràmits d'aquesta tesi.

Mònica, ja ho saps... Gràcies per la teva amistat. Per les teves aportacions "excel·lents" en aquesta tesi. Pels bons i mals moments compartits, pels moments "frikis", pels moments "batuka". A l'Oriol, gràcies per tot allò que es pot entendre sense necessitat d'haver-se d'explicar.

Als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona. A les unitats de Microscòpia Electrònica de Transmissió, de Rastreig, d'Absorció Atòmica i de Difracció de Raigs X. El meu sincer agraïment al Dr. Fontarnau per la seva bona disponibilitat i la seva paciència en resoldre els meus dubtes. Agrair tot el suport rebut de'n Joan Mendoza, per la seva amabilitat i la seva col·laboració. Al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona, a l'Àlex Sanchez i a l'Emma Rossinyol per la seva simpatia i magnífica disposició.

A tots els companys i companyes del Servei de Farmàcia de l'Hospital de Sant Joan de Déu. Per l'interès que heu mostrat sempre tots per aquesta tesi. Perquè amb vosaltres sempre m'he sentit com a casa. Pels somriures i les complicitats entre els carros d'unidosi. Per les rialles que s'escapen pel tub pneumàtic. Perquè aprenc cada dia alguna cosa de cadascú de vosaltres.

Als amics de sempre, que formen part del meu camí, perquè sempre hi són, faci sol o plogui. A l'Anna Casas, per tantes i tantes coses, per l'amistat en estat pur. Per tants moments viscuts, perquè em sé feliç de saber-te al meu costat. A l'Encarna Jutglà i en Lluís Jordana per la vostra amistat, per la vostra preocupació, per tenir la certesa de que sempre hi sou. A l'Ana Pérez i als moments compartits en els nostres viatges. A l'Eva Casellas i en Jordi Molas gràcies per la vostra confiança. A la Jordina i a la Tate Pallarès per ser-hi sempre malgrat la distància, gràcies pel "suport" ortogràfic d'aquest treball.

A la Lúdia i en Jordi per caminar junts i per acompanyar-me en tot aquest procés, i per créixer junts compartint tot allò que la vida ens ha portat. I finalment vull agrair als meus pares tot el que fan i han fet per mi. Perquè sense ells no hagués pogut arribar fins aquí. Pel coratge de la mare i per la fermesa del pare. Per totes les coses que em regalen cada dia, pels detalls petits que ho omplen tot, perquè em fa molta il·lusió compartir amb vosaltres aquest moment.

Per etapes que s'acaben i nous reptes que comencen...

Per portes que es tanquen i finestrons que s'obren...

Gràcies a tots.

Als meus pares

“Pels camins costeruts s’aprèn el goig de viure,
més enllà del desig compartit i esperat per tots
hi ha la terra i la gent i el goig de no sentir-se
mai sol en el camí on aprenem a estimar”.

Miquel Martí i Pol

El savi mai diu allò que pensa, però pensa tot allò que diu.

Aristòtil

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ.....	3
1.1. Consideracions generals.....	3
1.2. Els <i>biofilms</i>	6
1.2.1. Definició i ecofisiologia.....	6
1.2.2. Formació d'un <i>biofilm</i>	8
1.2.3. Composició dels <i>biofilms</i> .Els exopolímers.....	11
1.2.4. Regulació del procés de formació del <i>biofilm:quorum sensing</i>	14
1.3. <i>Biofilms</i> i resistència als antibiòtics.....	15
1.4. Implicacions sanitàries dels <i>biofilms</i>	18
1.4.1. <i>Biofilms</i> en implants mèdics.....	21
1.4.2. Noves estratègies d'intervenció davant infeccions produïdes per <i>biofilms</i>	22
1.5. Els <i>biofilms</i> en l'àmbit industrial.....	24
1.5.1. El paper dels <i>biofilms</i> en la bioremediació.....	24
1.5.1.1 Interaccions dels microorganismes amb metalls.....	26
1.5.2. Problemes ocasionats pels <i>biofilms</i>	28
1.5.2.1. Implicacions en edificis, monuments i vaixells.....	29
1.5.2.2. Les biopel·lícules en sistemes intercanviadors de calor i en la indústria alimentària.....	30
1.5.2.3. Corrosió de canonades.....	31
i. Estratègies anti- <i>biofouling</i>	32
i. El coure.....	34
1.5.2.4. Implicacions dels <i>biofilms</i> en l'aigua de beguda.....	33
2. OBJECTIUS	39
3. MATERIAL I MÈTODES.....	43
3.1. El microorganisme.....	43
3.1.1. Caracterització.....	43
3.1.2. Manteniment.....	43

3.1.3. Conservació.....	43
3.2. Determinació de la concentració mínima inhibidora (CMI).....	44
3.2.1 Adaptació de la soca.....	44
3.3. Captació de coure per cèl·lules bacterianes.....	45
3.3.1. Preparació de l'inòcul.....	45
3.3.2. Presa de mostra.....	47
3.3.3. Estudis de captació a pHs àcids.....	48
3.4. Determinació de l'estructura cristal·lina del coure.....	48
3.5. Tècniques de microscòpia.....	48
3.5.1. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).....	48
3.5.1.1. Procés de fixació de la mostra.....	48
3.5.1.2. Procés d'osmificació.....	48
3.5.2. Microanàlisi de Raigs X.....	50
3.6. Producció d'exopolisacàrid (EPS).....	50
3.6.1. Preparació de l'inòcul.....	50
3.6.2. Obtenció de l'exopolisacàrid.....	52
3.7. Captació de coure per l'exopolisacàrid.....	52
3.8. Captació de coure per cèl·lules productores d'exopolisacàrid.....	53
3.9. Captació de coure provinent d'un tros de canonada.....	55
3.10. Aïllament de soques bacterianes causants de <i>biofouling</i>	56
3.10.1. Aïllament de soques.....	56
3.10.2. Identificació i conservació de soques.....	56
3.10.3. Determinació de la CMI de les soques aïllades.....	56
3.11. Captació de coure d'una soca aïllada d'una canonada de coure.....	57
3.12. Captació de coure provinents de cupons de coure.....	58
3.13. Estudis microscòpics de la formació de biopel·lícules.....	58
3.13.1. Microscòpia Electrònica de Rastreig (SEM).....	58
3.13.1.1. SEM de les superfícies dels cupons de coure.....	58
3.13.1.2. SEM sobre un tros de canonada de coure.....	58
3.13.2. Obtenció d'imatges a partir d'electrons retrodispersats.....	59
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	63
4.1. Determinació de la CMI.....	63
4.2. Captació de coure per <i>Agrobacterium radiobacter</i> EPS-916.....	64

4.3. Estudi de l'influència dels pHs àcids en la captació de coure.....	64
4.4. Captació de coure per l'exopolisacàrid.....	77
4.5. Captació de coure per cèl·lules productores d'EPS.....	79
4.6. Determinació de l'estructura cristal·lina del coure.....	82
4.7. Observació d' <i>Agrobacterium radiobacter</i> per TEM i microanàlisi.....	84
4.8. Captació de coure a partir d'una canonada. Aïllament de microorganismes.....	88
4.9. Captació de coure a partir de cupons de coure.....	93
4.10. Observació de <i>biofilms</i> formats sobre la superfície dels cupons de coure.....	101
4.11. Observació de <i>biofilms</i> formats sobre la superfície d'una canonada de coure...	111
5. CONCLUSIONS.....	119
6. BIBLIOGRAFIA.....	123

1. INTRODUCCIÓ

1.1 CONSIDERACIONS GENERALS. OBJECTE I INTERÈS

La nostra percepció d'entendre el bacteri com una forma de vida unicel·lular està profundament arrelada. D'ençà que els bacteris poden, en un sentit estricte, ser diluïts a una sola cèl·lula i ser estudiats en medis de cultiu líquids, ha permès fer nombrosos estudis de diferents activitats microbianes. Malgrat que aquest camí tradicional de cultivar els bacteris en medis líquids s'ha fet palès en estudis de patogenicitat bacteriana i gràcies als quals, han sortit a la llum facetes sorprenents de la fisiologia dels microorganismes, és difícil conèixer com existeix el bacteri realment en la natura (O'Toole *et al.*, 2000).

Els hàbitats naturals dels procariotes són remarcablement diversos (Whitman *et al.*, 1998). Poden habitar qualsevol ambient que sigui apropiat per a viure-hi, fins i tot en llocs on la majoria de formes de vida superior trobarien inacceptables (Madigan *et al.*, 1997). Malgrat tot, i donades les seves característiques, els bacteris prefereixen formar comunitats i viure adherides a les superfícies (Dunne, 2002). Zobell i els seus col·laboradors a principis del segle passat van reconèixer aquesta tendència com una característica habitual de les poblacions bacterianes aquàtiques (Zobell, 1943). De fet, aquestes primeres observacions varen proporcionar les primeres idees sobre els models d'adhesió bacteriana, aportant, alhora, importants eines analítiques i moleculars.

Encara que es pot aprendre molt a partir d'aïllats específics en condicions de laboratori (Dixon, 2006), és estudiant les comunitats polimicrobianes en el món real com sorgeixen els reptes més formidables, ja que els microorganismes en el seu hàbitat natural es troben formant biopel·lícules lligades a superfícies i no en estat lliure o planctònic (Ramage *et al.*, 2005).

Van Leeuwenhoek va ser el primer en descriure com els microorganismes s'adhereixen i creixen sobre les superfícies. Els seus estudis varen revelar els tipus d'associacions que s'establien entre els microorganismes i el substrat. En ecosistemes

aquàtics naturals els microorganismes que viuen associats a superfícies excedeixen el nombre de microorganismes que estan lliures en suspensió (Donlan, 2002).

Així doncs, els *biofilms* o biopel·lícules poden ser definits com a comunitats de microorganismes unides a una superfície (O'Toole *et al.*, 2000), o com un conjunt estructurat de microorganismes i els seus productes extracel·lulars típicament lligats a superfícies vives o inertes (Costerton, 1994).

L'estudi dels *biofilms* bacterians va començar fa aproximadament tres dècades amb el redescobriment que, en els sistemes aquàtics naturals, els bacteris es troben predominantment units a les superfícies (Geesey *et al.*, 1977).

D'acord amb Costerton (1987), la majoria de microorganismes poden formar *biofilms* i més d'un 99% de tots els microorganismes presents a la terra estan vivint formant part d'aquests agregats. Fins i tot es poden formar en ambients extrems, com per exemple, en mines àcides on el pH és aproximadament zero, on elles mateixes contribueixen en el cicle del sofre (Edwards *et al.*, 2000).

El terme *biofouling* (de l'anglès *fouling*, embrutiment) fa referència al creixement indesitjat damunt les superfícies dels *biofilms* (Fleming, 2002). Aquest fenomen pot abocar en un ampli ventall de situacions que van, per exemple, des de sistemes de refrigeració, línies d'injecció d'aigua, sistemes de tractament d'aigües residuals fins a diferents tipus de canonades, membranes d'osmosi reversa, i sistemes de distribució d'aigua potable (Videla, 2002). La formació de la capa de *biofouling* inclou la sedimentació de material inorgànic que precipita a sobre d'una superfície (*mineral fouling*), el dipòsit de substàncies orgàniques com olis (*organic fouling*), *fouling* de partícules com silicat o argila i, per últim, l'adhesió de microorganismes sobre la superfície i el desenvolupament del *biofilm* (Fleming, 2002).

El *biofouling* pot ser considerat com un reactor productor de *biofilm* en un lloc i en un temps equivocats. Aquest fenomen es pot donar en un rang de situacions molt ampli, des de la colonització d'implants mèdics, bucs de vaixell, canonades, fins als processos que afecten la qualitat de l'aigua de beguda (Fleming, 2002).

Com a resultat de la formació de *biofilms* al llarg de la xarxa de distribució d'aigua, aquests microorganismes i els seus productes poden contribuir a l'alliberament d'aquest tipus de cèl·lules i matèria orgànica, i lligats amb ells, quantitats de coure que poden suposar un perill per a la salut pública. Un altre fet relacionat és la biocorrosió o la corrosió causada per microorganismes, entenent per ella la deterioració accelerada dels metalls com a resultat d'interaccions, freqüentment sinèrgiques, entre la superfície d'aquests i cèl·lules bacterianes i els seus productes (Beech i Sunner, 2004).

La contaminació de l'aigua de beguda està relacionada amb els sistemes domèstics de canonades de coure. Aquesta té lloc a causa de la corrosió lenta i progressiva de les superfícies de les canonades, coneguda amb el nom de cuprosolvència. La química pròpia de l'aigua, els corrents elèctrics i les condicions medioambientals poden influir en l'oxidació potencial del coure (Dutkiewicz *et al.*, 1998).

Aquest treball posa en evidència que certs microorganismes que ja varen demostrar la seva capacitat d'acumular metalls, es poden desenvolupar en superfícies de coure i el poden acumular intracel·lularment, a més de formar *biofilms* quan el temps de contacte entre el bacteri i la superfície és elevat. Això comporta, a llarg termini, una oxidació parcial del metall que és susceptible d'alliberar-se a l'aigua comprometent a vegades els límits establerts en la legislació pertinent.

1.2 ELS *BIOFILMS*

1.2.1 *Definició i ecofisiologia*

Els *biofilms* poden ser definits com a comunitats de microorganismes unides a una superfície (O'Toole *et al.*, 2000), incloses dins d'una matriu polimèrica que elles mateixes produeixen, adherint-se, gràcies a ella, a superfícies vives o inertes (Costerton, 1999).

Malgrat que investigadors com Henrici i Zobell van reconèixer i estudiar els bacteris units a superfícies fa més de setanta anys, és tot just ara quan es comença a valorar el significat de les comunitats en els *biofilms* (Davey i O'Toole, 2000). Amb l'arribada del microscopi electrònic i altres tècniques es varen poder estudiar amb molt més detall (Donlan, 2002). Avui, es reconeix que la majoria d'espècies bacterianes, si no totes, poden formar biopel·lícules (Kolter i Greenberg, 2006).

Hi ha tres ingredients bàsics per a la formació d'un *biofilm*: microorganismes, glicocàlix i superfície. Si un d'aquests components desapareix, el *biofilm* no es desenvolupa (Dunne, 2002).

La formació d'un *biofilm* té lloc a través de passos seqüencials en els quals es comença amb la unió inicial de bacteris planctònics a una superfície sòlida, seguida de la proliferació en agrupaments de cèl·lules en multicapes que es van acumulant i, finalment, en la formació de la comunitat bacteriana dins de la matriu polimèrica autoproduïda (Lasa, 2006).

El cicle biològic d'una biopel·lícula inclou iniciació, maduració, manteniment i destrucció. El bacteri inicia el desenvolupament de la biopel·lícula en resposta a unes senyals específiques, com pot ser la limitació de nutrients (O'Toole, 2000). Uns estudis genètics han demostrat que els *biofilms* es formen en una sèrie d'etapes, on internen senyals intracel·lulars (Davies *et al.*, 1998); així com també s'ha demostrat que els perfils de transcripció genètica són diferents als que tenen lloc en cèl·lules planctòniques (Pringent-Combaret *et al.*, 1999).

Taula 1.1. Resum d'alguns dels beneficis ecològics que obtenen els bacteris de formar *biofilms* (Fleming, 2002)

Funció	Benefici
Adhesió a les superfícies	Requisit indispensable per començar el desenvolupament del <i>biofilm</i>
Formació d'agregats de cèl·lules, formació de flòculs i <i>biofilms</i>	Immobilització de cèl·lules Augment de la densitat cel·lular
Formació de l'EPS, com element estructural bàsic del <i>biofilm</i>	Estabilitat mecànica Concentració de gradients Retenció d'enzims extracel·lulars Desenvolupament de microconsorcis Transport mitjançant canals Intercanvi de senyals moleculars
Barrera protectora	Tolerància a biocides, toxines i metalls Protecció de la fagocitosi Protecció davant algunes espècies de depredadors
Propietats d'absorció	Acumulació de nutrients Retenció d'aigua, protecció de la dessecació Acumulació de contaminants de fangs, llots...

Per determinar si la formació d'un *biofilm* constitueix una forma de desenvolupament microbià, aquest s'ha d'entendre com el conjunt de canvis en la forma i en la funció que juga un paper important en la vida de l'organisme (Shimkets, 1999). En ambients naturals el *biofilm* està format per una comunitat de multiespècies microbianes, amb la finalitat de compartir el seu material genètic, amb la formació de diferents nínxols a dins del *biofilm* (Watnick i Kolter, 2000).

Una superfície neta posada en un ambient aquós ràpidament es revesteix d'una capa de ions i molècules orgàniques formant una primera capa o film d'acondicionament. Aquesta primera capa funciona alterant les característiques de la superfície i proporcionant una font d'aliments en ambients oligotròfics (Walker, 2000).

Els microorganismes s'associen a la superfície possiblement perquè són atrets pels ions acumulats, altres nutrients i humitat (Kolter *et al.*, 2006).

Les biopel·lícules es poden formar en un nombre elevat de diferents ambients i, a causa de les complexitats referents a l'estructura del *biofilm* format sota una sèrie de paràmetres, són únics per aquell ambient i microflora (Sutherland, 2001). Així, per exemple, els *biofilms* formats en roques submergides en els drenatges de les mines són molt diferents dels que es formen a les exposades a l'aire de les dents (Branda *et al.*, 2005).

S'han estudiat *biofilms* en ambients molt diversos com els formats pels cianobacteris en aigües termals (Ramsing *et al.*, 2000), i investigacions recents han conduït a l'estudi dels *biofilms* formats en fissures i cavitats de roques granítiques de l'Antàrtida (De los Ríos *et al.*, 2007).

Altres tipus de biopel·lícules estan associats a partícules en suspensió de material orgànic i inorgànic en ambients marins. S'ha demostrat que aquestes partícules microscòpiques, sovint referides com a neu marina, són riques en biomassa microbiana, nutrients i traces de metalls, i estan implicades en transformacions biogeoquímiques de partícules orgàniques de carboni en el plàncton (Paerl *et al.*, 1996).

Malgrat la importància de les comunitats microbianes associades a aquestes partícules, sovint no estan completament estudiades, però, amb tot, s'han detectat en aquestes partícules, processos de metanogènesi (Karl *et al.*, 1994), fixació de nitrogen (Paerl *et al.*, 1987) i producció de sulfat, la qual cosa indica activitat microbiana.

De totes maneres, els *biofilms* més estudiats són aquells que per les seves repercussions sanitàries (colonització de vàlvules cardíaques, catèters, pròtesis...) o les implicacions que tenen a nivell industrial generen una despesa econòmica important (Costerton, 1999).

1.2.2 Formació d'un biofilm

El procés d'adhesió bacteriana a una superfície (viva o inerta) és un procés que està afectat per nombroses variables, incloent el tipus d'espècie bacteriana, la composició de la superfície i factors ambientals (Dunne, 2002). A més, la hidrodinàmica del medi aquós on es formarà la biopel·lícula és un altre factor que en determinarà la formació (Donlan, 2002).

La formació d'un *biofilm* és un procés que inclou cinc fases:

- Adhesió reversible.
- Adhesió irreversible amb la producció de molècules que faciliten la fixació del microorganisme a la superfície com exopolisacàrids i adhesines.
- Desenvolupament del *biofilm* caracteritzat per tenir forma de bolet.
- Maduració del *biofilm*.
- Dispersió del *biofilm* (Barnhart i Chapman, 2006).

La primera d'elles constitueix el trobament casual o no entre un microorganismes de vida lliure i una superfície. Aquesta fase és reversible i està lligada al nombre de variables fisicoquímiques que defineixen les interaccions entre la superfície cel·lular bacteriana i la superfície en qüestió. El microorganisme es pot aproximar a la superfície aleatòriament com, per exemple, per corrents d'arrossegament, o bé d'una manera directa mitjançant fenòmens de quimiotaxis i mobilitat (Dunne, 2002).

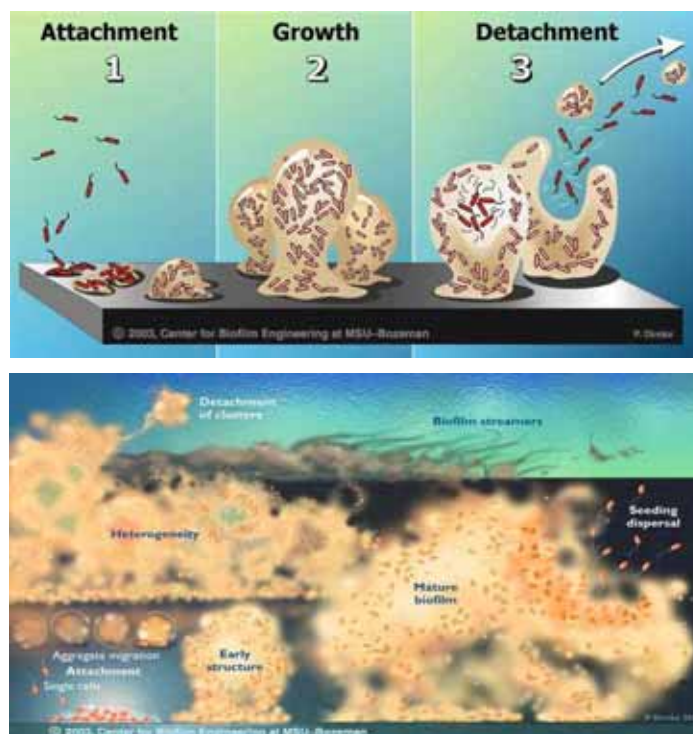


Fig. 1.1. Les imatges mostren les tres fases que tenen lloc en la formació d'un *biofilm*: adhesió, creixement i dispersió del *biofilm*. La formació de les biopel·lícules és un procés complex causat per l'heterogeneïtat dels microorganismes que, en elles, s'hi poden trobar (© 2003 Center for *Biofilm* Engineering at MSU-Bozeman).

Quan la distància entre les dues superfícies és inferior a 1 nanòmetre, l'adhesió depèn del balanç entre les forces atractives o repulsives que es generen entre les dues superfícies. Les interaccions electrostàtiques tendeixen a afavorir la repulsió, ja que tant la superfície bacteriana com les superfícies inertes estan carregades negativament. *Stenotrophomonas maltophilia* és una excepció a aquesta norma general, ja que la càrrega positiva superficial total d'aquest microorganisme, a un pH fisiològic pot promoure l'adherència primària a materials negativament carregats com el tefló (Jucker *et al.*,1996).

La segona fase de l'adhesió és l'ancorament per unions específiques entre adhesines i la superfície. En aquesta fase els microorganismes consoliden l'adhesió produint grans quantitats d'exopolímers que complexen amb els materials de la superfície, o bé, aquesta interactua amb receptors específics localitzats en estructures pròpies dels bacteris, com poden ser els pillis o les fimbries (Dunne, 2002) .

Aquesta també pot esdevenir de manera no específica, mitjançant forces de Wan der Waals, forces electrostàtiques o ponts d'hidrogen (Vandevivere i Kirchman, 1993).

Al final d'aquesta etapa l'adhesió arriba a ser irreversible sense la necessitat de la intervenció física o química, ja que el microorganisme queda enganxat fermament a la superfície del substrat. Quan els microorganismes estan adherits amb seguretat a la superfície, comença el procés de maduració del *biofilm* (Stoodley *et al.*,2002).

La maduració de la biopel·lícula generarà una arquitectura complexa, amb canalicles, porus i la redistribució dels bacteris per tota la superfície (Davies *et al.*,1998). El pH intern del *biofilm*, així com la perfusió d'oxigen, les fonts de carboni i l'osmolaritat són factors que controlen la maduració dels *biofilms* (Dunne, 2002).

Investigacions recents en *biofilms* madurs de *Pseudomonas aeruginosa* han demostrat la presència de proteïnes radicalment diferents de les aïllades en formes lliures del mateix microorganisme. Se n'han trobat més de tres-centes que no es detecten en el cas de cèl·lules planctòniques. Aquestes proteïnes poden pertànyer tant al grup de proteïnes implicades en el metabolisme, fosfolípids, molècules implicades en la biosíntesi del LPS, com les que participen en el transport de membrana i secrecions, així com aquelles relacionades en mecanismes d'adaptació i protecció (Sauer *et al.*,2002).

L'equilibri del *biofilm* depèn, d'una banda, de la disponibilitat dels nutrients i, de l'altra, de les condicions ambientals. Alguns microorganismes produeixen substàncies que degraden la matriu polimèrica per ajudar al llançament de cèl·lules del *biofilm* en resposta a les condicions ambientals (Lee *et al.*, 1996). L'estructura del *biofilm* ve determinada per l'ambient on es desenvolupa, per la disponibilitat de nutrients, dels organismes presents, per les propietats fisicoquímiques de la interfase i de la hidrodinàmica de la fase circumdant (Walker *et al.*, 2000).

Les condicions físiques i nutricionals afecten enormement la naturalesa dels *biofilms* de laboratori i són igualment aplicables a altres tipus de *biofilms* (Stoodley *et al.*, 1999). També s'està suggerint que l'estructura del *biofilm* està principalment determinada per la concentració de substrat.

1.2.3 Composició dels biofilms. Els exopolímers

El gran ventall d'ambients on es poden desenvolupar els microorganismes, fan suggerir que existeixen altres estructures dins d'un *biofilm*. La major part de l'estructura d'un *biofilm* és la matriu d'exopolisacàrid (EPS), produït pels microorganismes, que sovint conté components orgànics i inorgànics de l'ambient que l'envolta (Marshall, 1992). L'EPS pot arribar a representar d'un cinquanta fins a un noranta per cent del carbó orgànic present en el *biofilm*.

Si bé la composició dels EPS varia depenent dels organismes presents en el *biofilm* i de les condicions ambientals (Parsek i Fuqua, 2004), el component majoritari d'aquesta matriu és l'aigua, aproximadament en un 97% (Sutherland, 2001). Es formen canalicles d'aigua entre les microcolònies, que constitueixen una espècie de sistema circulatori primitiu, aportant els nutrients necessaris, i emportant-se els productes de desfet de les comunitats de cèl·lules (Costerton, 1995).

Químicament, els EPS són extremadament heterogenis i contenen un nombre de constituents de diferents sacàrids i de components de naturalesa no sacarídica (Alison i Sutherland, 1987). D-glucosa, D-galactosa i D-manosa són els sucres més comuns, amb la D-fructosa i la R-ramnosa que freqüentment hi són presents. Alguns poden contenir sucres més estranys com L-hexoses o aminosucres (Skillman *et*

al., 1999). Molts són polianiónics, a causa de la presència de piruvat i àcids urònics, més freqüentment glucurònic i galacturònic (Sutherland, 1995).

En bacteris gram negatius els EPS són bàsicament aniònics i aquesta propietat fa que es puguin associar amb cations divalents com el calci o el magnesi, conferint unions de gran estabilitat afavorint així el desenvolupament del *biofilm*. En el cas d'alguns bacteris gram positius sembla que la naturalesa catiónica dels seus exopolímers els confereix propietats diferents (Donland, 2002).

Un dels més ben estudiats i caracteritzats de tots és l'alginant, el qual s'ha demostrat que forma part de la matriu que envolta els *biofilms* formats de *Pseudomonas aeruginosa* en infeccions pulmonars i en sistemes d'aigua industrials (Stoodley *et al.*, 2002).

Els polisacàrids poden formar diferents tipus d'estructures a dins del *biofilm*. Amb tot, els polisacàrids a dins del *biofilm* no existeixen exclusivament, i actuen recíprocament amb una àmplia gamma d'espècies moleculars, fins i tot amb lecitines, proteïnes, lípids, així com amb altres polisacàrids. L'estructura terciària resultant comprèn una xarxa polisacàridica d'altres macromolècules on també queden atrapades cèl·lules i productes d'aquestes (Sutherland, 2001).

Els EPS juguen un paper important en les interaccions de les diferents espècies que es troben a dins del *biofilm*, així com en les etapes d'adhesió inicial. Alguns microorganismes sintetitzen EPS, els quals formen part integral de tots el *biofilms* i poden representar fins a un 95% de la biomassa total. Amb tot, una producció excessiva d'EPS pot dispersar els bacteris de la suspensió i impedir que s'adhereixin a les superfícies (Marshall, 1992). Les propietats químiques i físiques dels EPS afectarà la seva capacitat d'adhesió. La seva habilitat per superar les barreres repulsives d'energia de les superfícies i la seva participació en interaccions específiques influeixen en l'adhesió inicial (Skillman *et al.*, 1999).

Els EPS han estat estudiats, a més, en la captació de metalls, cations i toxines. *Pseudomonas sp.* EPS-5028 produeix grans quantitats d'exopolimers amb fonts de carboni diferents (Congregado *et al.*, 1985) i, a més, ha mostrat evidències que és capaç d'acumular urani (Marqués *et al.*, 1990).

Algunes de les estratègies actuals per combatre els problemes ocasionats per la formació de *biofilms* orals causants entre d'altres de peridontitis, consisteix a modificar genèticament un operó que intervé en la síntesi de l'EPS, inhibint-ne així la formació o fent-lo menys resistent (Honma *et al.*, 2007).

Els EPS poden ser visualitzats com a fines cordes lligades a la superfície cel·lular bacteriana formant una complexa xarxa que envolta tota la cèl·lula (Sutherland, 2001). Les forces majoritàries involucrades en aquestes unions són de tipus electrostàtiques i unions d'hidrogen (Mayer *et al.*, 1999).

El fet que la majoria dels glicocàlix siguin majoritàriament aniònics fa que es creï un sistema eficient d'escombrat per interceptar i concentrar els minerals i nutrients essencials de l'ambient cap a l'interior del *biofilm* (Costerton, 1987).

La matriu d'exopolímer és necessària tant en les primeres fases de la formació del *biofilm* per afavorir-ne l'adhesió, com en les últimes fases, ja que proporciona una estructura estable on els microorganismes poden residir (Walker *et al.*, 2000). A més, el glicocalix no és important només per protegir les cèl·lules de l'ambient, sinó que ofereix una barrera de protecció davant d'agents antimicrobians (Costerton *et al.*, 1994).

Malgrat que els EPS juguen un paper important i a vegades essencial per la formació de la matriu que embolcalla el *biofilm*, recents investigacions suggereixen que hi ha una grup de proteïnes de superfície que tindrien un paper rellevant durant la formació de les comunitats microbianes. La primera d'aquestes proteïnes descrites es l'anomenada Bap aïllada en mastitis bovina produïda per *Staphylococcus aureus* (Lastasa *et al.*, 2006).

1.2.4 Regulació del procés de formació del biofilm: importància del *quorum-sensing*

Nombroses evidències experimentals suggereixen que el procés de formació de les biopel·lícules està regulat per una complexa cascada de reguladors. Estudis recents atorguen un paper primordial en el control de la formació del *biofilm* a un sistema de comunicació entre els microorganismes anomenat *quorum-sensing*, que actua com un autèntic llenguatge mitjançant senyals químiques (Mateo i Maestre, 2004). Aquest fenomen va ser estudiat per primer cop a la dècada dels setanta, quan Hastings i els seus col·legues estudiaven la producció de llum de *Vibrio fischeri* (Welch *et al.*, 2006). Aquest sistema funciona com un “acord” (*quorum*) entre les cèl·lules bacterianes, per l'activació o repressió de gens específics (entre ells els que regulen la producció del *biofilm*), mitjançant l'alliberació i la detecció de certes substàncies anomenades autoinductores, les quals s'uneixen a receptors dels microorganismes, la qual cosa produeix canvis en l'expressió gènica (Keller i Surette, 2006).

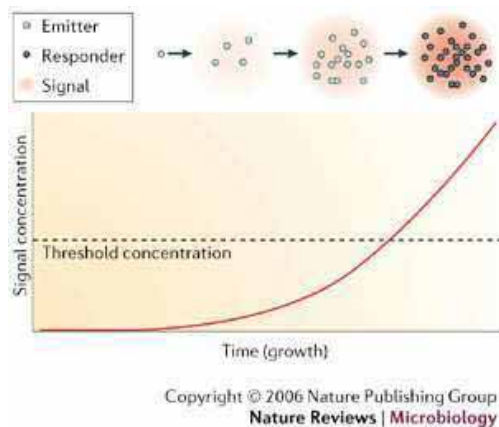


Fig. 1. 2 Esquema genèric on es mostra el funcionament del *quorum-sensing* (Keller i Surette, 2006).

Aquest sistema de comunicació descriu un ampli ventall de fenòmens pels quals les cèl·lules bacterianes controlen, a més de la formació de les biopel·lícules, gran varietat de fenotips com la producció de toxines, factors de virulència, exopolisacàrids i la mobilitat que resulta essencial per establir relacions de patogenicitat o simbiosi amb hostes eucariotes (Marketon *et al.*, 2003).

Malgrat que molts dels mecanismes moleculars i els factors que participen en aquest control encara estan per aclarir, McLean *et al.* (1997) va demostrar la presència d'acyl-HSL (acyl homoserines) detectables en diferents *biofilms*, cosa que indica que les comunitats de *biofilms* contenen cèl·lules capaces d'experimentar una regulació gènica depenent de la densitat cel·lular. L'acylhomoserina lactona és el principal autoinductor de bacteris gram negatius mentre que en microorganismes gram positius els agents autoinductors són pèptids. En altres estudis sobre el *quorum-sensing* que regula la formació del *biofilm* de *P.aeruginosa* suggereixen que hi ha, almenys, dues vies de senyals (*las* i *rhl*) que actuen seqüencialment (Davies *et al.*, 1998).

S'ha identificat una molècula denominada furanona produïda per l'alga *Delisea pulcra* amb una estructura similar a les acylhomoserines lactones. Aquesta molècula s'uneix als mateixos receptors, però enlloc d'activar-los els bloqueja, inhibint la consegüent formació del *biofilm*. En l'actualitat s'està intentant desenvolupar inhibidors de la formació de les biopel·lícules basats en derivats de la furanona, ja que aquesta molècula és extremadament tòxica. De manera similar amb *S.aureus sp* ha descrit un pèptid anomenat RIP, que inhibeix un sistema de *quorum-sensing* i el procés de formació del *biofilm* (Lasa *et al.*, 2006).

Així doncs, la formació d'un *biofilm* és un procés multifactorial que inclou complexes interaccions entre diferents sistemes de *quorum-sensing* i factors ambientals (Welch *et al.*, 2005).

1.3 BIOFILMS I RESISTÈNCIA ALS ANTIBIÒTICS

La naturalesa de l'estructura del *biofilm* i les qualitats fisiològiques dels organismes que hi viuen, confereixen una resistència inherent als agents antimicrobians, incloent antibiòtics, desinfectants i germicides (Donlan i Costerton, 2002).

La característica que millor distingeix les infeccions cròniques relacionades amb els *biofilms* de les infeccions agudes és la seva resposta a tractaments antibiòtics. Les infeccions causades per *biofilms* no assolixen ser completament eliminades, produint-se episodis recurrents d'infecció (Lasa *et al.*, 2006).

El fet que quan els bacteris es dispersen del *biofilm* són ràpidament susceptibles als antibiòtics, suggereix que la resistència dels microorganismes en el *biofilm* no és adquirida majoritàriament mitjançant mutacions o elements genètics (Stewart i Costerton, 2001).

Si bé les bases de la resistència bacteriana en el *biofilm* encara s'estan investigant, hi ha tres hipòtesis de mecanismes que podrien explicar aquesta realitat i són les següents:

- Resistència a la penetració de l'antimicrobià per part de la matriu d'exopolímer.
- Creixement alentit dels bacteris del *biofilm*, causat per la limitació de nutrients.
- Expressió d'un fenotip específic per part dels microorganismes que formen el *biofilm* (Lewis, 2001).

La producció d'exopolímers és un dels trets característics dels *biofilms*. La primera de les tres hipòtesis recolza que les substàncies polimèriques que constitueixen aquesta matriu evita o retarda la penetració de l'antimicrobià a l'interior del *biofilm* actuant així de barrera (Fah *et al.*, 2001).

Amb tot, diferents estudis en els quals s'ha mesurat la penetració d'antibiòtics en els *biofilms* de *P. aeruginosa* han demostrat que la matriu del *biofilm* altera la velocitat de penetració dels antibiòtics (les fluoroquinolones penetren ràpidament i els aminoglucòsids més lentament), però en principi tots els antibiòtics assajats són capaços de penetrar a l'interior en unes hores i assolir nivells de concentració bactericides (Lasa *et al.*, 2006). Moltes vegades, en els casos en què es veuen involucrades molècules petites d'antimicrobians, la matriu de polisacàrid posposa la mort de les cèl·lules. Així doncs, al restringir la difusió, protegeix al *biofilm* de la seva degradació per part de l'antimicrobià. El retard en la difusió disminueix la concentració de l'antimicrobià que en entra en el *biofilm*, facilitat així l'acció d'enzima que destrueix l'agent antibiòtic, com per exemple les β -lactamases. Aquest sinergisme entre el retard de la difusió i la degradació, proporciona resistència als *biofilms* de *Pseudomonas aeruginosa* que expressen β -lactamases (Mesaros *et al.*, 2007)

En alguns estudis amb soques de *K.pneumoniae* que formen *biofilms* s'ha demostrat que la velocitat en què l'antibiòtic és desactivat en les capes més externes del *biofilm* és més gran que la velocitat pròpia de difusió (Anderl *et al.*, 2000).

Malgrat tot, el nombre d'estudis de difusió d'antibiòtics en els *biofilms* no és encara massa gran, la qual cosa reflecteix les dificultats tècniques que impliquen aquest tipus d'investigacions, i moltes vegades els resultats obtinguts no són del tot concloents (Lewis, 2001).

La segona de les hipòtesis depèn de la química del microambient que envolta el *biofilm*. Els gradients de concentració de nutrients que existeixen dins de les biopel·lícules és una característica ben coneguda dels *biofilms* (Stewart i Costerton, 2001). Investigacions amb minielectrodes han demostrat que l'oxigen es consumeix completament en les capes més superficials del *biofilm*, creant-se nínxols anaeròbics a les capes més internes de la biopel·lícula (de Beer *et al.*, 1994). Aquesta hipòtesi explica que la disminució de la susceptibilitat dels antibiòtics seria el resultat que alguns microorganismes experimenten una limitació de nutrients i existeixen en un estat de creixement lent. Aquestes cèl·lules són menys susceptibles a l'acció d'alguns agents antimicrobians (Costerton, 1999).

La tercera de les hipòtesis fa referència a la possibilitat d'un únic fenotip que seria adoptat pels microorganismes que constitueixen la biopel·lícula (Mah i O'Toole, 2001). Hi ha estudis que suggereixen que els microorganismes poden adoptar aquest fenotip desenvolupant la resistència a l'antimicrobià, a vegades fins i tot en *biofilms* joves quan encara són massa prims perquè la matriu exopolimèrica pugui resultar una barrera afectiva (Chambless *et al.*, 2006).

Hi ha molts treballs enfocats a intentar identificar quins gens són activats o "reprimits" en els *biofilms* en comparació amb les cèl·lules planctòniques (Kuchma i O'Toole, 2000).

L'expressió d'aquest fenotip pot estar induït per la limitació de nutrients, algun tipus d'estrès, una elevada densitat cel·lular o una combinació d'aquests fenòmens. Alguns dels mecanismes de resistència que poden estar induïts en els microorganismes del *biofilm* són, d'una banda, les "multidrug efflux pumps", que són

bombes que podrien extreure l'antibiòtic fora de les cèl·lules i, d'altra banda, alteracions en la composició de les proteïnes de membrana podrien disminuir la permeabilitat pels antimicrobians (Mah i O'Toole, 2001).

Un problema addicional de la pràctica clínica relacionada amb la resistència dels *biofilms* als antimicrobians és l'absència de mètodes estandarditzats d'ús rutinari per determinar la sensibilitat dels bacteris d'un *biofilm*. S'han realitzat intents per adaptar mètodes desenvolupats en laboratoris d'investigació, però encara no s'ha adoptat cap protocol estàndard per aquest fi. Entre aquests mètodes, destaquen per la seva facilitat per adaptar-se al diagnòstic clínic el mètode descrit per Amorena i els seus col·laboradors (1999) i el mètode anomenat "Calgary *biofilm* system" (Ceri *et al.*, 1999). En el primer d'ells la biopel·lícula es desenvolupa a sobre d'uns pouets i es posa en contacte amb diferents concentracions d'antimicrobià i el número de cèl·lules viables es quantifiquen mesurant la quantitat d'ATP per bioluminiscència. En el mètode de *Calgary biofilm system* el recompte es fa mitjançant el comptatge en medis de cultiu (Lasa *et al.*, 2006).

1.4. IMPLICACIONS SANITÀRIES DELS BIOFILMS

La demostració que els microorganismes podien causar malalties va proporcionar un gran impuls en el desenvolupament de la microbiologia. Quan Robert Koch (1843-1910) va emprendre la recerca bacteriològica, el concepte que certes malalties eren contagioses no era completament nou. Koch va procurar verificar els requisits per poder definir com a contagiosa una malaltia, proposats ja pel seu mentor Jacob Henle (Kaufman i Schaible, 2005). Basant-se en experiments realitzats sobre el carboncle causat per *Bacillus anthracis* i altres investigacions, va formular els següents criteris, que en l'actualitat reben el nom de postulats, per demostrar que un tipus concret de microorganisme és causa d'una malaltia específica. Aquests postulats es resumeixen en què l'organisme ha d'estar sempre present en l'hoste que pateix la malaltia i no en individus sans. Aquest mateix microorganisme ha de poder-se cultivar en cultiu pur fora del cos de l'hoste. Aquest cultiu, quan s'inocula a un animal susceptible, ha d'iniciar en ell els símptomes de la malaltia i el microorganisme ha de

poder ser reaïllat d'aquests animals d'experimentació i, cultivats de nou en el laboratori, han de demostrar les mateixes característiques que el microorganisme original (Brock, 2004).

Existeixen nombroses evidències epidemiològiques que relacionen els *biofilms* amb diferents processos infecciosos tal com es resumeix en la taula 2. La infecció pot estar associada a un teixit malmès, a un cos estrany o a un biomaterial, i inclou una sèrie de característiques comunes:

1. Colonització de substrats per bacteris formadors de *biofilms*.
2. Presència d'un biomaterial o d'un teixit malmès.
3. Iniciació d'infecció per petits inòculs bacterians.
4. Resistència del *biofilm* bacterià als mecanismes de defensa de l'hoste i a la teràpia antibiòtica.
5. Infeccions causades amb molta freqüència per *S.aureus*, *S.epidermidis* i *P.aeruginosa*.

Taula 1.2. Llista parcial d'infeccions humanes en les quals estan implicats els biofilms (Costerton i al., 1999)

<i>Infecció o malaltia</i>	<i>Microorganisme formador de biofilm</i>
Càries dental	Cocs gram positius acidògens (ex. Streptococcus)
Periodonditis	Bacteris anaeròbics orals gram negatius
Otitis mitjana	Soques no tipables de <i>H. influenzae</i>
Infeccions múscul-esquelètiques	Cocs gram positius (ex. Staphylococs)
Fascitis necrotitzant	Streptococs del grup A
Osteomelitis	Diverses espècies bacterianes i fúngiques
Prostatitis bacteriana	<i>E.Coli</i> i altres espècies gram negatives
Endocarditis de la vàlvula nativa	Streptococs del grup viridans
Pneumònia per fibrosi quística	<i>P.aeruginosa</i> i <i>B. cepacia</i>
Meloidosis	<i>P. pseudomallei</i>
Infeccions nosocomials	
- Pneumònia (cures intensives)	Bacils gram negatius
- Sutures	<i>S.epidermidis</i> i <i>S.aureus</i>
- Orificis de sortida	<i>S.epidermidis</i> i <i>S.aureus</i>
- Lents de contacte	<i>P.aeruginosa</i> i cocs gram positius
- Cistitis per catèters urinaris	<i>E.Coli</i> i altres bacils gram negatius
- DIU	<i>Actinomyces israeli</i> i molts altres
- Dispositius ortopèdics	<i>S.epidermidis</i> i <i>S.aureus</i>
- Vàlvules mecàniques del cor	<i>S.epidermidis</i> i <i>S.aureus</i>

6. Infeccions persistents causades per la resistència al tractament antimicrobià.
7. Presència d'inflamació.
8. Alteració de la resposta immunològica de l'hoste per la presència de biomaterial i bacteris (Gristina, 1994).

Algunes de les malalties infeccioses relacionades amb els *biofilms* bacterians són:

- **Endocarditis** resultant de la interacció de bacteris o fongs amb les vàlvules mitral, aorta, tricúspide o pulmonar. Els organismes responsables són, principalment, estreptococs i estafilococs. Quan hi ha una lesió en aquestes vàlvules, les cèl·lules endotelials secreten fibronectina que és utilitzada com a receptor per adhesines específiques de la superfície dels bacteris. Aquestes es multipliquen en la lesió i formen el *biofilm*, el qual accentua el mal augmentant el risc d'embòlies sèptiques. Un cop el *biofilm* s'ha establert, els tractaments antibiòtics resulten poc efectius (Lasa *et al.*, 2006).

- **Les malalties periodontals** (placa dental, gingivitis o destrucció crònica dels teixits periodontals) tenen una etiologia principalment bacteriana (Donlan i Costerton, 2002). Les comunitats microbianes que es poden trobar dins la cavitat bucal són associacions dinàmiques que poden incloure fins a cinc-centes espècies bacterianes capaces de formar *biofilms* en els diferents teixits de la boca (Foster i Kolenbrander, 2004).

- **Otitis i prostatitis**. En la primera els *biofilms* es formen en els tubs timpanostòmics que es col·loquen a l'oïde dels pacients per alleugerir la pressió timpànica (Donlan i Costerton, 2002). En el cas de la glàndula prostàtica es pot infectar per microorganismes que ascendeixen des de l'uretra, o bé, pel reflux d'orina contaminada. Si la infecció no es tracta des dels inicis es formen microcolònies que s'adhereixen a l'epiteli formant les biopel·lícules (Lasa *et al.*, 2006). La formació de soques d'*E.coli* en el tracte genito-urinari és el principal problema pel tractament i l'erradicació d'aquest tipus d'infeccions (Soto *et al.*, 2007).

- Malgrat nombroses investigacions, la formació de *biofilms* de *P.aeruginosa* en els pulmons dels pacients afectats de **fibrosi quística** és un dels enigmes pendents relacionats amb els *biofilms* (Parsek i Singh, 2003). Potser la característica més

important per la qual *P.aeruginosa* és capaç de persistir en els pulmons d'aquests pacients és la seva gran flexibilitat genètica. La seva capacitat de créixer en *biofilms* i la selecció de mutants amb un fenotip mucós són unes de les adaptacions que pateix el microorganisme, i juguen un paper crític en aquest tipus d'infeccions cròniques (Gómez i Prince, 2007). A més, aquestes biopel·lícules coexisteixen amb els *biofilms* formats per *Burkholderia cepacia*, que també té un paper important com a patogen oportunista dels pulmons d'aquests pacients (Cunha *et al.*, 2004).

Recents investigacions han demostrat la relació entre la presència de *Chlamydia pneumoniae* i arteriosclerosi. El microorganisme s'ha detectat en aquest tipus de lesions mitjançant diferents tècniques. Malgrat això, i malgrat que alguns estudis han conclòs que *C.pneumoniae* està present en els processos d' arteriosclerosi, altres ho neguen, dividint la comunitat mèdica (Leven i Hoymans, 2005).

1.4.1 *Biofilms* en implants mèdics

El paper dels *biofilms* en la contaminació d'implants mèdics està ben establert. La taula següent recull alguns exemples dels biomaterials susceptibles a ser contaminats, així com el microorganisme causant de la infecció i la patologia associada.

Taula 1.3. Llista parcial d'exemples d'infeccions d'implants (Davey i O'Toole, 2000)

<i>Implant</i>	<i>Microorganisme</i>	<i>Patologia associada</i>
Vàlvula protètica	<i>S. epidermidis</i> , <i>S.sanguis</i>	Endocarditis
Lents de contacte	<i>P.aeruginosa</i> , <i>S.epidermis</i>	Queratitis
Catèters intravasculars	<i>S.epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	Septicèmia, endocarditis
Catèters urinaris	<i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> (entre d'altres)	Bacteriúria
Tubs endotraqueals	<i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> (entre d'altres)	Pneumònia

Catèters venosos, urinaris, vàlvules cardíques, pròtesis articulars o tubs endotraqueals, entre d'altres, tenen un risc intrínsec de ser colonitzats per *biofilms* de diferents espècies bacterianes (Stoodley *et al.*, 2004).

Els microorganismes que més freqüentment estan associats a aquest tipus d'invasió són estafilococs (sobretot *S.epidermis* i *S.aureus*), seguit de *P.aeruginosa* i per tot un conjunt d'altres bacteris oportunistes que infecten l'hoste (Gotz, 2002).

En els últims anys tenen molta rellevància clínica els *biofilms* produïts per *Candida albicans*, responsable d'un alt percentatge de candidiasi, ja que és capaç de colonitzar un ampli ventall d'implants mèdics, que proporcionen les superfícies necessàries per a la formació de les biopel·lícules (Ramage *et al.*, 2006).

Una vegada que el bacteri s'ha adherit a la superfície de l'implant i ha format el *biofilm*, aquest actua com una font d'infecció, sobretot en pacients immunocompromesos. Els mecanismes pels quals el *biofilm* produeix els símptomes de la malaltia encara no estan completament establerts, tot i que s'ha suggerit que els microorganismes poden produir endotoxines, que es podrien desprendre agregats de bacteris cap al torrent sanguini, i que en general es tornen resistents a l'acció fagocitària de les cèl·lules del sistema immunitari i constitueixen així un nínxol idoni per a l'aparició de resistències als tractaments antibiòtics (Lasa *et al.*, 2006).

1.4.2 Noves estratègies d'intervenció davant d'infeccions *biofilms*

A causa de la poca resposta a les teràpies antibiòtiques, molt poques infeccions associades a implants es resolen satisfactòriament. Durant els últims anys s'han desenvolupat noves estratègies per al control i tractament d'aquest tipus d'infeccions. Un exemple d'elles intenta pal·liar els problemes que ocasionen els *biofilms* en pròtesis articulars. Més del 90% de les infeccions que es produeixen en les pròtesis articulars són causades per espècies d'estafilococs. Retirar una pròtesi infectada pot resultar traumàtic, ja que exigeix moltes vegades trencar part de l'os i extirpar també els teixits circumdants infectats. Això fa que els pacients hagin de rebre tractament endovenós d'antibiòtic i quedin confinats al llit durant mesos. Es calcula que d'un total de dues-centes mil artroplasties que es fan anualment als EUA prop de vuit mil resulten infectades, fet que suposa un cost anual que ronda els dos bilions de dòlars. Aquests costos justifiquen fàcilment la inversió per desenvolupar un implants intel·ligents (fig.1.3).

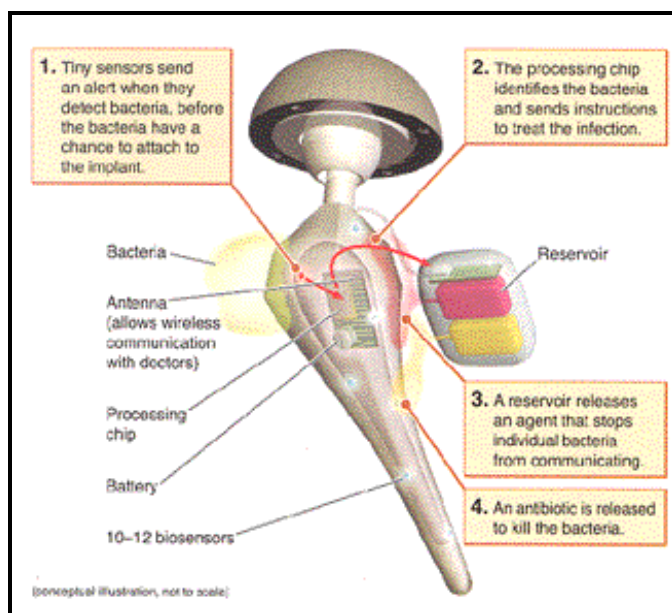


Fig. 1.3. Diagrama esquemàtic de l'implant intel·ligent segons Ehrlich *et al.*, 2004

Aquests implants serien capaços de detectar la presència en la superfície de patògens bacterians, bloquejar els seus sistemes de transducció de senyal, tractar la infecció incipient amb altes dosis d'antibiòtics localitzats i comunicar els resultats al personal responsable del pacient mitjançant telemetria. Per això es necessita un equip multidisciplinari que inclou enginyers, cirurgians i científics capaços d'identificar els problemes i desenvolupar plans pràctics per combatre'ls. Per assolir aquest propòsit, es necessitarà un fabricant que vulgui assolir els costos i la responsabilitat legal per poder produir aquest dispositiu (Ehrlich *et al.*, 2004).

Un altre exemple de noves estratègies per combatre les infeccions cròniques causades pels *biofilms* és el desenvolupament d'una vacuna contra els *biofilms* formats per *P.aeruginosa* en pacients afectats de fibrosi quística. Com que el sistema immunològic dels pacients afectats és competent, la vacunació activa podria ser una estratègia factible per a la prevenció d'aquest tipus d'infeccions. Després d'estudis anteriors, s'ha aconseguit una vacuna octavalent conjugada que combina els vuit serotips més prevalents amb l'exotoxina, Aerugen® , si bé l'eficàcia clínica no és la que s'havia esperat en un primer moment. Unes altres línies de recerca estan desenvolupant uns altres tipus de vacunes, una via intranasal, que donen resultats molt satisfactoris (Zuercher *et al.*, 2006).

1.5 ELS *BIOFILMS* EN L'ÀMBIT INDUSTRIAL

Les biopel·lícules en el camp industrial estan implicades en diversos àmbits, convertint-se en un problema quan estan involucrades en el *biofouling* o en aliades quan estan relacionades en la bioremeiació, ja que transformen agents contaminants en formes menys nocives.

1.5.1 *El paper dels biofilms en la bioremeiació*

La bioremeiació es pot donar en diferents escenaris. Alguns dels agents que poden ser sensibles han ser degradats o, en el millor dels casos, eliminats. Es resumeixen a la taula 1.4.

Els processos de tractament de les aigües residuals són pràcticament sistemes de cultiu bacterià a gran escala que utilitzen biopel·lícules en les quals les substàncies orgàniques es degraden a diòxid de carboni, gas metà i altres nutrients inorgànics. L'aigua residual es tracta a la part fonda de tancs on es posen en contacte els llots formats per les biopel·lícules unides a partícules molt petites. Un altre exemple de bioremeiació és quan s'aplica en sòls o aigües contaminades amb hidrocarburs com el petroli, ja que les biopel·lícules tenen un paper fonamental. Els bacteris oxidants dels hidrocarburs són capaços d'adherir-se a les gotes insolubles de petroli i d'aconseguir així la seva dispersió (Betancourth *et al.*, 2004). Aquests tipus de biopel·lícules poden estar formades per corinebacteris, micobacteris, algun tipus de llevat i, principalment, per espècies del gènere de *Pseudomonas* (Allen *et al.*, 2007). Amb tot, es requereixen condicions especials d'oxigen, temperatura, pH i nutrients, sense les quals la bioremeiació no es produeix.

Alguns treballs sobre la capacitat d'immobilització de contaminants inorgànics mitjançant transformacions microbianes, com processos d'absorció i mineralització, demostren el potencial que tenen certs microorganismes com a eines de la bioremeiació (Barkay i Schaefer, 2001). Alguns microorganismes redueixen els metalls en la respiració anaeròbica, causant la detoxificació i la precipitació si les formes reduïdes són menys tòxiques i menys solubles (Gadd, 2000) (Marques *et al.*, 1982).

Taula 1.4. Llistat d'alguns agents sensibles de ser degradats per microorganismes (Singh, 2006)

Pollutant	Reactor or experimental conditions	Organisms or culture	Overall efficiency of degradation
2-Chlorophenol	Silicone tube membrane bioreactor	Anaerobic sludge from a swine wastewater treatment plant	>90%
4-Chlorophenol	Granular activated-carbon biofilm reactor	Bacterial consortium from rhizosphere of <i>Phragmites australis</i>	70–100%
2,4-Dichlorophenol	Rotating perforated tube biofilm reactor	<i>Pseudomonas putida</i>	~100%
2,4,6-Trichlorophenol	Fluidized bed biofilm reactor	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>	~100%
2,3,4,6-Tetrachlorophenol	Fluidized bed biofilm reactor	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>	~100%
Pentachlorophenol	Fluidized bed biofilm reactor	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>	~100%
Pyrene, phenanthrene	Biofilm grown directly on liquid medium	<i>Polaromonas sp.</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Caulobacter</i> and <i>Variovorax sp.</i>	~50% (pyrene); ~98% (phenanthrene)
o-Cresol, naphthalene, phenol, 1,2,3-trimethylbenzene	Biofilm grown in NAPLs	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Not determined
n-Alkanes	Rotating biological contactors	<i>Prototheca zopfii</i>	~65%
Carbon tetrachloride	Continuous flow fixed biofilm reactor	<i>Providencia stuartii</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i>	~100%
Toluene	Hollow-fibre membrane biofilter reactor; continuously fed biodrum reactor	Secondary sludge from wastewater treatment plant; various aerobic and anaerobic bacteria	~84%; 65%
Acid Orange 10, 14	Laboratory-scale rotating drum biofilm reactor	<i>Methylosinus trichosporium</i>	~60%
Everzol Turquoise Blue G	Laboratory-scale activated sludge unit	<i>Coriolus versicolor</i>	~82%
MCPP; 2,4-D	Granular activated-carbon biofilm reactor	Mixed culture of herbicide-degrading bacteria	MCPP (partial); 2,4-D (complete)

L'habilitat que tenen els bacteris sulfat reductors (SRB) d'assimilar metalls tòxics d'aigües residuals mitjançant la formació de precipitats de sulfurs s'està aplicant en la bioremeiació (Whitte i Gadd, 2000). A més a més, nombrosos estudis reflecteixen com l'alta variabilitat genètica que tenen algunes espècies bacterianes les fan útils en la remeiació de metalls pesats de sòls, sediments i aigües residuals (Valls i Lorenzo, 2002).

De la mateixa manera, també es tracta de resoldre amb la utilització de les biopel·lícules la contaminació de les aigües subterrànies amb substàncies utilitzades com a dissolvents de neteja com alcans i alguns agents clorats. Per això s'han desenvolupat les biobarreres que consisteixen en cúmuls de biopel·lícules que formen una barrera impermeable al flux d'aigua contaminada a altres sistemes. Uns altres mètodes utilitzats amb èxit són els biofiltres que eviten la contaminació de l'aire per compostos orgànics volàtils provinents de les grans empreses químiques i de les estacions depuradores d'aigües residuals. En el biofiltre les comunitats microbianes creixen sobre la superfície d'un suport generalment de plàstic, a través del qual passa l'aire contaminat. Els principals avantatges d'aquests sistemes sobre altres alternatives de control de contaminació de l'aire són els baixos costos d'inversió, les baixes necessitats d'energia i l'absència de subproductes i residus que requereixin un tractament posterior (Betancourth *et al.*, 2004).

1.5.5.1 Interaccions dels microorganismes i els metalls

La captació i l'acumulació de metalls per part de la biomassa bacteriana està rebent una creixent atenció en el camp de la biotecnologia. Els mecanismes pels quals els organismes vius poden eliminar metalls pesats i radionuclòtids de solucions han estat extensament revisats en la bibliografia. Un resum dels diferents tipus d'interaccions més significatius entre metall-microorganisme es mostra a la taula 1.5.

Ford i Mitchell (1992) proposen una altra classificació més general que inclou, també, l'acumulació intracel·lular, la unió a la superfície cel·lular, a material exopolimèric, donant un èmfasi especial a les interaccions amb sideròfors. Com a resposta a baixos nivells de ferro lliure en el medi ambient, alguns microorganismes sintetitzen i excreten agents quelants de baix pes molecular coneguts genèricament

amb el nom de sideròfors, la funció dels quals rau en la unió de ions fèrrics del medi extern (Bossier, 1988).

Taula 1.5 Resum de les interaccions entre els microorganismes i metalls (Macaskie, 1991)

Tipus de biomassa	Mecanisme de captació del metall
Cèl·lules vives	Adsorció a la superfície cel·lular. Unió a lligands de la paret cel·lular Captació intracel·lular i segrest del metall. Captació intracel·lular seguida de reflux. Oxidació del metall a estats superiors. Reducció del metall a estats inferiors o a ió lliure. Transformacions del metall: metilació o desmetilació. Precipitació del metall amb lligands inorgànics. Unió a material capsular o exopolímer.
Restes o extractes de cèl·lules	Adsorció. Unió a lligands de la paret extracel·lular. Oxidacions, reduccions i biotransformacions. Precipitació del metall amb lligands inorgànics. Unió a restes cel·lulars. Deposicions del metall causada per enzims.
Biomassa morta	Adsorció. Unió a restes cel·lulars. Deposicions del metall causades per enzims.
Productes microbians	Metalotionines Sideròfors Metabolits acomplexants Polímers de carbohidrats Polímers de paret, peptidoglicà (bacteris), quitina (fongs), Melanines i àcid húmics (fongs) Pigments quinones

Els sideròfors generalment es classifiquen en dues classes: hidroxamats i fenol-catecols (Macaskie, 1991). Ambdues molècules presenten afinitat pel Fe 3+, però també en poden presentar per altres metalls menys elevada. Existeixen evidències de captació a través de sideròfors de Cu i Mo. Les interaccions dels sideròfors amb altres metalls no poden ser excloses, especialment si considerem la

facilitat amb la qual aquests poden ser modificats químicament per unir-se a altres metalls a banda del Fe (Ford i Mitchell, 1992).

1.5.2 Problemes ocasionats pels biofilms en l'àmbit industrial

Després de descriure la implicació negativa que els *biofilms* poden tenir en l'àmbit sanitari, la contaminació biològica causada per microorganismes pot interrompre el bon funcionament d'alguns sistemes industrials, sobretot aquells que utilitzen aigua. Això, a part de repercutir negativament en l'economia de les diferents indústries implicades pels costos que generen, pot reduir l'eficàcia d'aquest tipus de processos. A més, les biopel·lícules són un risc potencial per a la salut dels consumidors, ja que poden alterar la qualitat de l'aigua, ja sigui en indústries alimentàries o bé, a causa de la corrosió de les canonades que abasten d'aigua potable, les cases (Walker, 2000).

El terme *biofouling* es refereix als dipòsits i creixement no desitjat dels *biofilms*. El terme ha estat adaptat de la tecnologia dels sistemes intercanviadors de calor, on el terme *fouling* fa referència generalment als dipòsits indesitjats sobre les superfícies, inclosos:

- *Fouling* inorgànic : dipòsits de materials inorgànics precipitats sobre les superfícies.
- *Fouling* orgànic: dipòsits de substàncies orgàniques (olis, proteïnes...).
- *Fouling* de partícules: dipòsits de silicat, argila.
- *Biofouling*: acumulació i creixement d'organismes vius i dels seus materials associats, orgànics o inorgànics, sobre una superfície .

En els tres primers casos, l'augment de la capa de brutícia afavoreix el transport i acumulació abiòtica cap a la fase més aquosa de la superfície, i en aquests es poden controlar eliminant-los de la fase líquida. Però en el cas dels que tenen un origen biològic és diferent, ja que els microorganismes presents es multipliquen i així, encara que s'eliminessin el 99,99% dels bacteris presents mitjançant pretractaments, sempre algunes d'elles podrien incorporar-se al sistema i adherir-se a la superfície per multiplicar-se a expenses de les substàncies biodegradables. En molts casos, el *biofouling* està causat per organismes heteròtrofs i, d'aquesta manera, els microorganismes transporten material orgànic cap a l'interior de la biomassa (Fleming, 2002).

1.5.2.1 Implicació dels biofilms en edificis, monuments i vaixells

El biodeteriorament és un factor important que perjudica les propietats estètiques i funcionals d'edificis i monuments (Orlita, 2004), causat pels canvis indesitjables dels materials, l'origen dels quals és l'activitat dels microorganismes (Morton i Surman, 1994).

Són molts els treballs que descriuen exemples de biodeteriorament, des del que afecta les restes arqueològiques de la civilització Maia (Videla *et al.*, 2003), fins als que ocasionen problemes en els vitralls de la Cartoixa (Carmona *et al.*, 2006). S'han trobat microorganismes formant *biofilms* en els rotllos de pel·lícula cinematogràfics (Abrusci, 2005), i alguns són els successos "miraculosos" que daten ja de l'edat mitjana relacionats amb els *biofilms*. Potser el més conegut és el miracle de Bolsena que va fer que el Papa Urbà IV instaurés la festivitat catòlica del Corpus Christi al confondre les biopel·lícules formades amb molta probabilitat d'alguna espècie de *Serratia* a sobre del pa que utilitzaven per a la comunió amb la sang de Crist (Cullen, 1994). A més, en els últims anys s'han informat del desenvolupament de comunitats bacterianes en les estacions espacials i en el material relacionat amb aquest tipus de missions. En l'aigua de condensació de l'estació espacial MIR el recompte de microorganismes ha estat important i amb predomini dels bacteris gram negatius. Els investigadors estan cercant solucions a aquests problemes generats per la formació de les biopel·lícules, ja que aquests microorganismes poden actuar com a patògens oportunistes per als astronautes ja que el seu sistema immunitari es veu afectat per la manca de gravetat, els espais tancats i les radiacions (Song i Leff, 2005).

De tots el processos que estan implicats en el biodeteriorament, el més comú és que el material degradat sigui aprofitat pel microorganisme com a font nutricional. Enzims hidrolítics sovint juguen un paper important (Morton i Surman, 1994). Molts treballs basen els seus esforços per entendre els mecanismes pels quals els microorganismes indueixen al deteriorament dels materials, per tal de poder prevenir els danys ocasionats en molts monuments.

És per això que s'estan desenvolupant tècniques microscòpiques que, aplicades *in situ*, analitzen el biodeteriorament quan els components biològics no s'han separat del material lític (de los Rios i Ascaso, 2005).

Les superfícies dels cascs dels vaixells són un clàssic exemple de superfícies propenses a ser colonitzades per *biofilms*. Si bé el *biofilm* primari que es forma és d'origen bacterià, les capes més externes poden estar colonitzades per organismes superiors com els bivalves. Aquests tipus de *biofilms* poden reduir significativament la velocitat dels vaixells. Biopel·lícules de només cent micròmetres de gruix poden augmentar, entre un cinc i un quinze per cent, la resistència a la fricció, fet que provoca un augment en el consum de fuel, la qual cosa genera un increment en la despesa econòmica naval (Fleming, 2002).

1.5.2.2 Les biopel·lícules en sistemes intercanviadors de calor i la indústria alimentària

Els *biofouling*s en els sistemes intercanviadors de calor i torres de refrigeració són un dels majors problemes dels últims anys. L'adhesió bacteriana redueix enormement la transferència de calor i l'eficiència dels equipaments (Walker, 2000). Els problemes que ocasionen aquests tipus de *biofilms* es poden agreujar si en el sistema hi ha un augment de la concentració de nutrients o bé si hi ha absència dels factors que els inhibeixen (Fleming, 2002). *Legionella pneumophila* és l'agent causal de complicades pneumònies que poden tenir desenllaços fatals. Les biopel·lícules que forma sobreviuen en les torres de refrigeració on es poden disseminar i contagiar les persones, si els controls no són eficaços. A més, recents investigacions han demostrat la capacitat que tenen aquest tipus de *biofilms* d'establir relacions amb algunes espècies de protozous com *Hartmannella vermiformis* i *Acanthamoeba castellanii* (Declerck, 2007).

En la indústria alimentària és necessari portar un control dels *biofilms* potencials que es poden formar tant en les superfícies com en l'ambient. Encara que el control d'aquests en les superfícies que estan en contacte directe amb el producte és un pas crític per a la qualitat final d'aquest, els *biofilms* en l'ambient poden arribar a ser una font de microorganismes patògens que es poden transmetre a les superfícies, mitjançant aerosols, pels instruments utilitzats, o bé pel contacte humà (Walker, 2000).

Les substàncies polimèriques extracel·lulars juguen un paper important en l'adhesió (en terres, canonades, bandes transportadores, superfícies d'acer inoxidable). Si els microorganismes no són eliminats degudament, aquests poden formar les biopel·lícules i augmentar així el risc de contaminació. Per tant, s'han desenvolupat diverses estratègies de prevenció i control, així com la selecció i la utilització correcta de detergents i desinfectants, unit a mètodes físics de neteja idonis per tal de controlar la formació de les biopel·lícules. Diferents estudis posen de relleu la persistència de patògens com *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* o *Escherichia coli* O157:H7, que es poden trobar en les superfícies que estan en contacte amb els aliments (Kumar i Anand, 1998).

Listeria monocytogenes és un patògen resistent amb gran habilitat per proliferar en ambients secs i és un microorganisme ideal per formar *biofilms* en nombroses superfícies d'acer inoxidable, de plàstic, policarbonades, i pot sobreviure formant micronínxols tant en cintes transportadores, tancs d'emmagatzematge i en qualsevol punt de la cadena de producció dels aliments, amb el perill que comporta de contagi d'aquests i dels consumidors. Importants implicacions per la salut tenen també els *biofilms* que poden formar *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.* i *Salmonella spp.* (Chmiellewski i Frank, 2003).

1.5.2.3 Corrosió de canonades

La biocorrosió fa referència al deteriorament accelerat dels metalls causat per la presència de *biofilms* en la seva superfície (Beech i Sunner, 2004). Les biopel·lícules es poden formar en totes aquelles superfícies metàl·liques en les quals es donin les condicions ambientals òptimes. La biocorrosió és el resultat de l'activitat microbiana de les diferents espècies presents en els *biofilms*, així com del consum d'oxigen, la producció d'àcids i l'activitat d'enzims que promouen l'establiment de gradients químics en la superfície del metall (Beech, 2004). La formació de la biopel·lícula és el conjunt d'una sèrie de processos que no necessàriament han de coincidir en el temps ni en l'espai, i que comença després que el metall sigui immers en un medi aquós. En una primera etapa és una forma una pel·lícula fina no més gruixuda de 80 nm. Aquesta fina capa ja pot alterar les càrregues electrostàtiques de la superfície del metall (Videla i Herrera, 2005).

Els mecanismes pels quals els *biofilms* contribueixen a la corrosió estan influenciats per la viabilitat d'oxigen de l'ambient. Sota condicions aeròbiques, petites seccions de la biopel·lícula poden crear àrees anòdiques i catòdiques sobre la superfície del metall. En aquestes àrees hi ha cèl·lules que es poden diferenciar químicament i indueixen la transferència d'electrons amb la pèrdua de cations. Aquests processos deriven en la producció d'àcids orgànics els quals són corrosius pels metalls. Sota condicions anaeròbiques, els bacteris sulfat reductors són la causa principal de la corrosió, ja que redueixen els sulfats a sulfur d'hidrogen, que és molt corrosiu, i, a més, es pot combinar amb ions ferrosos produïts en altres processos de corrosió i formar sulfur ferrós (Morton i Surman, 1994).

Bacteris del gènere *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas* i *Desulfotomaculum*, entre d'altres, estan implicats directament en la corrosió. Hi ha treballs que demostren com els *biofilms* de *Desulfovibrio desulfuricans* afecten les superfícies d'acer inoxidable (Lopes *et al.*, 2006).

i. Estratègies anti-biofouling

Amb el reconeixement, fa uns cinquanta anys, del paper que poden jugar els microorganismes en la corrosió i amb l'avenç en els estudis de la biocorrosió, s'estan destinant molts esforços per tal d'evitar aquests fenòmens que poden succeir en un rang molt variable de situacions. A més, a nivell industrial ocasionen, a part dels problemes propis de l'embrutament de les superfícies, i el deteriorament i mal funcionament d'aparells i instal·lacions, una important despesa econòmica (Cloester *et al.*, 2005).

D'una banda s'han desenvolupat estratègies de neteja molt específiques que s'utilitzen normalment abans d'aplicar algun mètode químic. Aquests mètodes inclouen, entre altres coses, determinacions d'equilibri termodinàmics, regulació de la temperatura i alcalinitat (Videla, 2002).

L'efectivitat del biocida dependrà de la naturalesa del microorganisme que s'ha d'eliminar i de les condicions del sistema a tractar. Els requeriments que han de tenir els biocides per ser utilitzats amb efectivitat són els següents:

- Han de ser selectius pel microorganisme “diana”.
- Han de ser capaços de mantenir l’efecte inhibitori en presència d’altres compostos i sota les condicions del sistema.
- Han de ser biodegradables.
- No han de ser corrosius.
- Han de tenir un baix cost.

Els biocides poden ser oxidants (com el clor, brom i ozó), els quals tenen l’inconvenient que poden interactuar amb altres agents químics. A més, poden causar la corrosió de l’estructura dels metalls i altres estructures no metàl·liques. En canvi, els biocides no oxidants (com els amonis quaternaris o aldeïds) poden ser més efectius que els oxidants i poden controlar un ventall més ampli de microorganismes com bacteris, algues i fongs. Moltes vegades s’utilitzen conjuntament per controlar el creixement microbià (Cloester et al., 2005).

Tot seguit es recullen els principals biocides utilitzats en els sistemes industrials d’aigua:

Biocides oxidants

- Clor: efectiu enfront bacteris i algues. És pH dependent. Concentració efectiva (CF): 0.1-0.2 ppm
- Diòxid de clor: efectiu contra bacteris i menys per fongs i algues. Independent del pH. CF: 0.1-1 ppm
- Brom: efectiu amb bacteris i algues. Ampli rang de pHs. CF:0.05-0.1 ppm
- Ozó: altament efectiu contra biofilms bacterians. pH dependent. CF:0.2-.5 ppm

Biocides no oxidants

- Methylene-bis (THIOCYANATE)*: efectiu només contra bacteris. S’hidrolitza a pHs superiors a 8.CF:1.5-8 ppm.
- Isothiazolones*: Efectius per bacteris, fongs i algues, no depèn del pH. CF: 0.9-10 ppm
- Quats*: és un surfactant. Efectiu contra bacteris i algues. CF: 8-35 ppm
- Glutaraldehyde*: efectiu amb bacteris, algues, fongs i *biofilms*. CF: 10-70 ppm
- THPS*: efectius enfront bacteris, algues, fongs i *biofilms*. CF:10-90 ppm

Videla et al., 2002

Altres mètodes per prevenir i controlar la biocorrosió inclouen sistemes de revestiments a manera de capes protectores, com per exemple algun tipus de pintures especials pels bucs dels vaixells per evitar l'adhesió de bacteris i organismes superiors. Aquests mètodes alternatius tenen l'avantatge que no són tòxics i poden disminuir el risc de corrosions posteriors. S'utilitzen, també, silicones, resines modificades per aquest fi. Moltes vegades per tal d'evitar els problemes ocasionats pels *biofouling*s es seleccionen els materials que formaran part de les superfícies que siguin resistents als processos de corrosió. Noves tecnologies com la protecció catòdica que implica corrents externes que protegeixen les superfícies, oposant-se al corrent propi de ions que es generen en els processos de biocorrosió, s'estan desenvolupant amb èxit i ha resultat efectiu inhibint el creixement bacterià en plaques d'acer inoxidable submergides en el mar (Videla et al., 2002).

i i. El coure

Un dels metalls susceptibles a patir la biocorrosió abans esmentada és el coure; i aquest fet és important, ja que aquest metall pot formar part de les canonades de la xarxa de distribució d'aigua potable. El coure és un metall de transició capaç de participar en els cicles en dos estats redox, un oxidat (Cu II) i un altre en estat reduït (Cu I). Tots els organismes requereixen el coure com a cofactor catalític en els processos biològics com la respiració, el transport de ferro, l'estrès oxidatiu, la producció d'hormones peptídiques, pigmentacions, en la coagulació de la sang i en el creixement i el desenvolupament cel·lular. A més, el coure també participa en reaccions redox que generen radicals hidroxils, els quals poden tenir conseqüències molt negatives envers els lípids, proteïnes i ADN.

En els ésser humans, els desequilibris d'aquest ió poden comportar trastorns i malalties com la síndrome de Menkes o la malaltia de Wilson, caracteritzada per la inhabilitat de distribuir correctament el coure per les cèl·lules i els teixits. D'una banda, la malaltia de Wilson és un desordre metabòlic del coure que afecta una persona de cada trenta mil, i que es caracteritza per la mutació d'un parell de gens ATP7B localitzats en el cromosoma 13. Com a conseqüència, la concentració de coure en el fetge és vint vegades més gran que els nivells normals, i per la deficiència, aproximadament d'un trenta per cent, de la proteïna plasmàtica del coure, la

ceruloplasmina. La síndrome de Menkes és un trastorn hereditari que provoca un dèficit de coure.

El contacte perllongat amb recipients de coure, canonades, o vàlvules, el menjar àcid o la beguda poden dissoldre petites quantitats de coure, suficients per a causar nàusees, vòmits i diarrees. Els estàndards internacionals (WHO) l'any 1958 varen establir que concentracions superiors a 1,5 mg de coure per litre deterioraven la potabilitat de l'aigua. Aquest valor es va mantenir, entre el període comprès entre els anys 1963 i 1971, com el valor màxim permès. Actualment es recomana que el coure no excedeixi una concentració de 2 mg/L per evitar els trastorns gastrointestinals que es deriven d'un consum excessiu.

1.5.2.4 Implicació dels biofilms en l'aigua de beguda

A primer cop d'ull les condicions que es donen en els sistemes de distribució d'aigua potable no són massa favorables per al creixement bacterià (Critchley *et al.*, 2002), ja que estan exposats a desinfectants i a concentracions limitants de nutrients, per això la seva supervivència formant *biofilms* els confereix protecció a l'estrès físic i químic (LeChevallier *et al.*, 1998).

La presència de *biofilms* en els sistemes d'aigua potable pot ocasionar problemes com la corrosió de les canonades, el deteriorament de la qualitat de l'aigua i altres efectes indesitjables (Hu *et al.*, 2005).

La contaminació de l'aigua de beguda està relacionada amb els sistemes domèstics de canonades de coure. Aquesta té lloc per la corrosió lenta i progressiva de les superfícies de les canonades, coneguda amb el nom de cuprosolvència. La química pròpia de l'aigua, les corrents elèctriques i les condicions medioambientals poden influir en l'oxidació potencial del coure (Dutkiewicz *et al.*, 1998). La cuprosolvència ha estat relacionada amb la presència de bacteris en els sistemes de recirculació d'aigua calenta (Fischer *et al.*, 1992). Les descripcions dels *biofilms* que es formen en les canonades d'aigua potable es basen en l'observació per microscòpia electrònica dels materials de les canonades, així com de les incrustacions que es formen en la seva superfície (Szewzyk *et al.*, 2000).

En la corrosió de les canonades de coure entren en joc les interaccions que hi ha entre les superfícies de les canonades i els factors químics, a més a més del creixement microbià que pot portar a la solubilització del metall i fer que els nivells de coure en l'aigua potable excedeixi les directrius de salut i facin que l'aigua tingui un gust amarg i metàl·lic (Dietrich, 2004), a més de donar una coloració blavosa a l'aigua (Critchley *et al.*, 2003_a).

Els canvis de gust i color que pot adquirir l'aigua són rellevants i, alhora, són factors de protecció que tenen els consumidors dels possibles efectes tòxics. S'han recollit informes de persones que han patit símptomes gastrointestinals (principalment nàusees, vòmits, diarrea i espasmes abdominals) després de la ingestió d'aigües contaminades per coure (Zacarias *et al.*, 2001).

Les biopel·lícules juguen un paper molt important en la seguretat de l'aigua de beguda ja que proporcionen el microambient idoni perquè es puguin desenvolupar microorganismes potencialment patògens. El descobriment de noves espècies de bacteris aquàtics en alguns *biofilms* formats en l'aigua de beguda és tan sols el començament d'una nova àrea de recerca de les interaccions dels patògens amb aquests bacteris causada per la rellevància que tenen aquests sistemes (Szewzyk *et al.*, 2000).

Diferents publicacions assenyalen la importància de la formació de *biofilms* en les superfícies internes de les canonades de coure, així com els efectes que tenen sobre la qualitat de l'aigua i els efectes específics que tenen diferents espècies bacterianes en la cuprosolvència de les canonades domèstiques (Dutkiewicz i Fallowfield, 1998).

2. OBJECTIUS

Es calcula que prop d'un 95% de la biomassa bacteriana que es pot trobar en els sistemes de distribució d'aigua potable es troba localitzada adherida a les superfícies internes de les canonades en forma de biopel·lícules, i que només un 5% es troba lliure en la fase aquosa. El creixement dels microorganismes formant *biofilms* sobre les superfícies altera la composició dels materials. En el cas de les superfícies metàl·liques, les reaccions fisicoquímiques es tradueixen en canvis indesitjables que es veuen agreujades per la biocorrosió o la corrosió influenciada per microorganismes. El coure és un element traça essencial, però ingerit de forma massiva és tòxic. S'han descrit casos d'intoxicacions a causa de problemes de corrosió i cuprosolvència on els microorganismes juguen un paper primordial. Alhora, alguns bacteris formadors del *biofilms* tenen la capacitat d'acumular el metall, incrementant el risc per la salut pública.

Dins d'aquest context els objectius que ens vàrem plantejar foren els següents:

- ❖ Estudiar la capacitat de captar coure per part d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916, tant de solucions aquoses com de superfícies de coure, i veure si és capaç o no de participar en processos de cuprosolvència.
- ❖ Mirar la capacitat d'aïllats del medi ambient per captar coure i per formar biopel·lícules, i de veure si els biofilms, formats ja sigui per dissolució del coure o bé per captació directa del mateix, poden augmentar els nivells del metall en l'aigua, posant en compromís la salubritat d'aquesta per superar els límits permesos per la legislació.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1 El microorganisme

3.1.1 Caracterització

El microorganisme utilitzat en aquests estudis va ser obtingut de mostres de sòl i seleccionat per la seva capacitat d'acumular metalls pesats presents en el medi. La soca fou designada com a EPS-916 (Llovera *et al.*, 1993) i va ser aïllada d'una mostra de sòl, identificada com a *Agrobacterium radiobacter* (Bayés, 1992). Aquesta va ser seleccionada en una prospecció de bacteris productors d'exopolisacàrids i per la seva elevada capacitat de sintetitzar aquest material extrapolimèric (Llovera *et al.*, 1993).

La soca *A. radiobacter* EPS-916 presenta una morfologia bacil·lar de mida petita (longitud 1-4,2 µm i un diàmetre aproximat de 0,8-1,1 µm); és mòbil per flagels peritrics. El microorganisme és oxidasa, ureasa, catalasa positiva i a la tinció de gram s'observa com a negatiu. No forma ni quists ni espores (Bayés, 1992).

3.1.2 Manteniment

Després d'estar sembrades en tubs d'agar inclinat de Triptona i Soja (TSA, BBL), la soca s'ha conservat a la nevera a 4°C. S'han realitzat ressebrades en el mateix medi cada quinze dies i, per realitzar els estudis, s'han fet ressebrades de 24 hores en tubs de TSA inclinat i portats a incubar a 30°C.

Paral·lelament la soca s'ha mantingut en plaques d'agar Müeller-Hinton (M-H, Difco) amb solució de metall, a 4°C. Les plaques de conservació tenien una concentració de 5mM de Cu. Es varen realitzar ressebrades de plaques de M-H metall cada deu dies.

3.1.3 Conservació

La liofilització fou un dels mètodes utilitzats per a la conservació de la soca. Els bacteris es varen mantenir liofilitzats en un medi base de Bacto Skim Milk (Difco) al 10% i Tiourea (Merck) a l'1% (Vilaseca, 1984). La reconstitució dels liofilitzats es va dur a terme afegint brou de Triptona i Soja (TSB, BBL) i incubant-ho a 30°C durant 24 hores. També s'ha utilitzat el Kit comercial de crioboles *Vibakstore* (Nirco, S.A) mantingut a -80°C.

3.2 Determinació de la concentració mínima inhibidora

La concentració mínima inhibidora (CMI) és la menor concentració a la qual s'observa una inhibició total del creixement bacterià, desestimant l'aparició de colònies aïllades o de creixement molt lleuger (Murray, 2000). Per determinar la CMI cal inocular les soques que volem estudiar en una placa de Müeller-Hinton (M-H) que contingui una concentració coneguda de metall. La sal utilitzada ha estat sulfat de coure $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Fluka-Garantie) de $P_m = 249,68 \text{ g/mol}$.

A partir de diferents dilucions de la sal, s'afegeix 1 mL de cada dilució a 20 mL d'agar MH estèril mantingut a 50°C i, finalment, s'emplaca. Al mateix temps es van fer plaques control de MH agar sense metall per verificar la viabilitat del microorganisme i així tenir un creixement de referència (Simon-Pujol *et al.*, 1979).

Per a la preparació dels inòculs es va partir de cultius de 24 hores de la soca en brou de triptona i soja (TSB, BBL). Es va inocular un volum de $100 \mu\text{L}$ distribuïts en dues gotes en plaques. Un cop l'agar ha absorbit el TSB es porten a incubar entre 24 i 48 hores a 30°C .

Es varen realitzar diferents sèries de concentracions de metall per aconseguir una millor delimitació de la mateixa.

3.2.1 Adaptació

Després de la determinació de la CMI, la soca es va adaptar a una concentració de 5mM , inferior a la CMI en el qual es produïa un creixement apte per a la realització dels experiments i, després dels seu creixement, es varen mantenir a la nevera a 4°C .

3.3 Captació de coure

3.3.1 Preparació de l'inòcul

El medi de cultiu utilitzat per a la realització de l'estudi de la captació de coure per part de la soca EPS-916 ha estat el medi descrit per Estañol (1988) i anomenat GMS.

La composició d'aquest medi líquid és:

Glucosa (Panreac).....	10 g
NH ₄ Cl (Clorur Amònic) (Panreac).....	2,67g
KH ₂ PO ₄ (Fosfat Monopotàssic) (Fluka).....	5,33g
Solució de sals minerals	3mL
Aigua destil·lada.....	qsp 1000mL

La solució de sals té la següent composició:

CaCl ₂ · 2H ₂ O (Merck).....	0,100 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (Merck).....	9,983 g
MnSO ₄ · H ₂ O (Panreac).....	0,065 g
Aigua destil·lada	qsp 1000mL

El procediment per aquests experiments es resumeix en la figura 3.1. Per cada assaig es varen preparar 250 mL de medi GMS. Per fer-ho es varen pesar i mesurar les quantitats necessàries dels diferents compostos i es varen disposar en els matrassos de capacitat 1.000 mL.

El pH es va ajustar a un valor de 7,2 amb NaOH 1N per afavorir les condicions de creixement bacterià. Tot seguit, es portà a esterilitzar a l'autoclau (121°C, 1 atm., 20 min.). La glucosa es va esterilitzar per separat amb un volum suficient d'aigua, per evitar la seva caramelització i, posteriorment, s'afegeix a la resta de medi de cultiu en condicions d'esterilitat. La inoculació es va fer a partir del creixement bacterià en TSA. Aquest inòcul provenia, alhora, de plaques de Müeller-Hinton metall que varen estar incubades durant 48 hores a 30°C. Un cop inoculat es portà a agitació orbital constant de 120 rpm a 30°C i durant un període de 48 hores.

Un cop transcorregut el temps de creixement i mitjançant centrifugació, es varen separar les cèl·lules, a 8.000 rpm durant 15 minuts. Seguidament es va rebutjar

el sobrenedant i es rentà el sediment amb aigua destil·lada per eliminar possibles restes de medi i es tornà a centrifugar. L'operació es va repetir un parell de vegades.

Després de centrifugar, es va ressuspèndre el *pellet* amb una mica d'aigua per poder ajustar la densitat òptica de la suspensió bacteriana a un valor de 0.6-0,65 a una longitud d'ona de 520 nm. D'aquesta suspensió bacteriana es varen agafar 20mL i s'inocularen a diferents *Erlenmeyers* de 250mL que contenen 80mL de solució de metall. Alhora, es varen prendre 20mL de la suspensió bacteriana i es posaren en un pesafiltres, que prèviament es va tarar per calcular el pes sec de la biomassa cel·lular. Aquest pesafiltres es mantingué cinc dies un forn de 100°C a partir del qual es començaren a fer les successives pesades.

3.3.2 Presa de mostra

Per veure la captació de coure per part dels bacteris no proliferants es van prendre mostres durant 24 hores. La presa de mostra es realitzà a diferents temps segons l'experiment ($t=1h$, $t=2h$, $t=6h$ i $t=24h$ $t=48h$); paral·lelament, i als mateixos temps, es varen prendre mostra d'un control que només contenia solució de metall. El volum de mostra va ser de 5 mL. Les mostres, una vegada recollides, es van centrifugar a 4.200 rpm durant 15 minuts. Passat aquest temps, es va rebutjar el sobrenedant i es rentà el *pellet* amb aigua destil·lada, per eliminar possibles restes de metall que haguessin pogut quedar en el medi, i es tornà a centrifugar. L'operació es va realitzar un parell de vegades.

Els sediments que es varen obtenir es portaren al forn de 100°C per eliminar tota l'aigua, un temps aproximat de dues hores. Passades les dues hores, s'afegiren a cada tub 0,5mL de HNO_3 concentrat, per poder obtenir el coure acumulat dins els bacteris. Els tubs es taparen per evitar possibles pèrdues i es posaren a un bany maria a 100°C durant un parell d'hores (Norris i Kelly, 1977). Una vegada finalitzat el procés de digestió, s'afegí, a cada tub, 4,5mL d'aigua destil·lada estèril i es filtraren les solucions amb filtres de 0,45 μ m de mida de porus.

Després, mitjançant absorció atòmica (utilitzant un espectrofotòmetre d'absorció atòmica amb forn de grafit Varian 3000 amb corrector de fons per efecte Zeeman) es va determinar la quantitat de coure acumulat.

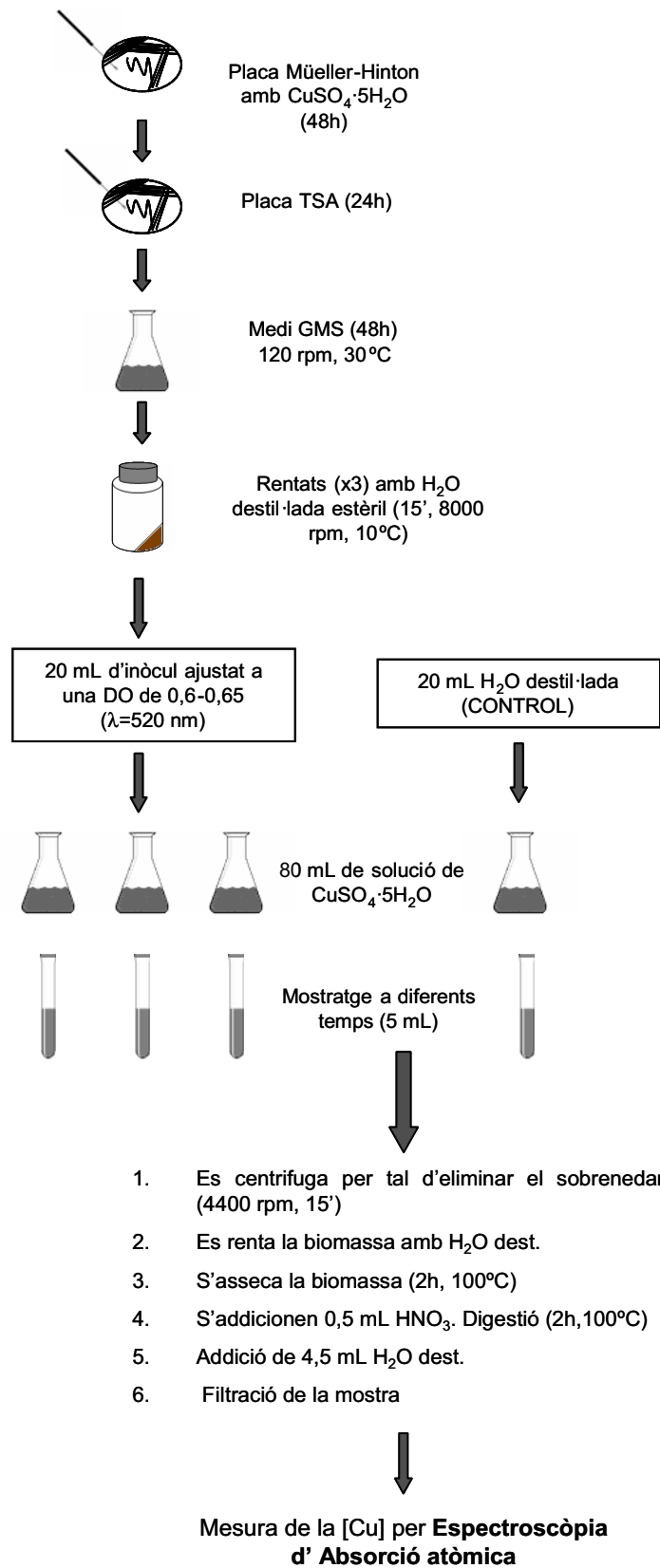


Fig. 3.1 Esquema del protocol seguit en els experiments de captació de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3.3.3 Estudis de captació a diferents pHs

Per estudiar l'efecte que el pH podria tenir en la captació de coure, es va ajustar la solució de sulfat de coure a diferents pHs mitjançant l'addició de HCl 0,1N. La solució, una vegada ajustada, es va esterilitzar mitjançant filtres Millipore amb una mida de porus de 0,22 μm . La presa de mostra i el processament d'aquesta segueix el procediment descrit en l'apartat anterior.

3.4 Determinació de l'estructura cristal·lina del coure

Un cop transcorregudes les 48 hores, durant les quals els bacteris varen estar en contacte amb la solució de coure, es varen reunir el contingut dels matrassos (menys el control) i es centrifugà a 8.000 rpm durant vint minuts. Passat aquest temps es va rentar el sediment i es començà el procés de destrucció de la matèria orgànica mitjançant el mètode descrit per Kunze i Dixon (1986). Aquest mètode d'eliminació consisteix en una oxidació mitjançant peròxid d'hidrogen pur.

El sediment obtingut de la centrifugació es va col·locar en un got de precipitats i se li va afegir una mica d'aigua destil·lada i 10mL de H_2O_2 . Deixant que qualsevol efervescència o escuma desaparegués, es va posar la mostra dins un bany d'aigua a uns 70°C. S'afegiren volums d'uns 5mL de H_2O_2 fins que després d'una nova addició de H_2O_2 no es va observar cap efervescència. És important vigilar que la mostra no s'evapori completament. Acabat el tractament, es portà a sequedat fins que va quedar un pols suficient per a la determinació de l'estructura cristal·lina mitjançant difracció de Raigs X.

Per a la determinació es va utilitzar un difractòmetre de raigs X de pols de geometria $\theta/2\theta$ Siemens D-500, amb les següents característiques tècniques:

- Radiació $K\alpha$ del coure a 40 W i 30mA
- Monocromador secundari de grafit
- Finestra de divergència d'un grau
- Finestra de recepció de 0.05 graus
- Espectres fets de 4-70 graus 2θ amb mida de pas de 0,05 $^\circ 2\theta$
- Temps de comptatge de tres segons per pas

Per identificar les fases cristal·lines es compara la mostra amb les fitxes cristal·logràfiques del banc de dades del *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS).

3.5 Tècniques microscòpiques

3.5.1 Observació de bacteris per microscòpia electrònica de transmissió

Per obtenir la mostra vàrem agafar 1 mL d'un *erlenmeyer* on havien estat en contacte el microorganisme amb una solució de coure, durant 24 hores. També es va prendre una mostra, després de 48 hores de contacte, en un tub *ependorf*, es va centrifugar a 16.000 rpm durant cinc minuts per separar les cèl·lules i es va rentar tres vegades amb aigua destil·lada abans de processar la mostra.

Després d'obtenir les mostres, aquestes es varen processar seguint les recomanacions del Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, duent a terme un procés de fixació i un d'osmificació de la mostra.

3.5.1.1. Procés de fixació de la mostra

S'agafa 1 mL de cultiu i s'hi addiciona 1 mL de glutaraldehyd (5 %) (es prepara doblement concentrat i en solució tampó fosfat (PB) (0,2 M)). Es deixa que la mostra i el fixador estiguin en contacte 10 minuts, aproximadament. Seguidament es centrifuga a 1.000-2.000 rpm, 4°C i 5 minuts (el temps mínim necessari perquè baixin les cèl·lules i no es produeixi lisi cel·lular). Es decanta el sobrenedant i es ressuspèn la biomassa amb la solució del fixador al 2,5 % (glutaraldehyd (5 %) + tampó fosfat (0,1 M)). Es repeteix l'operació fins a tres vegades. És convenient que durant l'últim procés de fixació es deixi la biomassa en contacte amb el fixador (2,5 %) almenys dues hores. Un cop fets els rentats amb el fixador es procedeix a fer els rentats amb tampó fosfat (0,1 M). Es deixa la solució amortidora de fosfats en contacte amb les cèl·lules 10 minuts. Es torna a centrifugar i es decanta. Es repeteix el procediment quatre vegades. Un cop finalitzats els rentats es deixa la mostra en tampó fosfat a 4°C fins que es realitzi l'osmificació.

3.5.1.2 Procés d'osmificació

Es prepara una solució de (1 % OsO₄+0,8 % K₃Fe(CN)₆) a partir de la solució concentrada de (4 % OsO₄+3,2 % K₃Fe(CN)₆). Per això, s'agafa 0,5 mL de la solució concentrada de (4 % OsO₄+3,2 % K₃Fe(CN)₆) + 1 mL de la solució amortidora de PB (0,2 M)+ 0,5 mL aigua mQ. S'addiciona a la mostra prèviament fixada, la solució de

(1% OsO₄ +0,8% K₃Fe(CN)₆) fins a cobrir la biomassa, es deixa en gel 1,30-2 h i es tapa amb paper d'alumini. Passades les dues hores es centrifuga i es decanta el sobrenedant. La biomassa es renta quatre vegades amb solució amortidora PB (0,1 M).

Les cèl·lules tenyides són incloses en agar pur (Difco, MI, EEUU) al 2,5% mitjançant el mètode de la bombolla. A continuació es deshidraten emprant un gradient creixent d'acetona pura anhidra (de 50 % al 100 %). Finalment les mostres són incloses en resina Spurr i es deixa polimeritzar 48h a 60°C (Spurr, 1969). Els talls ultrafins (30-90 nm) són realitzats amb una fulla de diamant (Diatome, Biel, Suïssa) en un ultramicròtom Ultracut FC4E (Reichert-Jung (LEICA), Wetzlar, Alemanya).

Els talls ultrafins varen ser realitzats amb una ganiveta de diamant en un micròtom i enganxats en una reixeta de titani. En els talls contrastats, el procés es va finalitzar amb l'aplicació d'acetat d'uranil al 2% (30 minuts) i tinció amb citrat de plom (Tinció Reynolds).

Les mostres es varen examinar en un microscopi electrònic de transmissió Philips EM-301, treballant normalment amb una acceleració de 80 KV.

3.5.2 Microanàlisi per raigs X

El processament de la mostra va ser el mateix que el descrit en l'apartat 3.5.1. Per estabilitzar la mostra es va realitzar un evaporat de carboni a sobre dels talls. El microscopi utilitzat va ser un Hitachi® H-800 MT i les microanàlisis es varen fer amb un suport STEM (per fer escombrats de la mostra) i un detector Kevex de raigs X d'elements lleugers (Kevex Corporation, Califòrnia). Es treballà amb una acceleració de 100 Kv.

3.6 Producció d'exopolisacàrid

3.6.1 Preparació de l'inòcul

L'inòcul per a la producció de l'exopolisacàrid es va obtenir cultivant la soca EPS-916 amb 250 mL del medi de cultiu líquid a 30°C, durant 60 hores en agitació contínua.

La composició d'aquest medi (Estañol, 1988) és:

Glucosa (Panreac).....	20 g
NH ₄ Cl (Clorur Amònic) (Panreac).....	1,00 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfat Monopotàssic) (Fluka).....	5,44 g
Solució de sals minerals	6 mL
Aigua destil·lada	qsp 1000 mL

La solució de sals minerals té la següent composició:

CaCl ₂ · 2H ₂ O (Merck).....	0,100 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Merck).....	10 g
MnSO ₄ ·H ₂ O (Panreac).....	0,075g
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Panreac).....	0,4 g
Aigua destil·lada	qsp 1000mL

Es va ajustar el pH a 7 amb NaOH 1 N i es va esterilitzar a l'autoclau; la glucosa, per evitar la seva caramelització, es va esterilitzar per separat. La inoculació del medi es va fer de creixement bacterià que provenia de plaques de TSA incubat 24 hores a 30°C.

Passat el temps d'incubació, el cultiu es va centrifugar a 9.000 rpm a una temperatura de 10°C; tot seguit, es va rebutjar el sobrenedant i les cèl·lules que restaven en el sediment es varen rentar amb sèrum fisiològic de pH 7. Aquesta operació es va repetir dues vegades. Es va utilitzar quantitat suficient d'inòcul per arribar a una densitat òptica final de 0,35 llegida a una longitud d'ona de 520 nm. El medi de cultiu que afavorirà la producció de l'exopolisacàrid té la següent composició (Estañol, 1988):

Glucosa (Panreac).....	20 g
NH ₄ Cl (Clorur Amònic) (Panreac).....	0,4 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfat Monopotàssic) (Fluka)..	2,72 g
Solució de sals minerals	6 mL
Aigua destil·lada.....	qsp 1000 mL

L'inòcul prèviament ajustat es va sembrar en els matrassos incubant-los durant 96 hores, sota agitació constant i a una temperatura de 30°C. Aquest medi en aquest estudi serà anomenat com a EPS-B.

3.6.1 Obtenció del polisacàrid

Transcorregut el temps d'incubació, es va procedir primer de tot a centrifugar a 8.000 rpm durant 20 minuts a 10°C, per separar l'exopolisacàrid del medi de fermentació.

Una vegada centrifugat i separades les cèl·lules, el polisacàrid suspès en el sobrenedant va ser precipitat mitjançant l'addició de tres volums d'etanol fred (Marqués *et al.*, 1986), durant uns cinc dies. Passat el temps de precipitació, es va recollir l'EPS i es va dissoldre en aigua destil·lada freda i es va dialitzar enfront d'aigua destil·lada a 4°C durant unes 48 hores, per eliminar les restes d'etanol que impossibilitaria la seva posterior liofilització. Per a la diàlisi es van utilitzar membranes de diàlisi tractades segons Maniatis *et al.* (1982).

El producte obtingut després de la diàlisi va ser congelat i llavors liofilitzat.

3.7 Captació de coure per l'exopolisacàrid

Per a l'assaig de captació, d'una banda, es va preparar una solució de coure ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de $P_m = 249,68 \text{ g/mol}$), dissolent 0,1 grams de la sal en 1.000 mL d'aigua destil·lada i, a partir d'aquesta, es varen fer dilucions necessàries perquè, a l'addicionar el mateix volum de la solució del polisacàrid, quedessin a la concentració final desitjada.

D'una altra banda, es varen preparar dues concentracions diferents; per fer-ho es va preparar una solució aquosa de polisacàrid al 0,8% i al 0,4%, de manera que a l'afegir el mateix volum de la solució de coure quedés una concentració final del 0,4% i del 0,2%, respectivament. Així doncs, en un matràs que contenia 50 mL de la solució de coure es va afegir 50 mL de la solució polisacàridica. Es va deixar en agitació i, transcorregut el temps de contacte, es va extreure una alíquota de 20 mL que es va a dur al forn de calor sec, fins a pes sec constant. Als 80 mL restants se'ls va afegir cinc volums d'aigua destil·lada i es va procedir a dialitzar-los mitjançant un sistema de diàlisi tangencial forçada mitjançant pressió (Millipore Minitan System), utilitzant

plaques de filtració PTHKOMPO4 de mida de porus de 100.000 Dalton, amb la finalitat de separar el coure lliure del coure retingut per l'exopolisacàrid.

Després de la dialització es va determinar el coure, tant en les aigües de diàlisi com en el polisacàrid dialitzat, mitjançant absorció atòmica.

Per a la preparació de les mostres, previ a la determinació de coure per absorció atòmica, es va fer un tractament per destruir la matèria orgànica. La digestió va consistir a afegir àcid nítric concentrat a les mostres, tapar-les amb parafilm per evitar la corrosió dels taps, i es varen portar a un bany d'aigua a 100°C durant dues hores. Passat el temps de destrucció de matèria orgànica, es deixen refredar i s'enrasen fins a volum final amb aigua destil·lada. En el procés, l'àcid nítric, a més de digerir la matèria orgànica, ajuda a estabilitzar la mostra.

3.8 Captació de coure per cèl·lules productores d'exopolisacàrid

Per als següents experiments, es varen inocular matrassos amb 250 mL de medi de cultiu anomenat com a EPS-B, amb una suspensió bacteriana prèviament ajustada d'*A. radiobacter* EPS-916, i es varen deixar en contacte durant 7 dies a una temperatura de 30°C i a agitació constant. El pH del medi es va ajustar a un valor proper a la neutralitat amb NaOH 1N i es va esterilitzar separat de la glucosa, per evitar la seva caramelització. Passat el temps d'incubació, es va posar en contacte la suspensió cel·lular amb solucions de sulfat de coure a concentracions de 1 mM i 1,5 mM, prèviament esterilitzada i, tal com s'indica en l'esquema de la pàgina següent, es varen prendre mostres a diferents temps (0, 1, 3 i 24 hores). L'esquema del procés es resumeix en la figura 3.2. Les mostres es varen centrifugar a 4.200 rpm. Un cop centrifugades, es va recollir el sobrenedant per la seva posterior precipitació i obtenció de l'exopolisacàrid. Un cop obtingut l'exopolisacàrid es va dialitzar i digerir per poder quantificar, mitjançant absorció atòmica, el possible coure que hagués pogut acumular.

Simultàniament es va rentar amb aigua destil·lada el *pellet* obtingut i es va a portar a sequejat al forn de 100°C durant un període de dues hores. Passat el temps, es va afegir 0,5 mL d'àcid nítric concentrat, es van tapar els tubs hermèticament i es varen posar en un bany maria per procedir a la digestió de les cèl·lules. Passat el temps, s'afegiren 4,5 mL d'aigua destil·lada a cada tub i es varen filtrar les mostres. Per saber la quantitat de coure acumulat, les mostres es varen analitzar per absorció atòmica.

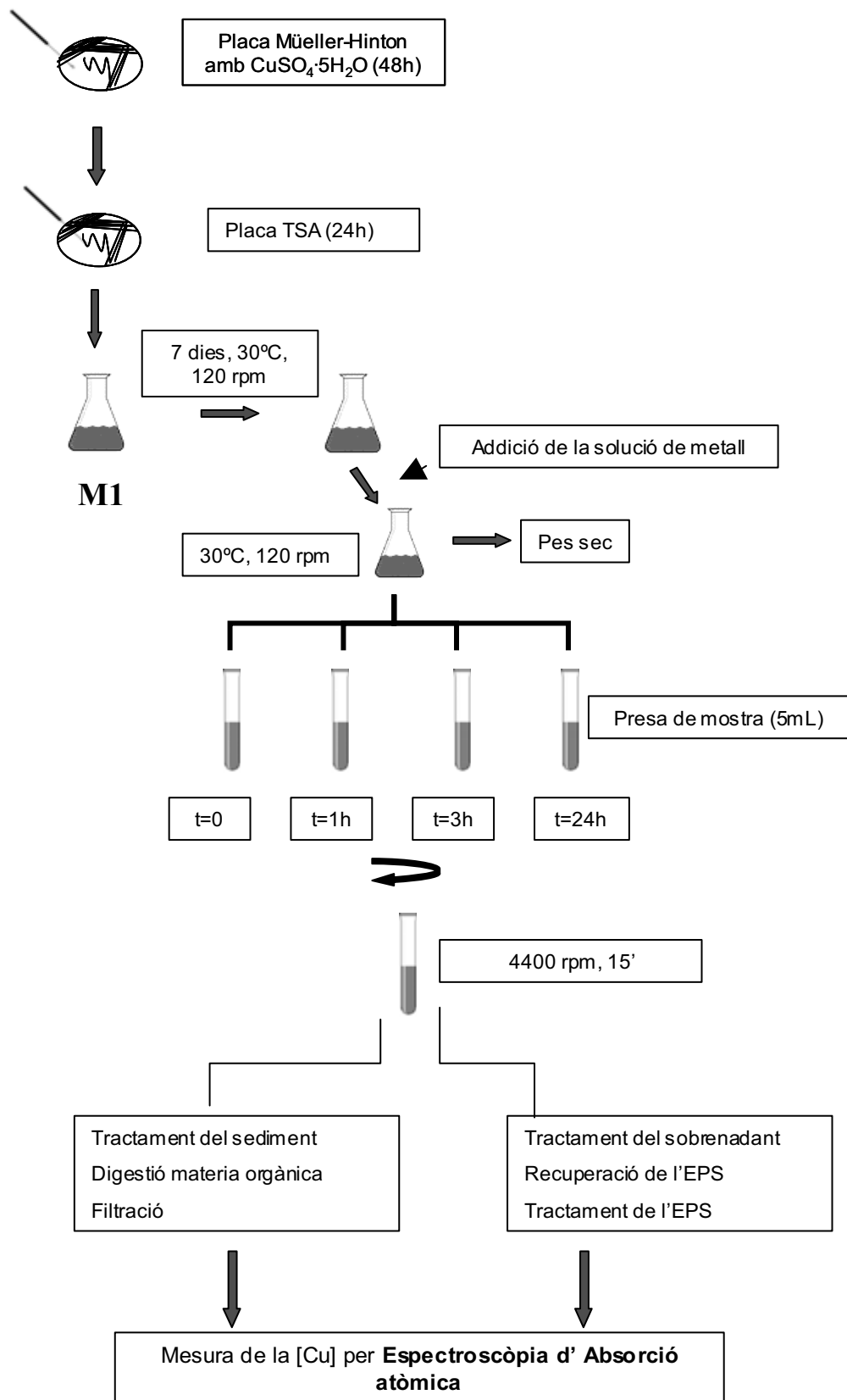


Fig. 3.2 Esquema de l'assaig de captació de Cu per part de cèl·lules productores d'EPS

3.9 Captació de coure provinent d'un tros de canonada

Amb un intent d'aproximar els resultats obtinguts a la realitat de la contaminació bacteriana de conduccions de coure, es va dissenyar la següent experiència: utilitzant el medi de cultiu descrit a l'apartat 3.6.1, es va sembrar un matràs amb 250 mL del medi esmentat i es va sembrar amb un inòcul que provenia d'unes ressebrades de 24 hores en TSA mantingudes a 30°C, les quals provenien, alhora, de plaques de M-H metall, amb una concentració de sal de coure de 5 mM, que havien estat incubades durant 48 hores a 30°C. Alhora, es va posar en el medi el tros de canonada i es va deixar durant cinc dies incubant en agitació constant a una temperatura de 30°C.

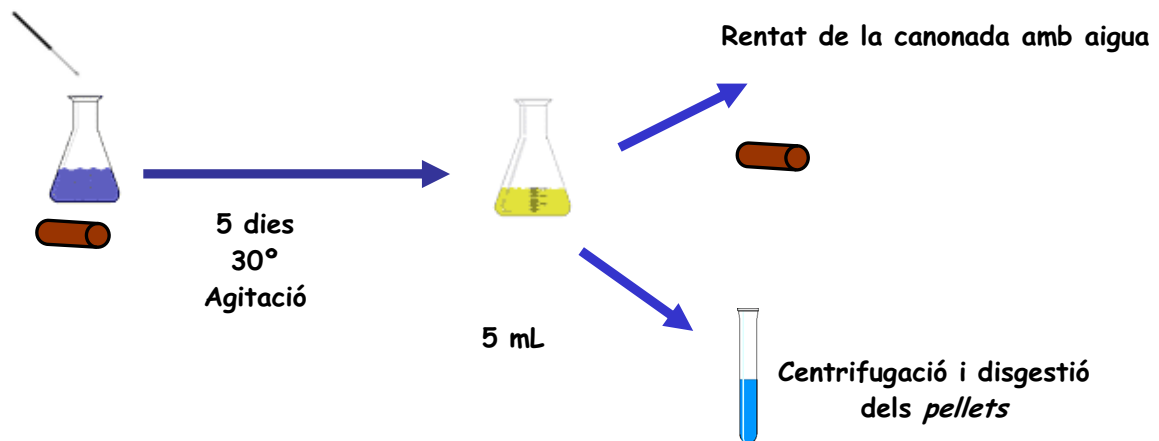


Fig. 3.3 Esquema de l'experiment dissenyat amb un tros de canonada

Passat el temps d'incubació, amb unes pinces estèrils es va retirar la porció de canonada i es va rentar amb aigua destil·lada estèril, les aigües de rentat es varen recollir en tubs i es varen analitzar per absorció atòmica.

D'altra banda, es varen agafar mostres de 5 mL del matràs on s'havia produït el contacte de l'anella de coure i el microorganisme, i es varen centrifugar a 4.200 rpm per separar-ne les cèl·lules. El sediment obtingut es va rentar amb 5 mL d'aigua destil·lada; aquesta operació es va repetir tres vegades.

El sediment obtingut es va portar a la sequedat a 100°C un temps d'unes dues hores. Una vegada sec, s'hi varen afegir 0,5 mL de HNO₃ concentrat i es va iniciar la digestió de les cèl·lules durant un parell d'hores en un bany maria. Finalitzada la digestió, es varen afegir 4,5 mL d'aigua estèril, la mostra es va filtrar amb filtres de mida de porus de 0,45 µm i es va quantificar per absorció atòmica.

3.10 Aïllament de soques bacterianes causants de *biofouling*

3.10.1 Aïllament de soques

Després dels resultats preventius obtinguts en l'assaig on es pretenia veure l'acumulació de coure provinent d'un tros de canonada, es varen prendre mostres amb hisops de canonades de coure de la xarxa d'aigua potable de diferents llars, que portessin un temps sense circulació d'aigua, per poder-ne detectar microorganismes potencials de formar biofilms dins la superfície interna de la canonada.

3.10.2 Identificació i conservació de les soques microbianes

Els diferents microorganismes aïllats varen ser conservats en tubs d'agar inclinat de TSA. Per a la primera identificació es varen utilitzar les següents tècniques: tinció de gram, prova de l'oxidasa, prova de la catalasa, prova de l'O/F i la bateria de proves bioquímiques del Kit comercial API 20 E BioMérieux.

3.10.3 Determinació de la concentració mínima inhibidora

Amb la finalitat de conèixer millor el comportament de cada un dels aïllats enfront del coure es varen estudiar les seves respectives CMI. Es varen preparar diferents concentracions de la sal de coure utilitzada ja en els estudis anteriors (sulfat de coure CuSO₄·5H₂O (Fluka-Garantie) amb un Pm=249,68 g/mol. El medi utilitzat per fer les CMI va ser l'agar Mueller-Hinton (Scharlau) que es va repartir en tubs de 20 mL. Les concentracions de sal que es varen assajar foren: 20 mM, 10 mM, 7,5mM, 5mM, 2,5mM i 1mM. Al mateix temps es varen preparar plaques control (Agar Müeller-Hinton sense solució de metall) per verificar la viabilitat del microorganisme en aquest medi i per tenir un creixement de referència a l'hora de realitzar la lectura final de la CMI.

Per preparar l'inòcul per procedir a realitzar les diferents CMI, es varen inocular tubs amb 5 mL de TSB amb creixement *overnight* de cada un dels microorganismes en TSA i es va portar a incubar a 30°C fins a obtenir una terbolesa equivalent a l'estàndard de 0.5 McFarland (10^8 UFC/mL). Passat el temps d'incubació, les plaques de metall de les concentracions abans esmentades es varen sembrar amb 100 µL de la suspensió microbiana de cada una de les soques aïllades. Es varen sembrar tres soques per cada placa i, paral·lelament, es varen sembrar els controls. Les plaques es varen incubar durant 48 hores a 30°C.

3.11 Captació de coure pel microorganisme aïllat de la canonada de coure

L'aïllat que més es va aproximar a la CMI d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 es va posar en contacte amb diferents concentracions de solucions de sulfat de coure per veure si era capaç de retenir coure, comparant-ne els resultats amb els obtinguts prèviament amb *A. radiobacter* EPS-916. Per això es va seguir el procediment abans esmentat en l'apartat 3.3.

3.12 Captació de coure provinent de cupons de coure

Després d'estudiar la capacitat d'acumular coure (provinent de solucions de sulfat de coure), tant del microorganisme aïllat d'una canonada de coure com d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916, es varen dissenyar una sèrie d'experiments per estudiar si eren capaços d'acumular coure provinent de porcions de planxes de coure, que anomenarem en aquest treball cupons, prèviament esterilitzats i envellits en contacte amb aigua estèril de l'aixeta durant un període de 7 dies. Aquests cupons es varen obtenir d'un full de planxa de coure, retallant-ne porcions quadrades d'aproximadament 2x2 cm, foradant un dels vèrtexs de cada cupó per on es va introduir un fil de coure prou llarg perquè el cupó pogués quedar suspès dins d'un matràs que contenia el medi de cultiu.

Els microorganismes es varen fer créixer en el medi descrit a l'apartat 3.1 durant 48 hores, a una agitació constant de 120 rpm i a una temperatura de 30°C. Un cop transcorregut el temps de creixement i mitjançant centrifugació, es varen separar les cèl·lules, a 8.000 rpm durant 20 minuts. Seguidament, i rebutjant el sobrenedant, es va rentar el sediment amb aigua destil·lada per eliminar possibles restes de medi i es va tornar a centrifugar. L'operació es va repetir un parell de cops. Una vegada

centrifugat, els *pellets* es varen ressuspèndre amb una mica d'aigua per poder ajustar la densitat òptica de la suspensió bacteriana a un valor de 0,6-0,65 a una longitud d'ona de 520 nm.

D'aquesta suspensió bacteriana es varen agafar 20 mL, i es varen inocular a diferents matrassos que contenien 80 mL de TSB, d'una banda, i a d'altres que contenien la mateixa quantitat del medi descrit en l'apartat 4.1, de l'altra.

Paral·lelament es varen agafar 20 mL de la suspensió bacteriana per calcular el pes sec de la biomassa cel·lular. Els matrassos es varen portar a incubar a 30°C amb agitació constant de 120 rpm. La presa de mostra es va realitzar a diferents temps, seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2.

Els cupons que havien estat en contacte amb els microorganismes es varen processar per a la seva observació per microscòpia de rastreig, tal com està explicat en l'apartat següent.

3.13 Estudi de la formació de biopel·lícules

3.13.1 Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

3.13.1.1 Sobre la superfície de cupons de coure

Per veure si hi havia formació de biopel·lícules a sobre dels cupons de coure, es varen col·locar cupons de coure de la manera descrita en l'apartat 3.9, en contacte amb el microorganisme durant un període de 72 hores. Passat aquest temps, els cupons es varen processar per a la seva observació recobrint-los amb carbó (per fer-los conductors) i poder observar la possible formació dels biofilms. El microscopi utilitzat fou un Hitachi S2300, amb un detector de BSE tipus Robinson.

3.13.1.2 Sobre un tros de canonada de coure

Durant un període aproximat de dos anys s'ha mantingut un tros de canonada de coure subjecte mitjançant un tub de tefló a una aixeta de la xarxa pública amb un goteig constant d'aigua. El tros de canonada es va recollir i separar del tub de tefló i en ambdós es varen observar mitjançant microscòpia de rastreig si hi havia formació de biopel·lícules. El processament de la mostra i el microscopi utilitzat fou el mateix que en l'apartat anterior.

3.13.2 Obtenció d'imatges a partir d'electrons retrodispersats

De la mateixa suspensió bacteriana que havia estat en contacte amb els cupons de coure, es va agafar una alíquota, es va centrifugar, es va rebutjar el sobrenedant, es va ressuspendre amb sèrum fisiològic i una gota de la suspensió es va dipositar a sobre d'un portaobjectes que es va deixar assecar a l'aire per afavorir la seva fixació al vidre. La mostra es va processar segons l'apartat 3.13.1.1 i es va observar amb el microscopi SteroScan S-360 (Cambridge Instrument UK) el qual també té un detector d'electrons retrodispersats. Les imatges que proporcionen aquests tipus d'electrons donen informació sobre el tipus d'àtoms que es troben a la superfície de la mostra, ja que metalls de nombre atòmic alt apareixen en tons més clars i els elements lleugers més foscos.

4. RESULTATS i DISCUSSIÓ

4.1 Determinació de la concentració mínima inhibidora (CMI)

Els microorganismes necessiten metalls i altres elements pels seu creixement perquè aquests tenen implicacions en diverses funcions enzimàtiques i estructurals del bacteri (Hughes i Poole, 1989). El coure és un microelement essencial per a la majoria dels microorganismes, però en excés resulta altament tòxic, ja que quan el Cu (II) entra dins la cèl·lula bacteriana es redueix a la forma de Cu (I), que ràpidament reacciona unint-se als grups tiols i als aminoàcids, promovent l'oxidació i l'entrecruament de les proteïnes, induint, a la llarga, la mort cel·lular (Silver i Phung, 2005). Malgrat tot, alguns d'ells desenvolupen mecanismes de detoxificació (Harwood i Gordon, 1990).

És per això que amb la finalitat de conèixer el comportament d'*A. radiobacter* EPS-916 enfront del coure es va determinar la concentració mínima inhibidora (CMI) duent a terme diferents sèries de concentracions de sulfat de coure i observant la viabilitat del microorganisme. Després de diferents sèries es va determinar que la CMI era de 6 mM tal com es resumeix en la taula següent.

Taula 4.1. Observació de la viabilitat del microorganisme enfront a les diferents concentracions de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

$[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ (mM)	Creixement	$[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ (mM)	Creixement
1,0	+++	5,5	+++
2,5	+++	5,75	+++
3,0	+++	6,0	---
3,5	+++	6,5	---
4,0	+++	7,0	---
4,5	+++	7,5	---
5,0	+++		

El valor de la CMI és inferior a la que té el mateix microorganisme amb altres metalls abans estudiats, com el tori que es va delimitar a 7 mM (Calafat, 1998), o com per

l'urani que es va determinar a un valor de 6,4 mM (Grasa, 1996), si bé les sals utilitzades no foren les mateixes a la utilitzada pel coure. Una vegada determinada la CMI es va adaptar la soca a una concentració de 5 mM de coure, on a les 48 hores s'observa creixement òptim. En totes les sèries es varen fer plaques de control del medi de cultiu sense sal del metall per observar la viabilitat del microorganisme.

4.2. Captació de coure per *Agrobacterium radiobacter* EPS- 916

Els microorganismes han hagut de coexistir amb metalls pesats en ecosistemes contaminats de fa molts segles, i l'evolució ha fet que hagin desenvolupat mecanismes específics per tal de poder-los tolerar millor, incloent, transformacions enzimàtiques, processos de precipitació i bioacumulació (Bruins *et al.*, 2000). La naturalesa de la bioacumulació depèn del microorganisme i del metall en particular. Malgrat la toxicitat del coure, hi ha espècies bacterianes que no només poden créixer en la seva presència sinó que en són capaces d'acumular-ne per diferents processos.

Després de determinar la CMI del microorganisme pel coure, es planteja si seria capaç d'acumular-lo. La quantificació del coure acumulat per les cèl·lules es va realitzar després de la digestió de les mateixes, tal com s'explica en l'apartat de material i mètodes. L'expressió dels resultats de captació es fa d'acord amb la fórmula següent:

$$\text{Captació de Coure (C)} = \frac{(\text{Cu}_i \times \text{Vt})}{\text{P}}$$

On:

Cu i = valor de la concentració a cada temps, en ppm

Vt= 100 mL

P= gram de pes sec de la biomassa (gps)

Les unitats de captació del metall s'expressaran com a mil·ligrams de coure, per gram de pes sec de biomassa cel·lular (mg Cu/gps). També s'ha calculat la captació màxima, és a dir, la que s'obtindria si tot el coure present en la solució fos captat pels bacteris.

La utilització del sulfat de coure com a font de coure en els experiments ve recolzada pel fet que és una sal molt soluble en aigua (fàcilment es ionitza i produeix Cu^{2+}) i, a més, s'ha demostrat que la presència d'aquest ió en les aigües de beguda

és el responsable dels efectes gastrointestinals, si els nivells de coure traspassen els límits permesos per causes com ara la corrosió bacteriana (Pizarro *et al.*, 2001).

Els diferents experiments es varen realitzar durant un període de temps de 24 hores assajant diferents concentracions de sal de coure per tal de veure el comportament del microorganisme.

Es varen fer tres assajos diferents, treballant amb tres inòculs diferents i cada un es va realitzar per triplicat. Els resultats obtinguts es presenten en les taules i gràfiques següents:

Captació (mg Cu/ gps)			
temps (h)	a	b	c
1	11,30	9,74	12,63
2	11,90	10,20	13,25
6	13,86	12,12	19,27
24	19,91	26,37	25,87

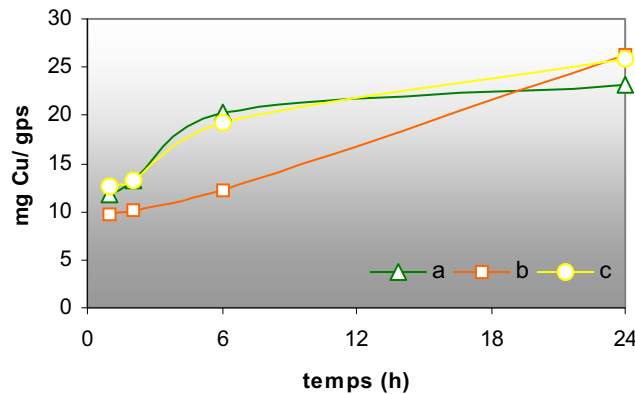
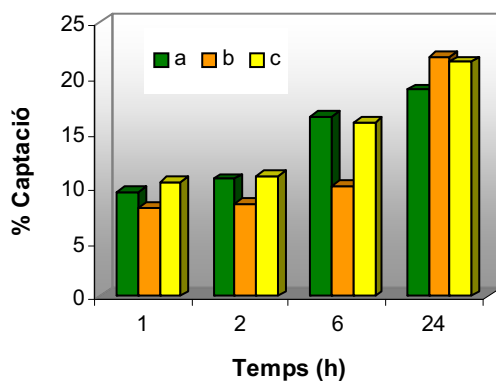


Fig. 4.1 Evolució de la captació de Cu per part d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 en solucions 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ amb tres inòculs diferents amb pes sec de: (a) 45,5 mg, (b) 42,2 mg i (c) 45,9 mg.



Temps (h)	% Captació de coure		
	a	b	c
1	9,58	8,05	10,43
2	10,7	8,43	10,94
6	16,38	10,01	15,92
24	18,83	21,79	21,37

Fig. 4.2 Percentatges de captació de Cu per part d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 en solucions 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ amb tres inòculs diferents de pes sec: (a) 45,5 mg, (b) 42,2 mg i (c) 45,9 mg.

Els primers resultats obtinguts ens varen deixar veure que *A. radiobacter* era capaç d'acumular el coure i seguir una evolució de captació ascendent a mesura que transcorria el temps, amb un màxim de captació a les 24 hores. *A. radiobacter* ja va demostrar la seva capacitat de capturar altres metalls com el crom (Llovera *et al.*, 1993) o el tori (Calafat, 1998). A més, hi ha estudis que han demostrat que *biofilms* d'*Agrobacterium sp.* aïllats de canonades de coure poden incrementar el coure de l'aigua de beguda, fet que implica que també el pot acumular (Critchley *et al.*, 2003_b).

Aquests primers experiments ens varen fer adonar que la captació, a la primera hora d'estar en contacte el metall amb el microorganisme, era important, la qual cosa podria indicar que tenen lloc processos de biosorció del metall. La biosorció involucra l'acumulació de metalls en la superfície de les cèl·lules o fraccions cel·lulars per adsorció o intercanvi iònic (Ehrlich, 1986). En contrast amb la captació intracel·lular, la biosorció és un procés ràpid, reversible i independent del metabolisme energètic. Per aquesta raó, tant la biomassa viable com la no viable es poden utilitzar per a la recuperació de metalls en solucions (Kelly *et al.*, 1979). Dönmez i Aksu (2001) varen observar aquest comportament estudiant l'acumulació de coure per part de *Candida sp.* i van concloure que la captació del metall tenia lloc per dos processos diferents, un ràpid i independent de la temperatura i del metabolisme on estaven implicades unions de cations als llocs electronegatius de la paret, seguit d'un procés lent, on les quantitats acumulades eren molt més elevades.

Cal tenir en compte que abans de posar en contacte el microorganisme amb la solució de sulfat de coure, l'inòcul es va fer créixer en plaques de Müeller-Hinton amb coure per afavorir-ne l'adaptació ja que, com reforcen alguns estudis, són les soques que han estat adaptades les que tenen més capacitat per absorbir el coure (Dönmez i Asku, 2001). És per això que abans de fer els estudis es va determinar la concentració de coure que tenia el microorganisme abans de ser inoculat, per evitar errors en la determinació dels valors acumulats de coure en funció del temps, i els valors sempre foren inferiors a 1 mg/gps.

A partir d'aquí, es varen dissenyar un seguit d'experiments amb diferents biomasses i diferents concentracions de sulfat de coure per veure l'evolució que seguia la captació del metall a més concentració. Els resultats dels experiments realitzats a una concentració 1mM es mostren tot seguit, on es veu l'evolució de la captació del metall així com l'evolució que experimenta la biomassa microbiana (expressada com a unitats formadores de colònies per mL (ufc/mL) present en el medi.

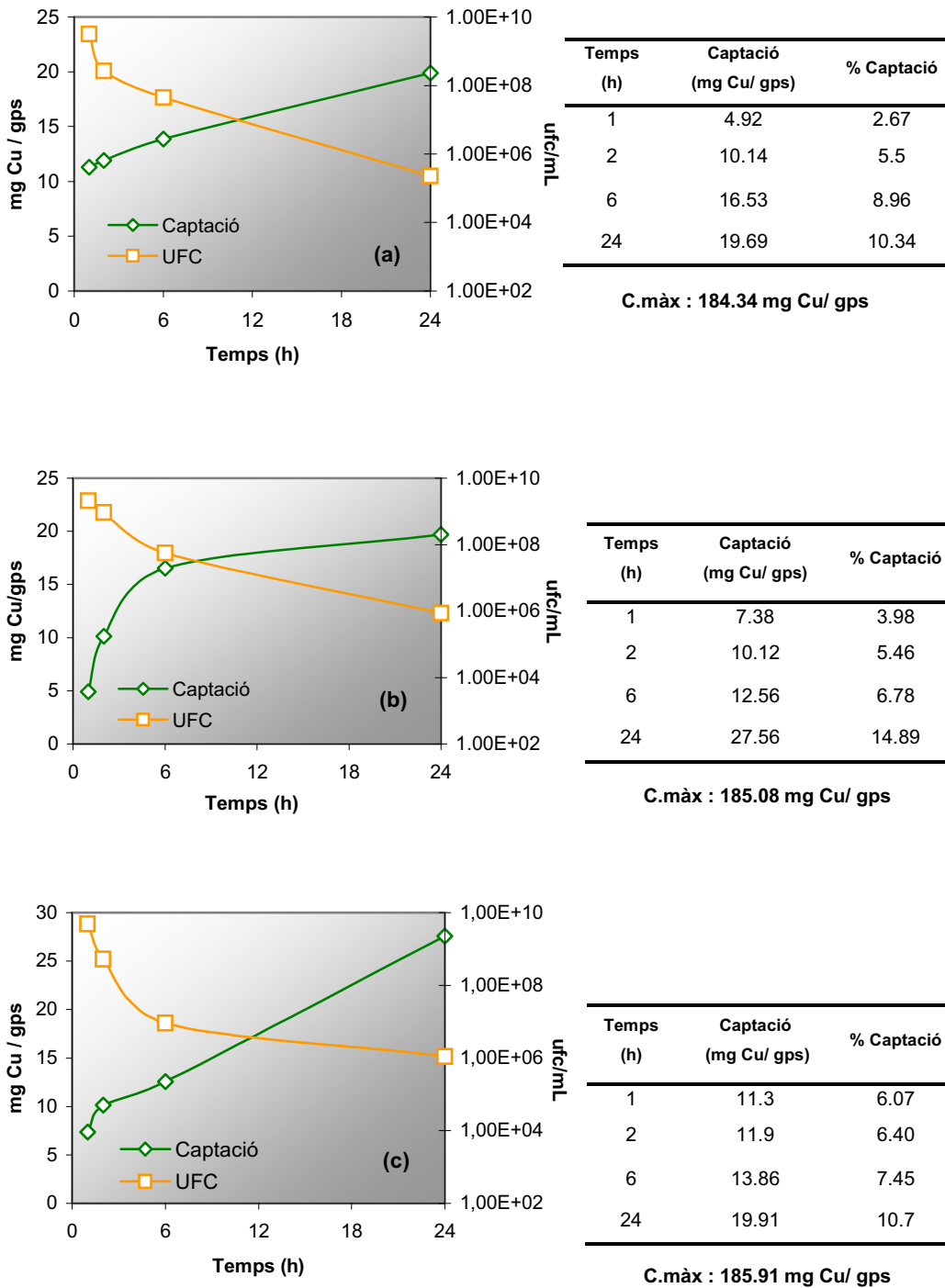
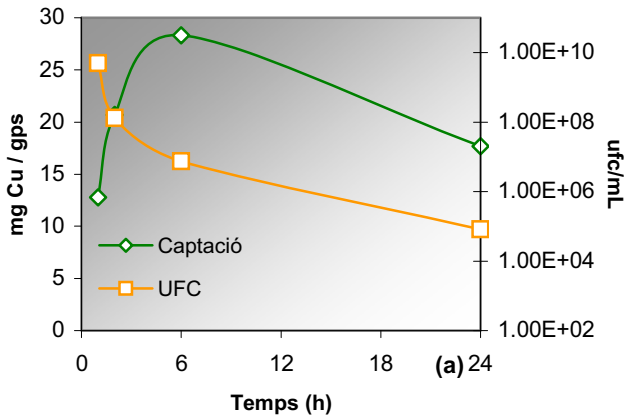


Fig. 4.3 Evolució de la captació de Cu per part d'*A. radiobacter* enfront de solucions de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a concentració d'1 mM en funció del temps, així com la variació de la biomassa en assajos amb un pes sec de: (a) 38,7 mg, (b) 42,4 mg i (c) 41,3 mg.

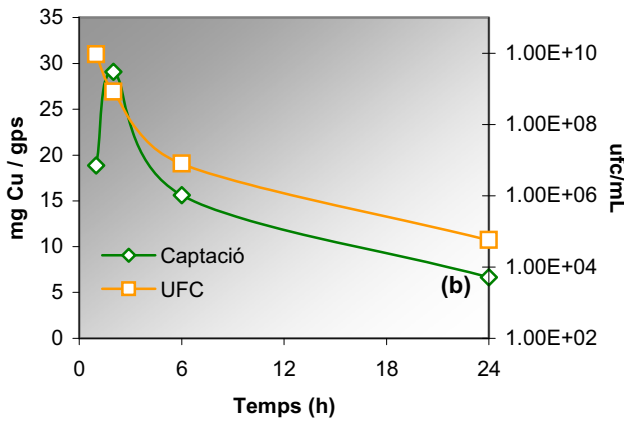
Segons els nostres resultats, la captació augmenta a mesura que passa el temps en el cas de concentracions de 0.5 mM i 1 mM respectivament, i s'obté un màxim d'acumulació a les 24 hores en ambdues concentracions. Per la seva banda, el nombre de microorganismes presents en la solució disminueix a mesura que avança el temps, a causa, probablement, de la toxicitat del coure i de la falta de nutrients en el medi. El fet de treballar amb cèl·lules en estat no proliferant no ens permet fer les observacions que reflecteixen els estudis de Critchley (2002) on demostren com afecta la presència de coure en el medi sobre la cinètica de creixement d'alguns microorganismes. En alguns casos la presència del metall no afecta a la cinètica de creixement de *A. delafieldii* ni d'espècies de *Corynebacterium*, però sí que té una clara implicació en el creixement de *Flavobacteria sp.* i *Pseudomonas sp.* on apareixen períodes de latència de fins a 20 hores abans de la fase exponencial de creixement quan hi ha coure en el medi de cultiu. Aquest allargament de la fase de latència en presència del metall seria provocat possiblement per la inducció de proteïnes específiques d'unió al coure, implicades en processos de detoxificació. A més, s'ha observat que és al final de la fase exponencial on s'obtenen els màxims de captació de coure (Dönmez i Asku, 2001). Els nostres recomptes de cèl·lules viables presents en el medi només demostren que la biomassa bacteriana va disminuint progressivament durant les 24 hores, si bé cal destacar que a les 24 hores hi ha recomptes que arriben a l'ordre de 10^6 , fet que deixa entreveure que es deuen desenvolupar mecanismes efectius de resistència al coure.

Una de les investigacions de Flatau i els seus col·laboradors (1986) amb una espècie de *Pseudomonas* marina va demostrar que el microorganisme era capaç d'incorporar intracel·lularment el Cd, on les cobertes cel·lulars jugaven un paper important. Aquesta captació intracel·lular no necessitava del metabolisme actiu de les cèl·lules. Els nivells de captació per part del coure són més baixos que els obtinguts en altres treballs amb el tori o el crom, causat segurament per l'efecte tòxic del metall sobre el microorganisme. Es varen fer estudis a una concentració major de 1,5 mM, els resultats dels quals es mostren tot seguit.



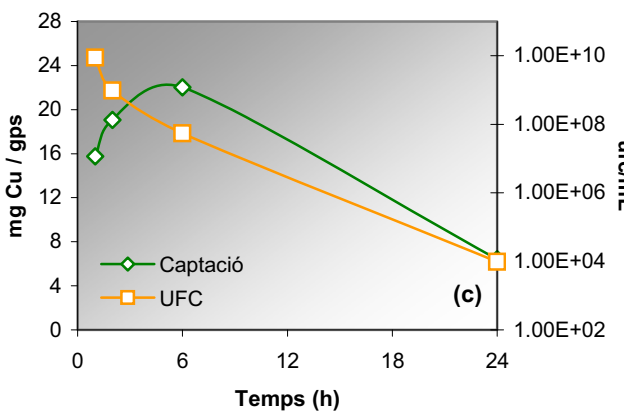
Temps (h)	Captació (mg Cu/ gps)	% Captació
1	12.77	5.52
2	20.67	8.94
6	28.3	12.24
24	17.68	7.65

C.màx : 231.11 mg Cu/ gps



Temps (h)	Captació (mg Cu/ gps)	% Captació
1	18.87	7.87
2	29.07	12.12
6	15.65	4.4
24	6.6	2.77

C.màx : 239.68 mg Cu/ gps



Temps (h)	Captació (mg Cu/ gps)	% Captació
1	15.75	2.45
2	19.06	3.85
6	22.03	5.15
24	6.41	2.71

C.màx : 233.45 mg Cu/ gps

Fig. 4.4 Evolució de la captació de Cu d'*A. radiobacter* enfront solucions de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a concentració 1,5mM enfront el temps, amb tres inòculs diferents, amb pes sec de: (a) 42,4 mg, (b) 45, 2 mg i (c) 43, 5 mg.

El comportament observat quan es realitzen experiments a una concentració major, no s' havia observat a les concentracions anteriors de 0.5 mM i 1 mM. Si bé en un dels tres experiments de la concentració de 1,5 mM, el pic màxim de captació es dona tan sols havent transcorregut una hora del contacte inicial, la màxima captació en els dos assajos restants es donen a les 6 hores de contacte del metall amb el microorganisme. A més, si bé a les 24 hores en les concentracions de 0.5 mM i 1 mM hi havia el màxim d'acumulació, a concentracions majors a les 24 hores s'obté una disminució acusada de la biomassa així com dels micrograms de coure acumulat. Aquest comportament es podria explicar perquè a concentracions majors de coure augmenta l'efecte tòxic per la cèl·lula i la viabilitat dels microorganismes presents a la solució, traduint-se amb una davallada en els valors d'acumulació a les 24 hores.

De les tres concentracions assajades és a la concentració menor on s'observen els percentatges de captació més elevats, això està d'acord amb altres estudis que conclouen que a baixes concentracions del metall és quan s'obtenen els valors d'absorció més elevats (Dönmez i Aksu, 2001). El percentatge més elevat de captació obtingut dels nostres experiments, 21,81 %, corresponent a les 24 hores de posar en contacte el microorganisme amb una concentració 0.5 mM del metall, és molt més baix que els obtinguts en altres estudis que assoleixen valors d'entre un 73% i fins i tot un 90 % de recuperació del metall mitjançant llevats en creixement.

Si bé nosaltres hem experimentat les limitacions que comporta el fet de treballar a nivell de laboratori amb bacteris no proliferants, en el camp de la bioremeiació hi ha resultats que demostren que els processos amb microorganismes inactius són atractius perquè la biomassa utilitzada no necessita cap aportació nutricional i això abarateix els costos dels processos. Segons Sakaguchi i els seus col·legues (1981), al treballar amb *C.regularis*, i amb U i Mo respectivament, varen comprovar que l'acumulació era molt més elevada en cèl·lules mortes. Pümpel i Schinner (1986), a l'estudiar l'acumulació de plata per fongs, van trobar que aquesta no depenia de la viabilitat de les cèl·lules sinó de la superfície cel·lular. Micelis de fongs vius o morts, captaven el mateix. Els autors creuen que l'activitat metabòlica de les cèl·lules actives durant la fase exponencial inclou una elevada activitat enzimàtica, algunes de les quals poden estar involucrades en complexar i unir els metalls (Malik, 2004).

Per poder comparar els percentatges de captació i veure com afecta la concentració inicial del metall, es varen confrontar els resultats obtinguts d'acumulació per un mateix inòcul. El temps de contacte va ser de 24 hores, i les concentracions que es varen comparar varen ser de 0,5 mM i 1 mM respectivament. Els resultats s'expressen en la taula i gràfica següent:

Taula 4.2. Valors de la captació de coure de la soca EPS-916 enfront a diferents concentracions inicials de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Temps (h)	[$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]= 1mM		[$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]= 0,5 mM	
	mg Cu/gps	% Captació	mg Cu/gps	% Captació
1	11,30	7,25	9,74	8,50
2	11,90	7,63	10,2	8,43
6	13,86	8,89	12,12	10,08
24	19,91	13,00	26,37	21,80
C. Màx	155,90	100,00	120,99	100,00

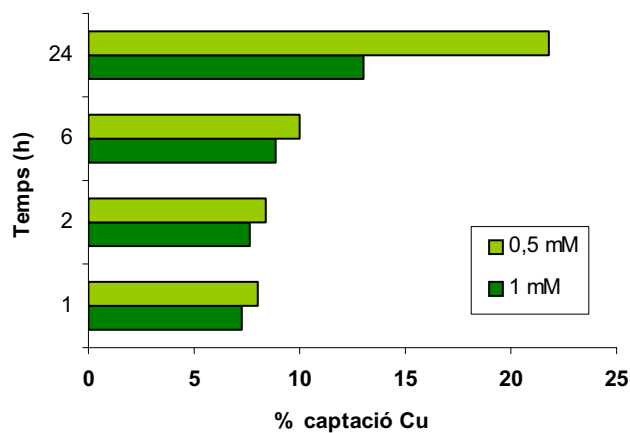


Fig. 4.5 Percentatges de captació d'*A. radiobacter* EPS-916 en dues concentracions diferents durant 24 hores.

El gràfic mostra els percentatges de captació del bacteri a les dues concentracions assajades. Si bé la captació del metall en ambdues concentracions augmenta amb el temps, es pot apreciar que la captació és major quan la concentració del metall és inferior, cosa que fa que a concentracions menors del metall és on s'obtinguin els percentatges de captació més elevats. Com ja s'ha comentat, aquest comportament a nivells baixos estaria d'acord amb diferents autors que han fet palès

en diferents estudis que els microorganismes posseeixen una capacitat òptima de recuperació de metalls pesats en el cas de nivell baixos dels mateixos (Merroun *et al.*, 1998). Els estudis realitzats a 48 hores, no mostren canvis significatius, presentant en ambdues concentracions els pics de captació més gran, en el temps més elevat.

Taula 4.3 Valors de la captació de coure de la soca EPS-916 enfront diferents concentracions inicials de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Temps (h)	[$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]= 0,5mM		[$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$]= 1 mM	
	mg Cu/gps	% Captació	mg Cu/gps	% Captació
1	10,50	6,00	11,80	8,60
2	15,22	9,57	13,18	9,62
6	18,40	11,50	20,90	15,00
24	22,6	14,22	23,20	17,10
C. Màx	158,92	100,00	136,92	100,00

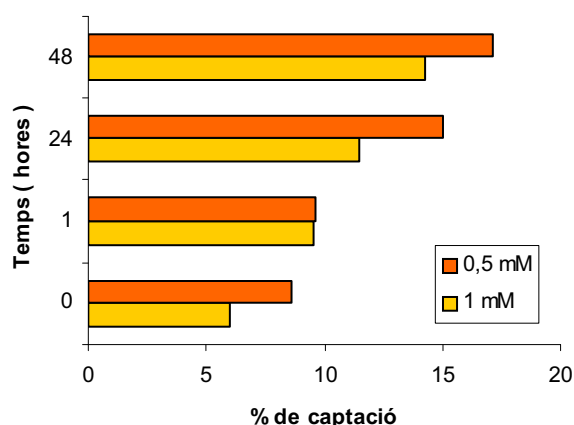


Figura 4.6 Percentatges de captació d'*A. radiobacter* EPS-916 en dues concentracions diferents durant 48 hores.

4.3 Estudi de la influència dels pH's àcids en la captació de coure

Entre els diferents factors que poden influir de manera negativa o positiva en els processos de captació d'espècies metàl·liques per part dels microorganismes hi ha la temperatura i el pH. Pel que fa a la temperatura, hi ha diversos estudis que mostren diferents comportaments dels microorganismes, com per exemple, en el cas de l'urani, que diferents assajos realitzats amb *Pseudomonas sp. EPS-5028* i la soca objecte d'estudi d'aquest treball varen demostrar que la temperatura no és un factor

que influeixi de manera clara sobre el procés de captació (Marqués *et al.*, 1991; Grasa, 1996). En canvi, amb altres metalls com el tori, Tsezos i Volesky (1981) varen concloure que increments de temperatura transformaven, en les seves condicions experimentals, la capacitat de captació per part de *Rizophus arrhizus*.

En referència al pH, així com passa amb la temperatura, hi ha descrits a la literatura diferents casos de com pot afectar o no aquest paràmetre a la captació del metall. Si bé el pH sembla un element clau que facilita i augmenta el potencial d'unió dels exopolímers a les canonades de coure quan aquest és àcid, promovent la seva corrosió i posteriorment facilitant l'acumulació del metall per part dels microorganismes que formen part d'un *biofilm* (Critchley *et al.*, 2004), altres autors no veuen que aquest sigui determinant, no tan sols per la unió dels exopolímers al coure, sinó que no troben relació entre el pH i la concentració de coure que poden acumular els bacteris (Dutkiewicz i Fallowfield, 1998). El pH també és un factor que pot afectar a la capacitat de solubilització del coure. Hi ha recerques en l'àmbit de la corrosió de les canonades de coure que han deixat entreveure que microorganismes formadors de biopel·lícules i aïllats en els sistemes de distribució d'aigua potable, com *Acidovorax delafieldii*, són capaços de produir àcids que augmentarien, d'una banda, el pH de l'aigua i, de l'altra, la concentració de coure en la fase aquosa. En contra, Critchley i els seus col·laboradors (2001) no varen trobar canvis significatius de pH en les aigües estudiades en les seves investigacions, i varen suggerir que els canvis de pH poden tenir lloc en la interfase metall-*biofilm* i que no sempre es veu traduït en un augment final del pH de l'aigua.

Després de veure el comportament d'*Agrobacterium radiobacter* davant solucions de coure, es va plantejar la hipòtesi de quin efecte tindria el pH i com afectaria al procés de captació del coure per part del nostre microorganisme. Prèviament s'havia observat que durant els experiments de captació amb $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, el pH de la solució anava disminuint lentament a mesura que passava el temps. Les lectures de pH de les solucions a l'iniciar experiments comprenien un rang de 5,0 a 5,4. A l'acabar els experiments, és a dir, a les 24 o 48 hores de contacte de la solució del metall amb el microorganisme (depenent de l'experiment), les lectures de pH comprenien intervals de 3,0 a 3,2. Per això es varen dissenyar alguns experiments seguint la mateixa metodologia abans descrita però en un rang de pH àcids, per veure com afectava aquest paràmetre o no a la captació total del metall per part del microorganisme. Els resultats s'expressen tot seguit:

Captació de Cu (mg Cu/gps)

Temps(h)	pH=3,4	pH=4,4	pH=5,4
0	14,39	13,5	13,9
1	14,22	14,24	14,89
24	17,8	15,64	17,8

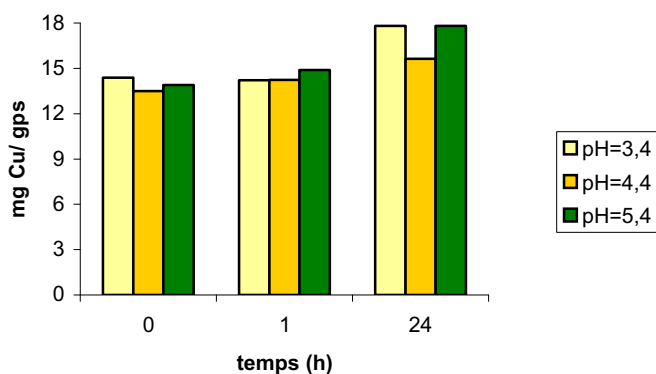


Fig 4.7. Valors de la captació de Cu per part d'*A. radiobacter* EPS-916 en una solució 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a diferents pHs i durant 24 hores.

Captació de Cu (mg Cu/gps)

Temps(h)	pH= 3,4	pH=4,4	pH=5,4
0	8,2	9,2	12,8
1	9,3	11,9	13,1
24	13,8	20,1	21,3

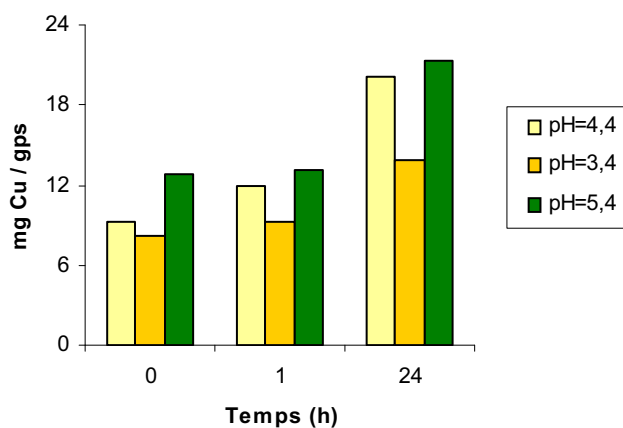


Fig 4.8. Valors de la captació de Cu per part d'*A. radiobacter* EPS-916 en una solució 1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a diferents pHs i durant 24 hores.

Captació de Cu (mg Cu / gps)

Temps (hores)	pH=3,4	pH=4,4	pH=5,4
0	8,74	7,3	6,61
1	8,9	7,7	9,5
24	14,8	12,86	15,5
48	13,63	12,6	13,52

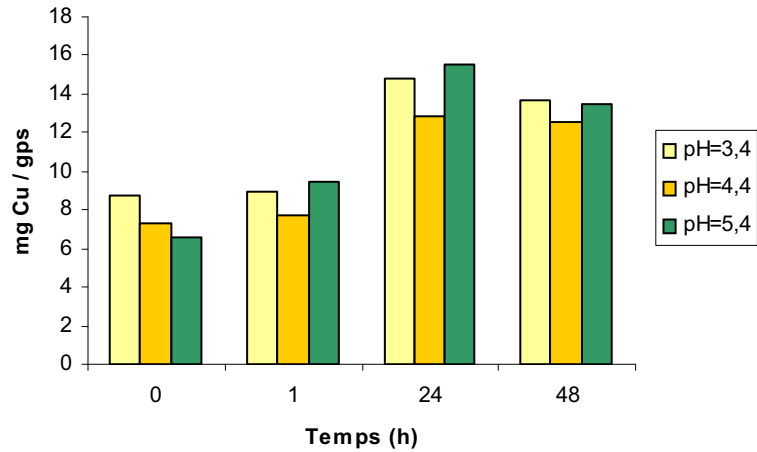


Fig 4.9. Valors de la captació de Cu per part d'*A. radiobacter* EPS-916 en una solució 1 mM de CuSO₄·H₂O a diferents pHs durant 48 hores.

Captació de Cu (mg Cu / L)

Temps(hores)	pH=3,4	pH=4,4	pH=5,4
0	14,4	14,43	15,43
1	16,2	16,4	18,6
24	17,8	17,75	19,5
48	8,9	9,6	12,25

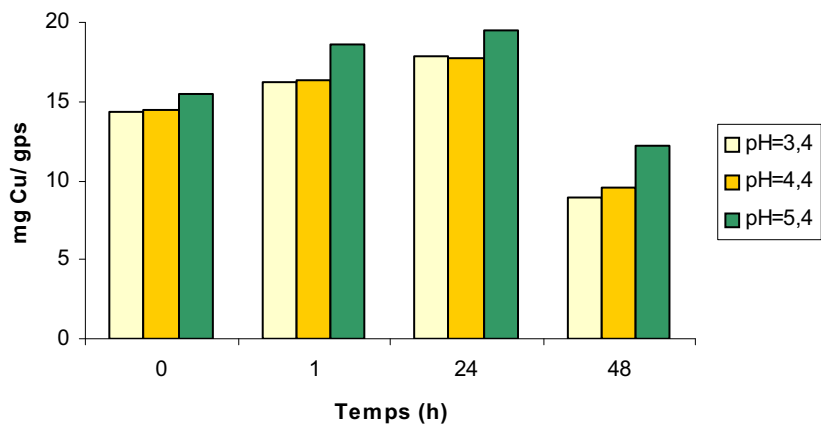


Fig 4.10. Valors de la captació de Cu per part d'*A. radiobacter* EPS-916 en una solució 0,5 mM de CuSO₄·5H₂O a diferents pHs durant 48 hores.

Els primers estudis que es realitzaren foren a 24 hores i les concentracions de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ assajades foren 0,5 i 1,0 mM respectivament. A la llum dels primers resultats, es pot observar que els valors de captació en els tres pH estudiats augmenten en el transcurs del temps, com ja s'havia observat en els assajos anteriors. S'observa que en el pH de 5,4 és on la captació sembla més elevada, en canvi, pHs més àcids es tradueixen en valors de captació inferiors. Els estudis a 48 hores mostren un comportament similar, si bé hi ha una davallada acusada dels valors de coure acumulat en aquest temps. Aquest comportament també es va observar en els estudis abans descrits i es poden deure en part a la toxicitat que comporta el coure pel microorganisme afectant-ne la seva viabilitat. Aquest comportament s'havia observat en els estudis de captació realitzats a la concentració 1,5 mM de sulfat de coure, ja que a les concentracions menors els valors de captació de metall augmentaven lentament amb el temps, fins i tot a les 48 hores (taula 4.5). Pel que fa al recompte de viables a les 24 hores, foren considerablement més baixos als pHs més àcids. De fet, es va dissenyar un experiment a pH 2,4, però la viabilitat del microorganisme a la primera hora de contacte va ser ja negativa i no es va poder du a terme.

Els valors de coure acumulats no són significativament diferents als obtinguts en els experiments exposats en l'apartat 4.2. La quantitat de coure captat és major a les concentracions inferiors de sulfat i, pel que fa als diferents pHs estudiats, altre cop és en el pH més bàsic (5,4) on l'acumulació del metall és major. Els resultats obtinguts a pHs més àcids no són concloents i no ens permeten saber amb certesa fins a quin nivell els pHs estudiats afecten el procés d'acumulació de coure per part del microorganisme, ja que els nivells de coure quantificats a vegades són més grans al pH més àcid (3,4) que a pH 4,4. Per tant, és a pH 5,4 on en tots els estudis realitzats la captació és més elevada que, de fet, és el pH inicial en el qual oscil·la la solució de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ utilitzada en els experiments.

4.4 Captació de coure per l'exopolisacàrid produït per *Agrobacterium radiobacter* EPS-916.

Els polímers extracel·lulars bacterians són responsables, entre d'altres coses, de les unions que poden experimentar els microorganismes integrants d'un *biofilm* a metalls, com ara el coure de les canonades o a altres tipus de metalls presents en reactors biològics (Costley i Wallis, 2001). Alguns d'ells s'han utilitzat en la bioremediació utilitzant fangs depuradors, on els exopolímers de *Zoogloea ramigera* han demostrat ser altament eficaços per atrapar metalls (Norber i Perrson, 1984). Si bé el nostre objectiu no era estudiar específicament el comportament de l'exopolímer enfront de solucions de coure, es varen realitzar una sèrie d'estudis previs per veure el seu comportament d'aquests enfront del coure, no només pel paper que juguen en els processos d'adhesió sinó pels efectes corrosius que poden tenir promovent la ionització del metall per reacció amb grups funcionals àcids (Geesey *et al.*, 1986). A més els EPS produïts pels microorganismes poden ser responsables de la retenció dels metalls, proporcionant llocs d'unió a cations, ajudant a protegir les cèl·lules (Vilchez *et al.*, 2007). A més, els exopolímers ja han demostrat que són capaços d'acumular altres metalls pesats com el crom (Priester *et al.*, 2006) (Marques *et al.*, 1982).

És per això que es varen posar en contacte dues solucions de concentracions diferents de l'exopolímer prèviament obtingut d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 amb una solució de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ de concentració 4 mM i 2 mM, i es va quantificar el coure retingut en l'EPS. Els temps de contacte varen ser de deu i vint minuts respectivament. Les gràfiques que es recullen en la figura 4.11 mostren, en a i b, els valors de Cu retingut en el polímer en les dues concentracions assatjades de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, i la taula 4.4 mostra els percentatges de coure retingut respecte al màxim teòric de Cu disponible en el medi. Els temps de contacte escollits per prendre les mostres venien recolzats pel fet que la velocitat del procés, si bé hi ha certa variabilitat segons l'organisme utilitzat, es pot considerar que és molt ràpida i poden oscil·lar entre tan sols 5 segons pel cas de *Pseudomonas aeruginosa*, o els 10 minuts de *Saccharomyces cerevisiae* (Strandberg *et al.*, 1981), a un parell d'hores en el cas de *Chlorella regularis* (Sakaguchi *et al.*, 1981).

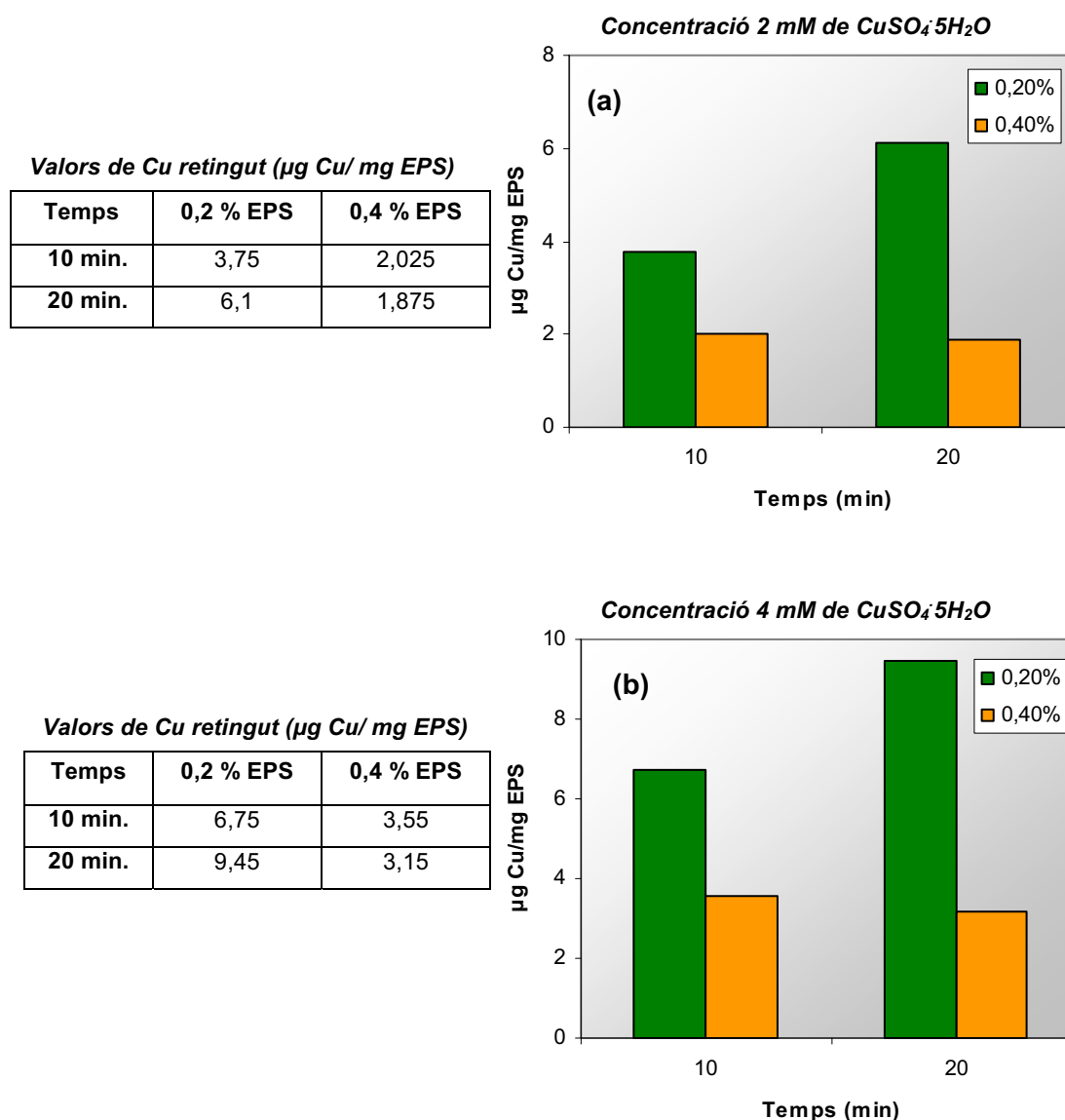


Fig 4.11 Valors de Cu retingut per l'exopolímer, després de posar en contacte una solució 2 mM (a) i 4 mM (b) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ amb dues concentracions d'exopolímer diferents.

Taula 4.4 Percentatges de Cu retingut respecte al màxim teòric per l'EPS en els assajos realitzats.

	2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		4 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	
	0,20%	0,40%	0,20%	0,40%
10 min	11,80%	12,73%	10,61%	11,16%
20 min	19,18%	11,79%	14,85%	9,90%

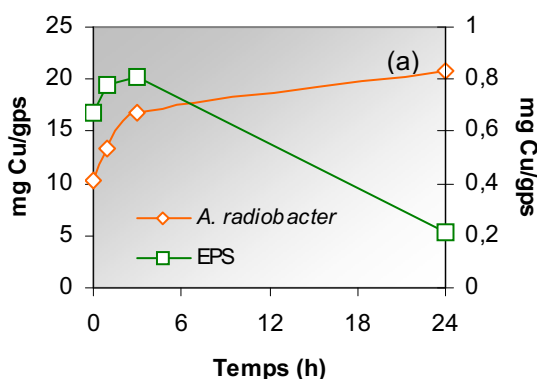
Els nostres resultats són preliminars però deixen entreveure que la producció d'exopolímers pot augmentar la retenció de coure si es donen les circumstàncies idònies. Els valors obtinguts fan palès que una contaminació bacteriana amb una moderada producció d'EPS implicaria una major capacitat de captació a mesura que avança el temps, mentre que una concentració més elevada d'exopolímer, o una major contaminació, suposa una ràpida acumulació que no millora, fins i tot disminueix al llarg del temps. Els valors obtinguts, podrien concordar amb els resultats obtinguts per diferents autors, a partir dels quals suggereixen que hi ha un fenomen de saturació de l'exopolisacàrid (Sutherland, 2001) ja que a una concentració més elevada de metall, els valors retinguts també augmenten, però els valors de Cu als 20 minuts són inferiors.

Després d'aquests experiments caldrien experiments més acurats per estudiar més a fons l'implicació dels polímers en aquest tipus de processos. Els valors de coure retinguts obtinguts són més baixos als trobats en altres estudis similars. La captació d'urani per l'exopolímer produït per *Pseudomonas sp.* EPS-5028 va demostrar ser un procés ràpid i efectiu, ja que als pocs segons de contacte amb una solució de 50 µg d'urani/mL el 98% del metall era adsorbit pel polímer. La naturalesa del polímer també juga un paper important. Modificacions en els grups acil que es troben esterificant els sucres que componen el polisacàrid són claus en els processos de captació d'urani, ja que el biopolímer desacilat presenta una capacitat màxima inferior a la del biopolímer no modificat (Bonet, 1990).

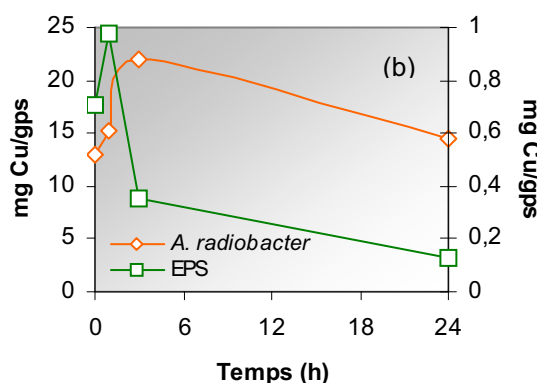
El coure present en les canonades dels sistemes de distribució d'aigua potable, es pot alliberar per les interaccions amb els exopolímers bacterians i passar a la cadena tròfica (Critchley, 2004). D'altra banda, els processos d'adsorció del coure per part dels EPS de les biopel·lícules s'ha vist que pot promoure la supervivència d'altres organismes sensibles al metall, a causa que els exopolímers redueixen les concentracions de coure lliure, ja que són capaços d'adsorbir el metall dissolt de la fase aquosa (Critchley *et al.*, 2002). El coure, a més, pot modificar la composició dels EPS si han estat en contacte o no amb el metall, com va demostrar Vilchez (2007) a l'observar que el contingut total de carbohidrats i grups acetil està considerablement elevat en presència del coure, si bé el contingut en proteïnes disminueix un 46%.

4.5 Captació de coure per cèl·lules productores d'exopolímer

El medi de preparació de l'inòcul utilitzat fins ara per estudiar la captació de coure a partir de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ és un medi nutritiu definit per Estañol (1988), el qual minimitza en gran part la producció de l'EPS per part del microorganisme. D'aquesta manera s'evita una excessiva producció de polímer que podria interferir en la captació de coure per part del microorganisme. Després d'observar, per separat, el comportament d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 i de l'exopolímer que ell mateix sintetitza, es varen fer experiments variant la composició del medi de cultiu variant l'aportació de glucosa, de KH_2PO_4 i de NH_4Cl , tal com s'explica en l'apartat 3.6.1 de material i mètodes. La finalitat era veure l'evolució de la captació tant del microorganisme com de l'EPS quan estaven junts en el medi de cultiu. Les concentracions de metall assajades varen ser 1 mM i 1,5 mM. Els resultats es mostren tot seguit:



Acumulació de Cu (mg Cu/gps)		
Temps (h)	<i>A. radiobacter</i>	EPS
0	10,25	0,67
1	13,27	0,78
3	16,7	0,81
24	20,8	0,21



Acumulació de Cu (mg Cu/gps)		
Temps (h)	<i>A. radiobacter</i>	EPS
0	12,96	0,706
1	15,22	0,977
3	21,98	0,353
24	14,56	0,125

Fig. 4.12 Valors de la captació de Cu expressada en mg Cu/gps per part del microorganisme i de l'EPS que produeixen, en una concentració de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (a) i 1,5 mM (b).

Tal com es pot veure en la figura 4.12, les mostres es varen agafar a diferents temps, i, d'una banda, es va quantificar el coure captat per les cèl·lules i, de l'altra, el coure que havia retingut l'EPS. Es pot observar que la captació per part de les cèl·lules és major al que s'esdevé en l'exopolímer. D'altra banda, l'evolució de la captació del metall, al llarg del temps és diferent en el cas de les cèl·lules que de l'EPS. Mentre que en les cèl·lules augmenta la captació a mesura que transcorre el temps, en el cas del polímer, els resultats observats deixen entreveure, un altre cop, el possible fenomen de saturació, tal com es va obtenir quan es va assajar amb el polímer aïllat de *A.radiobacter EPS-916*. A concentracions majors del la sulfat de coure la captació per part del microorganisme és inferior a temps 24 hores, a diferència de la concentració menor, tal com ja s'havia detectat en els experiments anteriors. Segons Fleming (2002), hi ha recerques en l'àmbit de la bioremediació que han demostrat l'acumulació de ions coure dins els bacteris i en la matriu d'EPS dels biofilms formats per *B.megaterium*. En aquest àmbit es considera avantatjós, per un procés continu, que els microorganismes es mantinguin viables durant el transcurs del mateix, ja que permet l'autoregeneració i redueix els problemes derivats dels residus orgànics. És per això que en alguns casos, per mantenir viables els microorganismes és important reduir la captació intracel·lular, ja que els metalls pesats poden resultar tòxics al desplaçar als essencials en els grups prostètics d'alguns enzims (Scott et al., 1986).

Els resultats d'aquests experiments fan palès que tant el microorganisme com l'exopolímer que excreta tenen potencial per capturar el coure provinent de solucions aquoses de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. L'acumulació de coure per part de l'EPS, si bé és força més minsa que el cas de la captació cel·lular, contribueix també al procés de captació. Això, traslladat als sistemes de canonades de la xarxa de distribució d'aigua, on la formació de biopel·lícules és freqüent, pot augmentar el risc de contaminació de l'aigua (Dutkiewicz i Fallowfield 1998).

4.6 Determinació de l'estructura cristal·lina del coure

Per a la identificació de l'estructura cristal·lina del coure acumulat per la soca *A. radiobacter* EPS-916, es va analitzar la mostra obtinguda mitjançant difracció de raigs X per les seves anàlisis de fases i la seva possible identificació mitjançant comparació amb la base de dades existents.

La soca s'havia d'adaptar abans de l'assaig a una concentració de 5mM de coure en plaques de Müeller-Hinton metall. Els processos que es varen realitzar per l'obtenció de la mostra varen ser obtenció del sediment cel·lular després d'estar en contacte amb la solució de coure, destrucció de la matèria orgànica amb H₂O₂ a 70°C, centrifugació del sediment a 4.500 rpm durant 10 minuts, assecat del mateix a 65°C.

Al finalitzar el tractament es va obtenir un espectre que es mostra a la figura 4.13. L'absència d'un ordenament periòdic de plans cristal·logràfics indica que es tracta d'un sòlid amorf, ja que el diagrama de raigs X mostra una corba difosa. Això estaria en concordança amb els resultats obtinguts dels precipitats observats a dins de bacteris aïllats de mostres contaminades amb crom (McLean, 2000). És difícil preveure les repercussions que pot comportar per al microorganisme el fet que el metall acumulat estigui o no en forma de cristalls, si bé estaria relacionat amb el grau de toxicitat que exerceix sobre el bacteri. Grasa (1996) va determinar que l'estructura cristal·lina de l'urani acumulat per la mateixa soca objecte d'estudi d'aquest treball es trobava en forma de *Chernikovite syn.* H₂(UO₂)₂(PO₄)·8H₂O i Calafat (1998) va demostrar que el mateix microorganisme acumulava el tori en forma de nanocristalls, en canvi els resultats de l'anàlisi per difracció de raigs X del mateix element però en *Mycobacterium smegmatis* deixaven veure que aquest, dins el microorganisme, era clarament amorf (Andres *et al.*, 1995). En altres estudis, després d'analitzar la naturalesa química del níquel acumulat per *A. niger*, els resultats varen concloure que es trobava en forma de cristalls d'oxalat, si bé moltes de les soques estudiades, incloent-hi bacteris i fongs, demostren que l'acumulació del níquel té lloc per fenòmens de superfície (Malik, 2004).

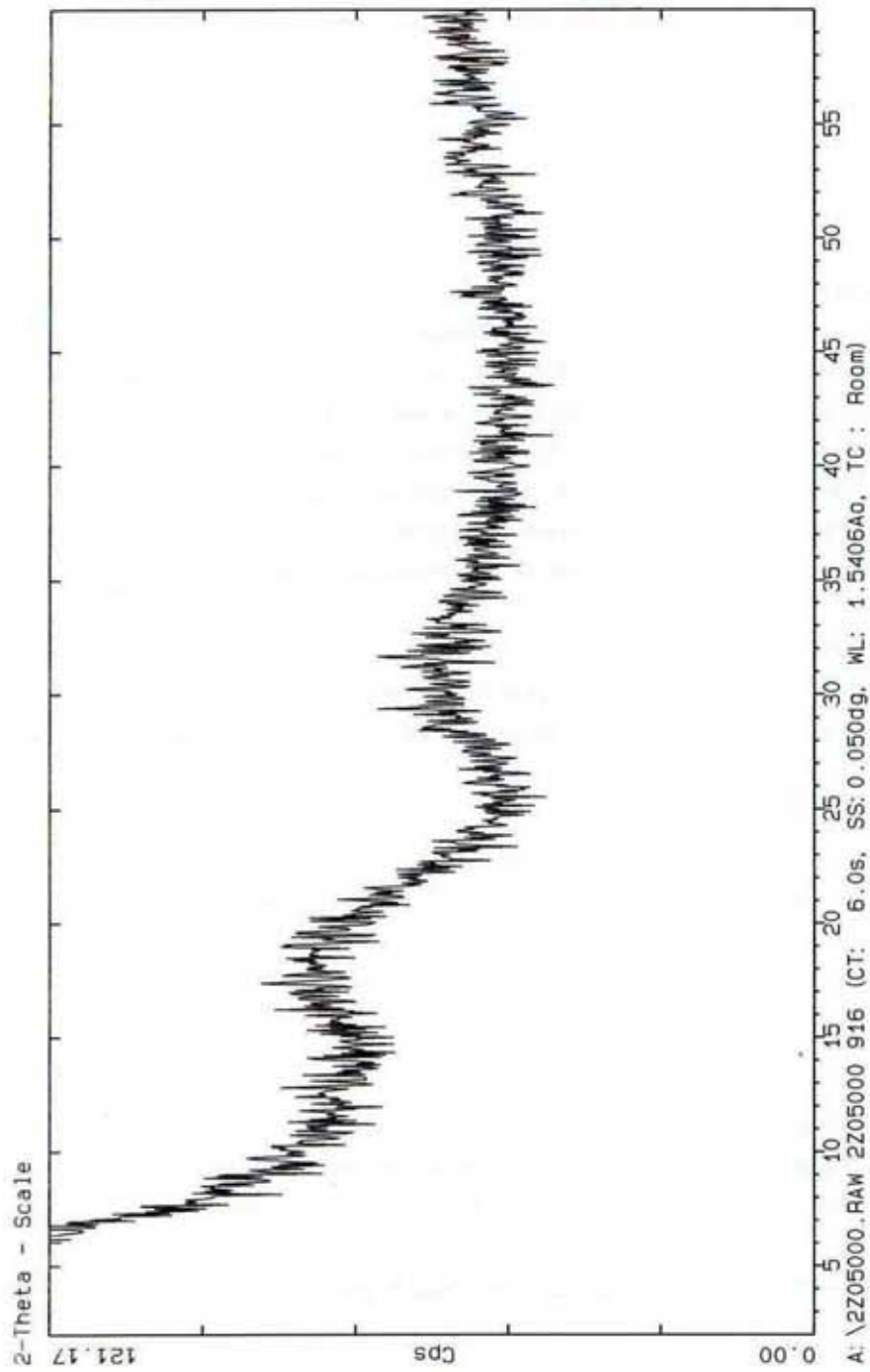


Fig. 4.13 Diffractograma de les mostres de Cu provinents de la captació d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916

4.7 Observació d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 per microscòpia electrònica de transmissió (TEM)

En les últimes èpoques, l'avanç de tècniques sofisticades de microscòpia ha facilitat la visualització d'estructures cel·lulars i molts estudis s'han centrat a estudiar les localitzacions dels metalls acumulats dins els bacteris. Moltes vegades els resultats deixen predir si el procés de captació depèn del metabolisme i es tradueix en una acumulació intracel·lular o bé si són fenòmens de superfície (Malik, 2004).

Després d'estudiar l'evolució de la captació per part de la soca EPS-916 i quantificar-ne el metall acumulat mitjançant absorció atòmica segons s'ha exposat en els apartats anteriors, es varen processar mostres per poder-les observar mitjançant microscòpia electrònica de transmissió amb la finalitat d'observar el bacteri i la possible acumulació intracel·lular de coure. Tanmateix també s'observà una mostra control que no havia estat exposada a la solució de metall. Tal com es veu en la figura 4.14, les primeres observacions microscòpiques del microorganisme mostraren la presència d'uns cúmuls més foscos a l'interior dels bacteris que no s'observaren en la mostra control. Això demostrava que el microorganisme és capaç d'acumular a dins el seu citoplasma el coure, si bé tècniques de microanàlisi efectuades posteriorment ens varen confirmar que els cúmuls es tractaven de coure. Aquest mecanisme d'acumulació contrasta amb el que va tenir *A. radiobacter* enfront del tori, ja que les micrografies fetes al microorganisme després d'haver estat en contacte 24 hores amb el metall mostraren cúmuls del metall en la part externa dels bacteris. Aquests dipòsits densos al feix d'electrons estaven associats a nivell de l'envolta bacteriana (Calafat, 1998). Això posa de manifest que els mecanismes d'acumulació dependran del tipus del metall. Altres autors també han descrit l'acumulació intracel·lular de metalls. Marques *et al.*, (1982) varen estudiar l'acumulació de Cr per *P. aeruginosa* i varen trobar que quan aquest microorganisme creixia en presència del metall podien observar dipòsits en les cèl·lules, els quals no van presentar-se en els controls incubats en absència d'ells. Enfront del níquel, la soca 4F39 identificada com a *Pseudomonas fluorescens*, després d'haver estat 1 hora en contacte amb el metall, va mostrar que totes les cèl·lules apareixien envoltades per unes estructures denses al feix d'electrons en forma d'agulla o amb forma hexagonal associats a l'envolta externa (López, 1999).

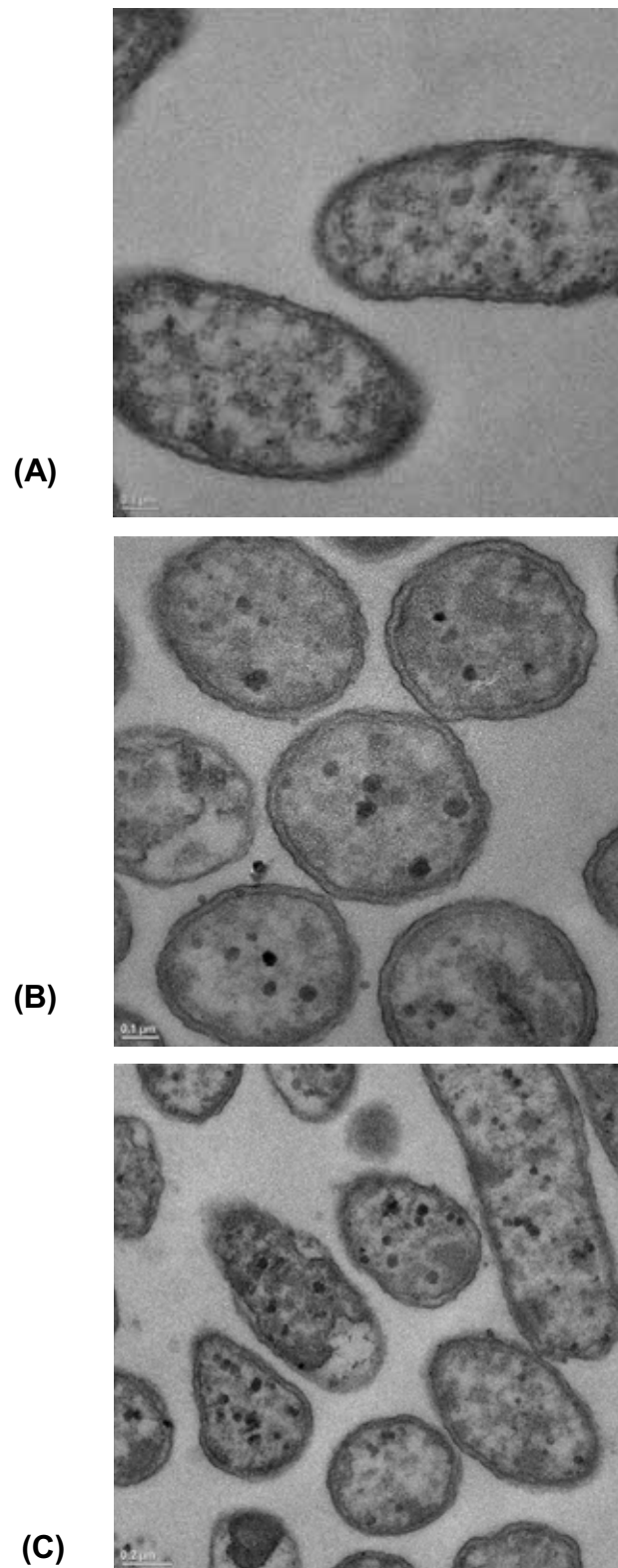


Fig. 4.14 Micrografies d'*Agrabacterium radiobacter* EPS-916 corresponents al control (a), després de 24 h de contacte amb solució de sulfat de coure (b) i després de 48h (c)

Després d'obtenir les primeres imatges del microorganisme per TEM, es varen fer successives sessions de microscòpia amb un detector de raig X de microanàlisi per detectar la composició de les zones més fosques de les micrografies i veure si realment es tractava de coure acumulat intracel·lularment.

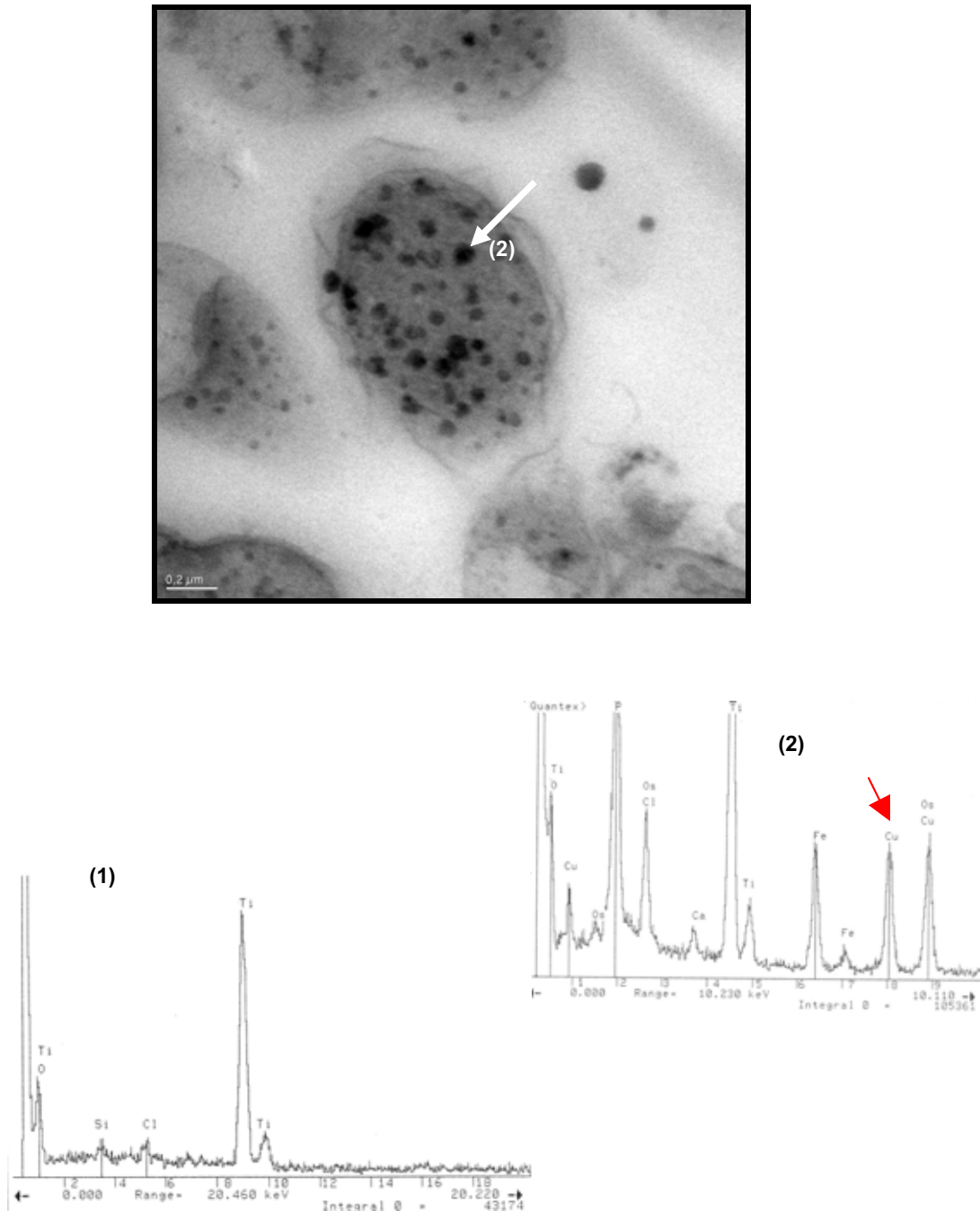


Fig 4.15 La micrografia en TEM mostra imatge d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 després de romandre en contacte en una solució de sulfat de Cu 24 hores. En (1) es mostra la microanàlisi obtinguda d'un blanc de la mostra. Els cúmuls més foscos (2) varen ser analitzats per microanàlisi i la presència de pics del metall demostren la presència del metall dins del microorganisme, els quals evidenciaríen una captació intracel·lular.

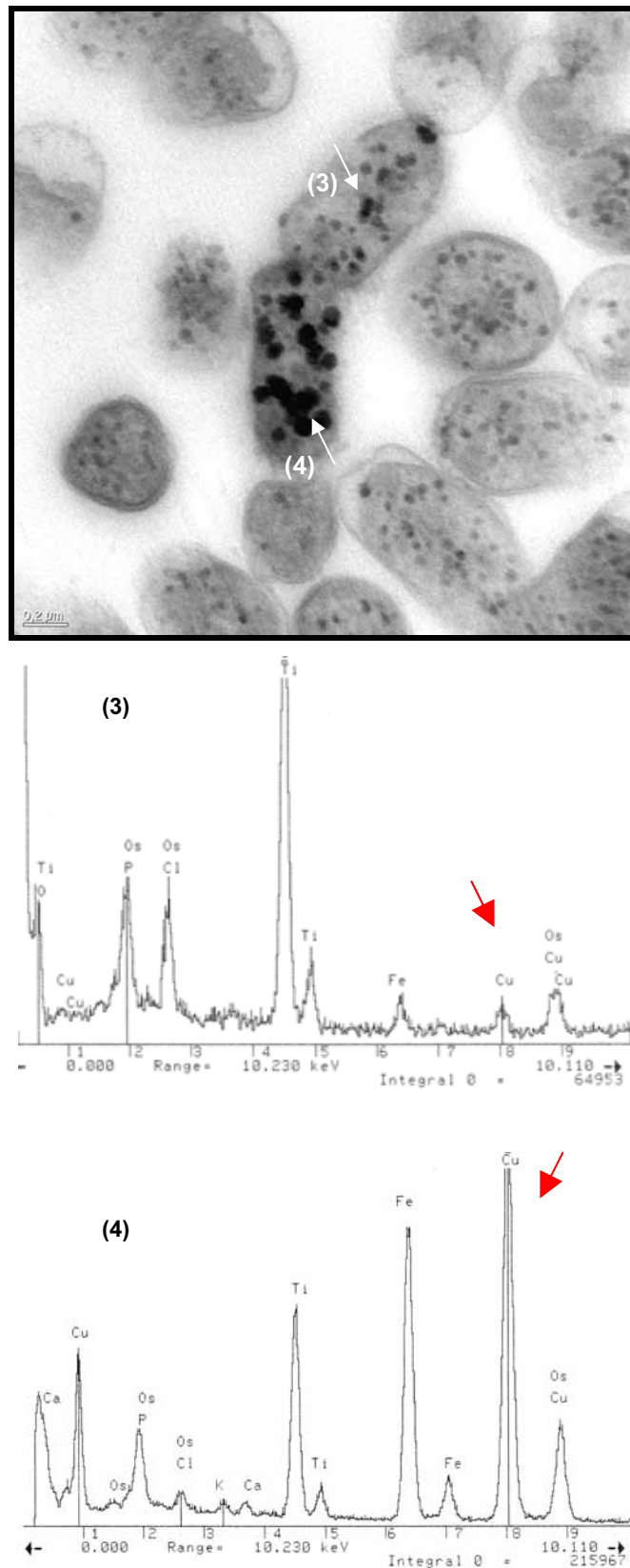


Fig. 4.16 La micrografia obtinguda per TEM d'*A. radiobacter* a les 48 h de contacte amb la solució de coure mostra zones més fosques dins el bacteri que els espectres de microanàlisi varen confirmar la presència del metall en elles.

4.8 Captació de coure provinent d'una canonada. Aïllament de microorganismes

En els sistemes de distribució d'aigua potable, els microorganismes que formen part de les biopel·lícules juguen un paper fonamental. Hi ha estudis que demostren la clara correlació entre la presència de bacteris i l'alliberament de coure de les canonades (Critchley *et al.*, 2004). A part del perill que això suposa, ja que el coure, mitjançant l'aigua, pot passar a la cadena tròfica ocasionant problemes als consumidors, alguns dels microorganismes es poden desprendre dels *biofilms*, augmentant, d'una banda, la proporció de cèl·lules lliures presents en l'aigua i, de l'altra, incrementant la possibilitat de disseminacions d'infeccions elevant a més la contaminació dels sistemes industrials (Stoodley *et al.*, 2001). Pepper i els seus col·laboradors varen demostrar en les seves investigacions que les aixetes d'ús domèstic són una font important i un punt crític dels sistemes de distribució d'aigua potable. Això no obstant, molts dels treballs de recerca realitzats en aquesta àrea han demostrat que els bacteris que hi creixen moltes vegades no posen en compromís la salut dels consumidors. Amb tot, algun d'ells poden actuar com a patògens oportunistes posant en risc per exemple la població immunocompromesa (Pavlov *et al.*, 2004).

Després de veure el comportament del nostre microorganisme enfront de solucions de coure, i veure que era capaç d'acumular-ne així com produir exopolímer i segrestar metall en ell, en un intent d'acostar-nos a la realitat es varen posar en contacte una anella de coure durant cinc dies amb una suspensió d'*A. radiobacter* i es va quantificar el coure que provenia de les aigües de rentat de l'anella així com les mostres que procedien de la digestió de les cèl·lules. En les aigües de rentat es varen trobar 0,171 mg de coure/ litre mentre que en el sediment cel·lular se'n varen trobar 18,6 mg de Cu/ gps. Aquests primers resultats, totalment orientatius, varen confirmar les dades de Dutkiewicz i Fallowfield (1998) amb les quals demostren que la presència de certs microorganismes en la xarxa de distribució d'aigua potable, poden ser causants d'una elevació de les concentracions de coure en les aigües de beguda, ja que els valors obtinguts posen de manifest una clara captació de coure per part de les cèl·lules.

Durant un període d'un any es varen prendre mostres amb hisops de canonades de coure de la xarxa d'aigua potable de diferents llars que portessin un temps sense circulació d'aigua per poder-ne aïllar microorganismes potencials de poder formar *biofilms* dins la superfície interna de la canonada i acumular-ne el coure. Moltes investigacions fan referència a què els nivells de certs metalls com el plom, el ferro i, especialment, el coure augmenten quan l'aigua es troba retinguda en les canonades (Sarin *et al.*, 2004), fet que està relacionat amb la presència de les biopel·lícules (Lethola *et al.*, 2007).

Els aïllats (anomenats M seguit d'un nombre) se'ls varen fer les proves de l'oxidasa, catalasa i la tinció de Gram. Es varen seleccionar els microorganismes bacils negatius, catalasa i oxidasa positius, es varen estudiar les seves CMI per tal de seleccionar el més resistent al coure i el resultat es resumeix en la taula 4.5.

Taula 4.5 Observació de la viabilitat del microorganisme enfront de les diferents concentracions de la sal estudiada

	Control	1mM	2mM	5mM	7.5mM	10mM	20mM
M3	+++	+++	+++	---	---	---	---
M4	+++	+++	+++	---	---	---	---
M5	+++	+++	+++	+-+	---	---	---
M6	+++	+++	+++	---	---	---	---
M7	+++	+++	+++	+++	---	---	---
M8	+++	+++	+++	---	---	---	---
M9	+++	+++	+++	---	---	---	---
M10	+++	+++	+++	---	---	---	---
M11	+++	+++	+++	+--	---	---	---
M12	+++	+++	+++	+++	---	---	---
M14	+++	+++	+++	---	---	---	---
M15	+++	+++	+++	+++	---	---	---
M16	+++	+++	+++	+++	+++	---	---

L'aïllat que més es va aproximar a la CMI d'*A. radiobacter* EPS-916, en aquest cas l'anomenat M 16, va ser sotmès a la bateria de proves bioquímiques de l'API E20. El resultat del mateix, juntament amb la prova de l'O/F, va identificar el microorganisme com a *Pseudomonas putida*. Diferents estudis impliquen la presència d'aquest microorganisme en la biosorpció de coure i altres metalls pesats en solucions aquoses (Chen *et al.*, 2005). Malik (2004) va demostrar que *Pseudomonas putida* S4, aïllada en una mina de coure, no només era capaç d'acumular coure en medis de cultiu suplementats amb el metall sinó que també era capaç de fer-ho directament dels efluents contaminats de la mina.

Altres microorganismes que s'han aïllat de sistemes de distribució d'aigües potables han estat *Sphingomonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, així com *Acidovorax delafieldii* i *Corynebacterium sp.* (Critchley *et al.*, 2004). A més, espècies del gènere *Sphingomonas* han demostrat la seva habilitat d'acumular coure quan creixen en medis enriquits amb el metall (100 mg Cu/L), conferint a les colònies un color blau verdós característic (Critchley *et al.*, 2001).

Per estudiar el comportament de *P.putida* M-16, seleccionat per les seves característiques i aïllat directament d'una canonada enfront de solucions de coure, es realitzaren estudis de captació d'aquest metall a les concentracions en que s'havien assajat també *A. radiobacter* per observar si era capaç d'acumular coure provinent de les solucions, i en cas afirmatiu, comparar-ne els valors obtinguts de coure acumulat, per la soca EPS-916. Els resultats s'agrupen en la figura 4.13. De la mateixa manera que ja va demostrar *A.radiobacter* EPS-916, la captació de coure augmenta a mesura que passa el temps fins a les 24 hores, havent-hi una davallada a les 48 hores d'estar en contacte el microorganisme en el cas de concentracions 0.5 mM i 1,5 mM. En el cas de la concentració 1mM el pic màxim de captació és a les 48 hores. El comportament que té la soca M16 durant el transcurs de l'experiment és diferent a EPS-916, ja que els recomptes de viables són més baixos als que es calcularen per *A.radiobacter*. De fet, les viabilitats observades a les 48 hores en el cas de la concentració de 1,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ varen ser pràcticament nul·les.

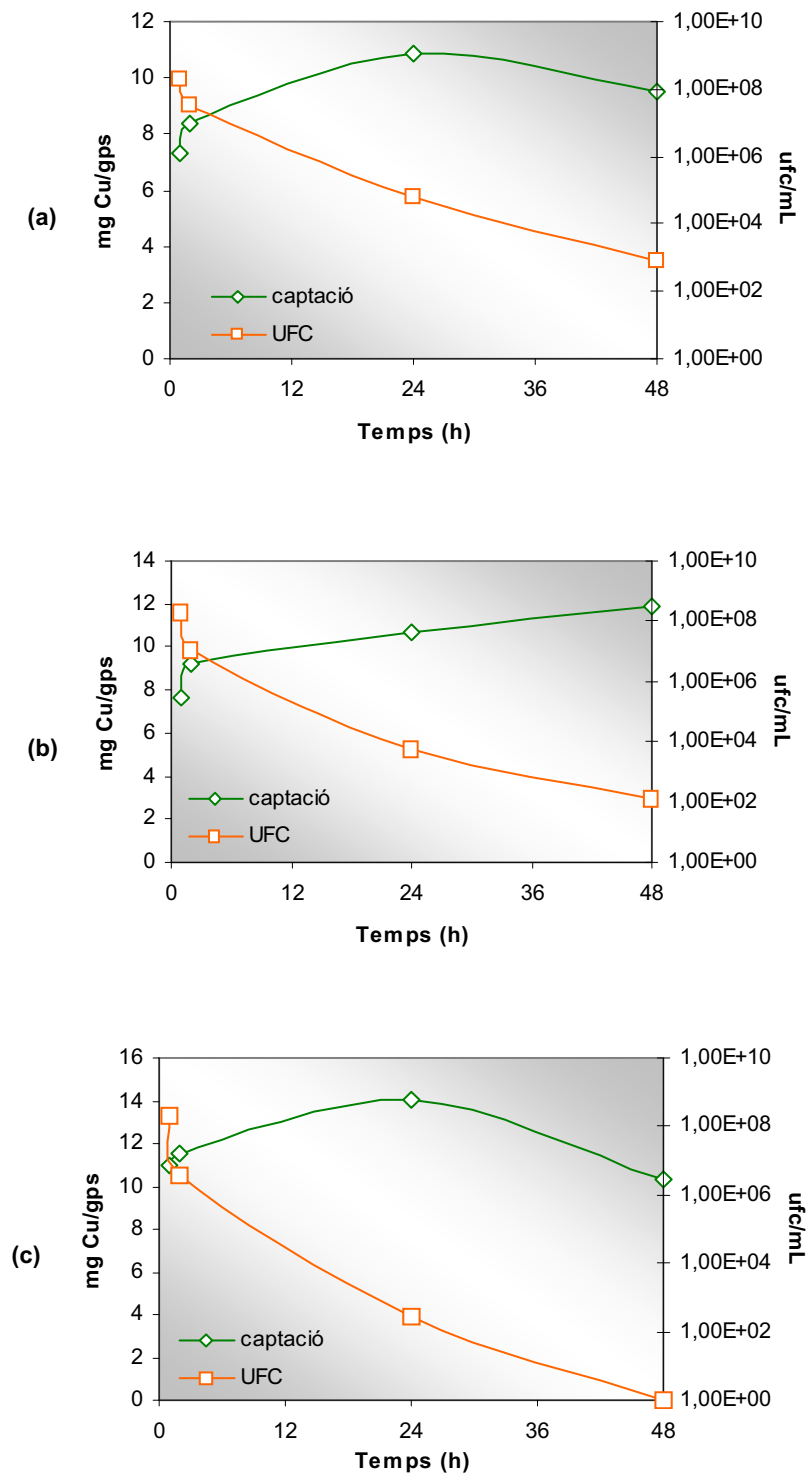


Fig. 4.13 Evolució de la captació de Cu per *P. putida* M16 enfront una solució: (a) 0,5 mM, (b) 1 mM i (c) 1,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ amb un pes sec de 43,25 mg

El procés de captació s'observa, un altre cop, com un fenomen ràpid, ja que els valors de coure acumulat a la primera hora ja són considerables. El mateix comportament és va observar ja amb els experiments amb *A. radiobacter* EPS-916. *P. putida* ha demostrat aquest comportament, com demostren Pardo i els seus col·laboradors (2003), en què observaren que un contacte de 10 minuts era suficient perquè la biomassa inactiva del microorganisme fos capaç d'acumular el coure, segurament per processos de biosorció. Veglio *et al.* (1997) varen estudiar com variava la capacitat màxima de captació de coure en funció de la concentració cel·lular d'una espècie del gènere *Arthobacter*, mitjançant isoterms d'adsorció i varen concloure que a mesura que augmentava la concentració cel·lular, la capacitat màxima disminuïa fins a establir-se a partir d'una determinada concentració cel·lular. Aquests autors interpretaren que la captació específica de coure disminueix quan la biomassa s'incrementa. Altres autors, varen reforçar aquesta hipòtesi concretant que concentracions elevades de cèl·lules poden interferir en els llocs d'unió del metall (Gadd i White, 1989), mentre que Fourest i Roux (1992) varen suggerir que a concentracions baixes de cèl·lules s'estableix un major gradient de concentració de metall entre l'exterior i l'interior cel·lular que podria afavorir una entrada del metall a l'interior de la cèl·lula, fet que es traduiria en un increment en la capacitat màxima de captació. En el nostre treball, aquestes hipòtesis podrien no confirmar-se, ja que les imatges que es realitzaren posteriorment amb microscòpia electrònica, confirmaren la presència de coure a l'interior de la cèl·lula d'*A. radiobacter*.

Les gràfiques següents mostren els resultats comparatius de dos estudis realitzats amb les mateixes concentracions de la sal de coure i amb els dos microorganismes amb pes sec molt similars.

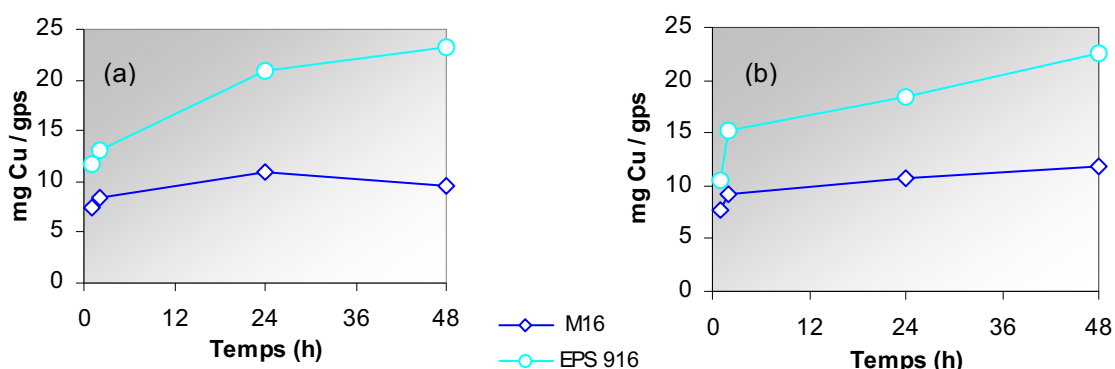


Fig. 4.14 Valors comparatius del coure acumulat per *P. putida* M16 i *A. radiobacter* EPS 916 respectivament, concentració 0.5 mM (a) i 1 mM (b).

La tendència observada en els dos microorganismes segueix una mateixa pauta, ja que tots dos augmenten gradualment el contingut de coure acumulat a mesura que passa el temps. Els valors de captació són més elevats en el cas de la soca EPS-916 en ambdues concentracions de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

4.9 Captació de coure enfront de cupons. Formació de *biofilms*

Després d'estudiar l'evolució de la captació de coure provinent de solucions de sulfat de coure per part d'*A. radiobacter* EPS-916 i pel microorganisme aïllat de la canonada de coure identificat en l'apartat 4 com a *P. putida*, es va plantejar la hipòtesi de quin seria el comportament d'aquests microorganismes davant una superfície cúprica, com poden ser les porcions de planxa de coure que en aquest treball anomenarem cupons. La finalitat d'aquests assajos era veure el comportament dels microorganismes quan la font de coure, no provenia d'una solució aquosa del mateix, i acostar-nos una mica als fenòmens que es poden donar a les canonades de distribució d'aigua potable. El disseny de l'experiment està descrit en l'apartat 3.12 de material i mètodes.



Fig. 4.15 Imatges que mostren com es varen col·locar els cupons dins els matrassos per estudiar-ne la captació de coure i la formació de *biofilms*.

Seguint les recomanacions de Critchley *et al.*, (2002), abans dels experiments els cupons de coure es varen posar en contacte amb aigua estèril durant uns 7 dies a temperatura ambient per agilitzar el procés d'envelliment i la seva oxidació.

Els cupons de coure es varen posar en contacte amb suspensions dels microorganismes durant intervals de 48 hores, i en dos medis de cultius diferents, TSB i el descrit en l'apartat 3.6 de material i mètodes, anomenat EPS-B, ja que afavoreix la producció de l'exopolímer dels microorganismes. Es varen prendre mostres a diferents temps per veure l'evolució de la captació del metall en funció del temps.

Els resultats obtinguts de la captació de coure per part d'*Agrobacterium radiobacter* en els dos medis de cultiu estudiats es mostren en la gràfica següent.

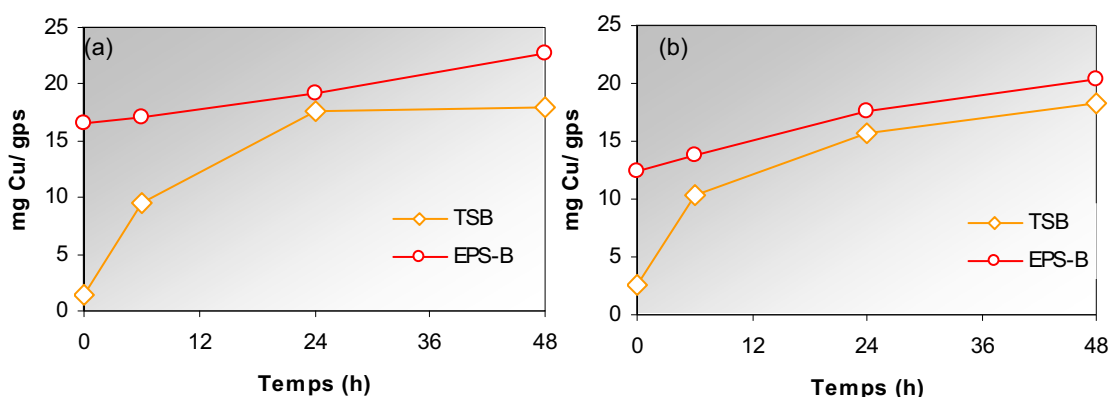


Fig. 4.16 Evolució de la captació de coure procedent dels cupons per *A. radiobacter* EPS-916 amb una biomassa de 41,3 mg (a) i 39,2 mg (b). S'han assajat dos medis de cultiu: TSB i EPS-B.

Tanmateix, en la gràfica següent es mostren els resultats obtinguts de la captació de *Pseudomonas putida* M-16.

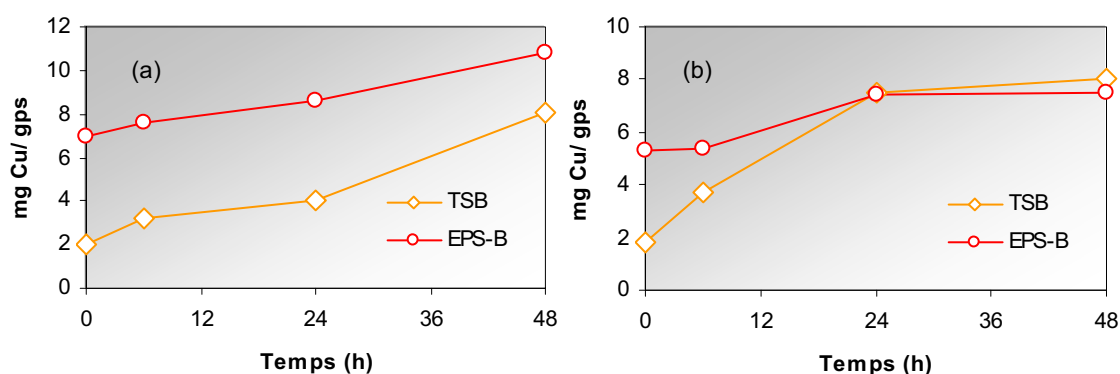


Fig. 4.17 Evolució de la captació de coure procedent dels cupons per *P. Putida* M-16 amb una biomassa de 40,5 mg (a) i 41,1 mg (b).

Dels resultats obtinguts es pot observar que la captació del metall augmenta amb el temps en tots microorganismes, si bé la captació és major quan el medi utilitzat és l'anomenat EPS que afavoreix la producció d'exopolímer, mostrant un pic màxim de captació a les 48 hores en tots els estudis realitzats. El microorganisme que ha demostrat tenir més capacitat de captació del metall és *A. radiobacter* EPS-916.

Els valors comparatius de la captació de coure en els dos medis es mostren en els histogrames següents:

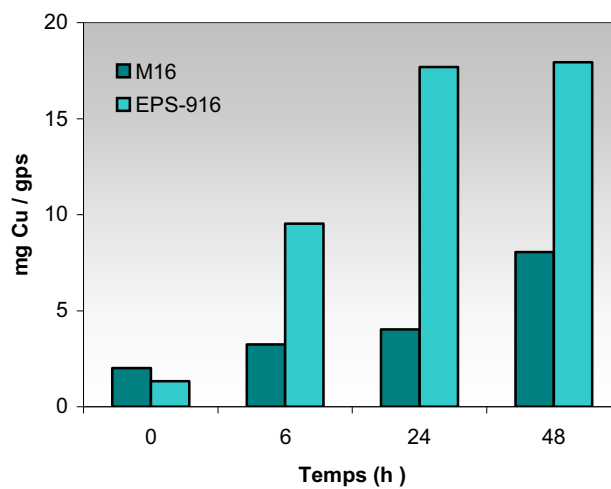


Fig. 4.18 Evolució de la captació per *P. putida* M16 i *A. radiobacter* EPS 916 en medi TSB

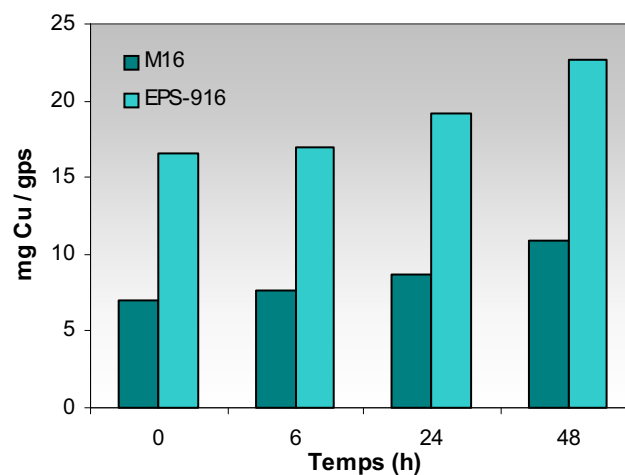


Fig. 4.19 Evolució de la captació per *P. putida* M16 i *A. radiobacter* EPS 916 en medi EPS-B

El terme d'aigua blava o blau-verdosa (BGW) és el nom amb el que es coneixen les manifestacions de la corrosió del coure, la qual comporta la coloració de l'aigua provocada pel fet que els productes de la corrosió de les canonades s'alliberen a l'aigua. Quan això passa, les concentracions del metall poden oscil·lar entre 2 i 20 mg Cu/L (Edwards *et al.*, 2000). L'Organització Mundial de la Salut (WHO) l'any 1998 va proposar uns límits provisionals de concentració de coure en l'aigua de beguda per tal d'establir un marge de seguretat eficaç pels consumidors dels efectes adversos a nivell gastrointestinal. Aquest valor, que va ser fixat a 2 mg/L, era provisional per la incertesa que hi havia aleshores entre la relació dosi-resposta que hi havia entre les concentracions de coure en l'aigua i els efectes gastrointestinals. Tan sols uns anys més tard, i basant-se en els estudis d'Araya *et al.* (2003), Pizarro *et al.* (2001) i Zeitz (2003), aquest valor ha deixat de ser provisional i permet consumir entre 2 i 3 litres d'aigua per dia, sense superar els nivells d'ingesta diària tolerats de 10 mg/dia (IOM, 2001), i evitar així la resposta adversa a nivell gastrointestinal. Aquest valor també ha estat adoptat per la Unió Europea com a valor límit, mentre que als Estats Units l'Agència de Protecció Ambiental ha establert un límit d'1,3 mg/L. L'aigua amb continguts superiors a 1mg/l pot embrutar amb coure les robes i objectes rentats amb ella i continguts superiors a 5 mg/l l'acolorixen i li donen un gust desagradable.

A nivell nacional, el BOE s'ha fixat també uns valors paramètrics que es basen en les recomanacions de l'Organització Mundial de la Salut per tal d'assegurar un alt nivell de protecció de la salut de la població. També es fa referència a què els productes de construcció instal·lats en els circuits d'abastiment i en les instal·lacions interiors poden afectar a la qualitat i a la salubritat de l'aigua, i que part hauran de complir la norma vigent. Així doncs queda també establert el límit superior de la concentració de coure per de 2mg/L, per assegurar la salubritat de l'aigua. Les disposicions que fa el BOE al respecte queden recollides en les figures 4.20 i 4.21.

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

3596 REAL DECRETO 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

La Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, estableció la obligación de las Administraciones públicas sanitarias de orientar sus actuaciones prioritariamente a la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades.

La citada Ley prevé que las actividades y productos que, directa o indirectamente, puedan tener consecuencias negativas para la salud, sean sometidos por las Administraciones públicas a control por parte de éstas y a llevar a cabo actuaciones sanitarias para la mejora de los sistemas de abastecimiento de las aguas.

El Real Decreto 1138/1990, de 14 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público, incorporó a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva comunitaria 80/778/CEE, de 15 de julio de 1980.

La publicación de la Directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998, exige la incorporación de la misma al derecho interno español con la elaboración de un nuevo texto que recoja las nuevas especificaciones de carácter científico y técnico y posibiliten un marco legal más acorde, tanto con las necesidades actuales, como con los avances y progresos de los últimos años en lo que a las aguas de consumo humano se refiere, estableciendo las medidas sanitarias y de control necesarias para la protección de la salud de los consumidores, siendo éste el objeto principal de esta disposición.

Dada la importancia de este tema para la salud humana, se hace necesario el establecimiento a escala nacional de criterios de calidad del agua de consumo humano.

Estos criterios se aplicarán a todas aquellas aguas que, independientemente de su origen y del tratamiento de potabilización que reciban, se utilicen en la industria alimentaria o se suministren a través de redes de distribución públicas o privadas, depósitos o cisternas.

Se fijan parámetros y valores paramétricos a cumplir en el punto donde se pone el agua de consumo humano a disposición del consumidor. Estos valores se basan principalmente en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y en motivos de salud pública aplicándose, en algunos casos, el principio de precaución para asegurar un alto nivel de protección de la salud de la población.

Los programas de control de calidad del agua de consumo humano deberán adaptarse a las necesidades de cada abastecimiento y cumplir los criterios de calidad previstos en esta disposición.

Las sustancias utilizadas en el tratamiento de potabilización del agua y productos de construcción instalados en el abastecimiento y en las instalaciones interiores pueden afectar a la calidad y salubridad de la misma, por ello, y sin perjuicio de lo previsto en esta norma, se regularán por normativa específica.

Ante incumplimientos de los criterios de calidad que señala esta disposición, será necesaria la investigación de la causa subyacente y garantizar que se apliquen lo antes posible las medidas correctoras y preventivas para la protección de la salud de la población abastecida. En determinadas condiciones se podrá conceder excepciones, cuando el suministro de agua en el abastecimiento no pueda mantenerse por ningún otro medio razonable y siempre y cuando no haya un riesgo potencial para la salud de la población.

Las decisiones sobre el control de la calidad del agua de consumo humano, así como la adopción de medidas correctoras ante los incumplimientos detectados, se ejecutarán en el nivel local, en virtud de las competencias atribuidas a los entes locales en la Ley 7/1985, de 2 de abril, Reguladora de las Bases del Régimen Local, siguiendo, en su caso, las indicaciones de la administración sanitaria autonómica competente y contando con su asesoramiento.

Los consumidores deberán recibir información suficiente y oportuna de la calidad del agua de consumo humano, situaciones de excepción, medidas correctoras y preventivas, así como de todos aquellos aspectos que afecten al abastecimiento y que puedan implicar un riesgo para la salud de la población.

El Ministerio de Sanidad y Consumo coordina el Sistema de Información Nacional de Agua de Consumo y elabora los informes nacionales anuales destinados a la información pública y, en cumplimiento con las obligaciones comunitarias, a la Comisión Europea.

El presente Real Decreto, que tiene carácter de norma básica, se dicta al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.16.ª de la Constitución y de acuerdo con lo dispuesto en los artículos 18.6, 19.2, 23, 24, 40.2, 40.13 y en la disposición adicional segunda de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad.

En la elaboración de este Real Decreto han sido oídos los sectores afectados, las comunidades autónomas y ha emitido su preceptivo informe la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria (CIOA).

En su virtud, a propuesta de los Ministros de Sanidad y Consumo, de Agricultura, Pesca y Alimentación, de Medio Ambiente, de Economía y de Ciencia y Tecnología, con la aprobación previa del Ministro de Administraciones Públicas, de acuerdo con el Consejo de Estado y previa deliberación del Consejo de Ministros del día 7 de febrero de 2003,

DISPONGO:

Artículo 1. Objeto.

El presente Real Decreto tiene por objeto establecer los criterios sanitarios que deben cumplir las aguas de consumo humano y las instalaciones que permiten su suministro desde la captación hasta el grifo del consumidor y el control de éstas, garantizando su salubridad, calidad y limpieza, con el fin de proteger la salud de las personas de los efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación de las aguas.

Artículo 2. Definiciones.

A los efectos de esta disposición se entenderá por:

1. Agua de consumo humano:

a) Todas aquellas aguas, ya sea en su estado original, ya sea después del tratamiento, utilizadas para beber, cocinar, preparar alimentos, higiene personal y para otros usos domésticos, sea cual fuere su origen e independientemente de que se suministren al consumidor, a través de redes de distribución públicas o privadas, de cisternas, de depósitos públicos o privados.

b) Todas aquellas aguas utilizadas en la industria alimentaria para fines de fabricación, tratamiento, conservación o comercialización de productos o sustancias destinadas al consumo humano, así como a las utilizadas en la limpieza de las superficies, objetos y materiales que puedan estar en contacto con los alimentos.

c) Todas aquellas aguas suministradas para consumo humano como parte de una actividad comercial o pública, con independencia del volumen medio diario de agua suministrado.

Fig. 4.20 Full del BOE del 2003 on es fa referència al Reial Decret en els quals s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua per al consum humà

Disposición transitoria sexta. *Usuarios del SINAC.*

A partir del 1 de junio de 2003 los usuarios ligados a zonas de abastecimiento con más de 500 habitantes podrán solicitar el alta como usuarios del SINAC a sus administradores autonómicos y a partir del 1 de enero de 2004 para el resto de los usuarios de zonas de abastecimiento menores.

Disposición derogatoria única. *Derogación normativa.*

Quedan derogadas cuantas disposiciones de igual o inferior rango se opongan a lo establecido en el presente Real Decreto y en particular el Real Decreto 1138/1990, de 14 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público.

Disposición final primera. *Habilitación normativa.*

Se faculta conjuntamente a los Ministros de Sanidad y Consumo, de Agricultura, Pesca y Alimentación, de Medio Ambiente, de Economía y de Ciencia y Tecnología para dictar, en el ámbito de sus respectivas competencias, las disposiciones necesarias para el desarrollo de lo establecido en el presente Real Decreto.

Disposición final segunda. *Título competencial.*

El presente Real Decreto, que tiene carácter de norma básica, se dicta al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.16.º de la Constitución y de acuerdo con lo dispuesto en los artículos 18.6, 19.2, 23, 24, 40.2, 40.13 y en la disposición adicional segunda de la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad.

Disposición final tercera. *Entrada en vigor.*

El presente Real Decreto entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid, a 7 de febrero de 2003.

JUAN CARLOS R.

El Vicepresidente Primero del Gobierno y Ministro de la Presidencia, MARIANO RAJOY BREY

ANEXO I

Parámetros y valores paramétricos

A. Parámetros microbiológicos

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
1. Escherichia coli	0 UFC en 100 ml	1 y 2
2. Enterococo	0 UFC en 100 ml	
3. Clostridium perfringens (incluidas las esporas) ..	0 UFC en 100 ml	

Notas:

(1) Cuando la determinación sea positiva y exista una turbidez mayor 5 UNF se determinarán, en la salida de ETAP o depósito, si la autoridad sanitaria lo considera oportuno, «Cryptosporidium» u otros microorganismos o parásitos.

(2) Hasta el 1 de enero de 2004 se podrá determinar «Clostridium» sulfito reductor en vez de «Clostridium perfringens». Las condiciones descritas en la nota 1 y el valor paramétrico serán los mismos para ambos.

B.1 Parámetros químicos

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
4. Antimonio	5,0 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	10,0 µg/l	
5. Arsénico	10 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	50 µg/l	
6. Benceno	1,0 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
7. Benzo(α)pireno	0,010 µg/l	1
8. Boro	1,0 mg/l	
9. Bromato:		
A partir de 01/01/2009	10 µg/l	
De 01/01/2004 a	25 µg/l	
31/12/2008	— µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
10. Cadmio	5,0 µg/l	
11. Cianuro	50 µg/l	
12. Cobre	2,0 mg/l	
13. Cromo	50 µg/l	
14. 1,2-Dicloroetano	3,0 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
15. Fluoruro	1,5 mg/l	2
16. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA) ...	0,10 µg/l	
Suma de:		
Benzo(b)fluoranteno	µg/l	
Benzo(ghi)perileno	µg/l	
Benzo(k)fluoranteno	µg/l	
Indeno(1,2,3-cd)pireno ..	µg/l	
17. Mercurio	1,0 µg/l	
18. Microcistina	1 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
19. Níquel	20 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	50 µg/l	
20. Nitrato	50 mg/l	3
21. Nitritos:		
Red de distribución	0,5 mg/l	3 y 4
En la salida de la ETAP/depósito	0,1 mg/l	
22. Total de plaguicidas	0,50 µg/l	5 y 6
23. Plaguicida individual	0,10 µg/l	
Excepto para los casos de:		
Aldrín	0,03 µg/l	
Dieldrín	0,03 µg/l	
Heptacloro	0,03 µg/l	
Heptacloro epóxido	0,03 µg/l	
24. Plomo:		
A partir de 01/01/2014	10 µg/l	
De 01/01/2004 a	25 µg/l	
31/12/2013	50 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	50 µg/l	

Fig. 4.21 Full del BOE del 2003 on marquen els valors límits tolerats de metalls, microorganismes i altres compostos per a la correcta potabilitat de l'aigua.

Per estudiar l'efecte de la cuprosolvència, es varen mesurar els nivells de coure en els medis utilitzats al finalitzar els experiments de posar en contacte els microorganismes amb els cupons de coure i es varen comparar els obtinguts en els controls (en absència dels microorganismes), tal com es recull en la taula 4.6.

Taula 4.6 Valors de les concentracions de Cu en els medis de cultiu, expressat com a mg Cu/L obtinguts a les 48 hores de posar en contacte els cupons de coure en els dos medis de cultiu (TSB i EPS-B) i amb *A.radiobacter EPS-916* i *P.putida M-16*, així com els valors obtinguts pels controls en absència dels microorganismes en els diferents assajos.

	TSB	EPS-B
Control	0,15 / 0,18	0,14 / 0,25
<i>A.radiobacter EPS-916</i>	0,67 / 0,74	0,83 / 0,81
<i>P.putida M-16</i>	0,87 / 0,91	0,95 / 1,02

Els valors que nosaltres hem obtingut són força més baixos que el límit inferior en què es poden esdevenir processos de coloració de les aigües com efecte secundari de la corrosió de les canonades de coure, però estan més a prop dels 2 mg/l que s'estableix com a valor límit per la potabilitat de l'aigua. Cal destacar, d'una banda, que a les 48 hores, les concentracions de coure obtingudes en ambdós medis són més elevades en referència als controls. Això implica que els microorganismes incrementen la concentració del metall dissolt al medi. D'altra banda, dels dos medis assajats, és en el que promou la formació dels exopolímers on es troben les concentracions més elevades de metall dissolt. Això estaria d'acord amb el paper que juguen els EPS en la corrosió i en la dissolució del coure de les canonades. I per últim, si bé les diferències no són massa notables, sí que és *P.putida* la que aconsegueix elevar més les concentracions de coure a diferència de la soca EPS-916, que en contra obtenia un percentatge més elevat de captació intracel·lular, tant a partir de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, com a partir dels cupons de coure.

In vivo hi ha estudis de cuprosolvència on es demostra el paper que juguen microorganismes aïllats *in situ* de les canonades de coure que subministren aigua potable a les cases, com *Sphingomonas sp.*, *Pseudomonas sp.* entre d'altres, i tots ells són capaços d'induir una solubilització del coure en experiments realitzats amb cupons de coure (Critchley *et al.*, 2001).

Cal tenir en compte però, que la cuprosolvència dependrà no només dels microorganismes que es puguin desenvolupar en les biopel·lícules, sinó de la química pròpia de l'aigua i de la seva composició. S'han observat que independentment del tipus de *biofilms*, l'augment del pH de l'aigua així com l'increment del carboni orgànic total (TOC) disminueixen la cuprosolvència. A més, l'augment de ions Cl en l'aigua (processos de cloració) pot induir estrès als bacteris com a resposta a les condicions salines, canviant la producció i la naturalesa dels exopolímers. A més, aquests ions es poden unir als grups funcionals específics dels EPS, quedant aquests no disponibles per les interaccions corrosives (Critchley *et al.*, 2003).

4.10. Observació dels *biofilms* formats sobre les superfícies de cupons de coure

S'ha demostrat que el coure modifica l'estructura i la fisiologia de les comunitats bacterianes. L'exposició continuada al metall pot produir canvis en el metabolisme i pot induir al desenvolupament de tolerància del coure en *biofilms* que es troben en aigua dolça (Massieux *et al.*, 2004). Els *biofilms* alteren la naturalesa i la porositat de la capa d'òxid de coure deguda a la incorporació de cèl·lules microbianes i els seus exopolímers (Critchley *et al.*, 2004); a més, els efectes del coure en el *biofilm* es transformen en una disminució en el consum de glucosa per part del microorganisme i en la reducció significativa del contingut en ATP de la biomassa, així com de l'activitat de la fosfatasa alcalina (Vilchez *et al.*, 2007).

Lethola i els seus col·laboradors (2007) varen observar la formació de *biofilms* en canonades de coure i en canonades de polietilè (PE). El nombre de bacteris a les canonades de coure va ser similar, o fins i tot més elevat, que en les canonades de PE; la qual cosa posa en evidència que el coure, si bé és conegut per ser tòxic pels bacteris, pot ser una superfície idònia perquè s'hi puguin desenvolupar. Això es deuria als processos d'adaptació i selecció que experimenten els microorganismes en contacte amb el metall. Amb tot, la formació de les pel·lícules va ser més lenta a les canonades de coure i la morfologia del *biofilm* també va ser diferent de l'observat a les canonades de PE.

Després de quantificar el coure acumulat provinent de solucions de sulfat de coure, tant per part d'*Agrobacterium radiobacter* EPS-916 com pel microorganisme aïllat d'una canonada, *P.putida* M-16, es varen dissenyar una sèrie d'experiments amb cupons de coure per veure, d'una banda, si eren capaços d'acumular el metall i, de l'altra, per observar la possible formació de *biofilms* a sobre la superfície dels cupons, tal com s'ha comentat en l'apartat 3.12 de material i mètodes. Els cupons es varen processar per tal d'observar-ne els *biofilms* formats mitjançant microscòpia electrònica de rastreig. Les imatges obtingudes es mostren a continuació.

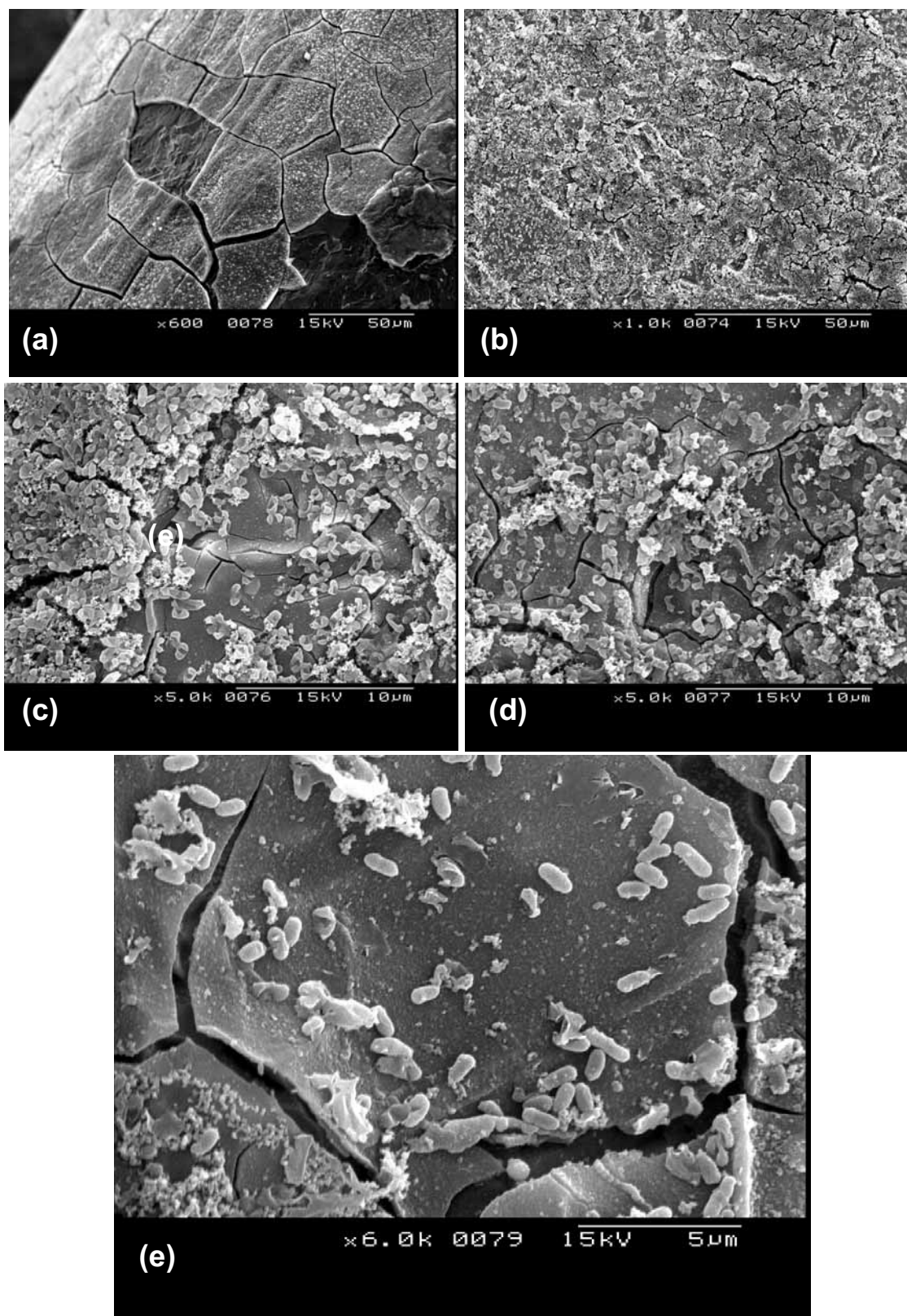


Fig. 4.22 Les diferents micrografies mostren, a diferents augments, la disposició de la biopel·lícula de *P.Putida* M16 cobrint la superfície del cupó de coure.

Les diferents micrografies mostren la formació de les biopel·lícules. A (a) s'observa la capa d'oxidació formada en el fil del qual penjava el cupó de Cu. A diferents augments, a (b), (c) i (d) i (e) s'observa la formació del *biofilm* a sobre el cupó. Val a dir que, malgrat que els bacteris es mostren bastant malmesos, es pot apreciar la capa que formen damunt la superfície. A (e) es poden apreciar amb més detall els bacteris damunt el cupó i la producció d'exopolímer per formar la biopel·lícula.

Investigacions recents en el camp de la microscòpia lligada a l'observació de les biopel·lícules han pogut veure organitzacions curioses dels microorganismes, com per exemple els *biofilms* que formen *Thiovolum* en forma de vel a sobre les superfícies de dipòsits marins. Aquest tipus d'organització rep aquest nom ja que, d'alguna manera, les cèl·lules que formen els agregats mantenen els seus flagels amb els quals són capaços "d'airejar" tota la comunitat. Un altre tipus d'organització de les comunitats bacterianes que s'ha pogut observar recentment és en forma de bresques. Es creu que aquestes estructures ajuden a sobreviure als microorganismes proveint-los, d'una banda, d'estabilitat mecànica que, fins a cert punt, pot actuar com a factor de virulència, ja que això els pot ajudar a escapar de les defenses de l'hoste. La part més elàstica d'aquest tipus d'estructura proporcionaria flexibilitat, que podria deformar el conjunt de la biopel·lícula en situacions d'estrès i tornar-la a la situació inicial (Schaudin *et al.*, 2007).

Paral·lelament una alíquota de la suspensió de microorganismes que va estar en contacte amb els cupons de coure es va fixar a sobre un portaobjectes per observar els bacteris mitjançant microscòpia de rastreig d'electrons retrodispersats, acoblat a un sistema de microanàlisi per detectar la presència o no del metall en el microorganisme. Les imatges obtingudes es mostren en la figura 4.23.

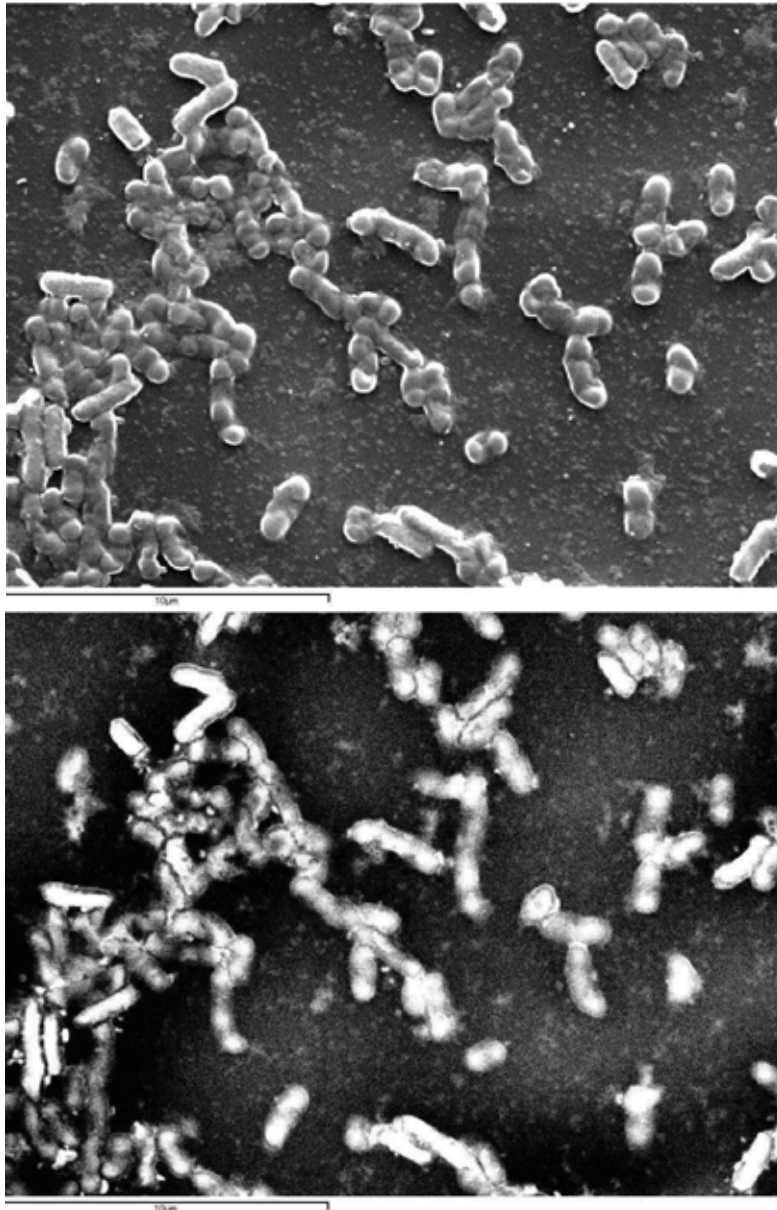


Fig. 4.23 Imatges obtingudes mitjançant SEM d'electrons retrodispersats d'una suspensió de *P. putida* M16, després de romandre amb contacte amb cupons de coure durant un període de 72 hores.

Els electrons retrodispersats són electrons del feix incident que han interaccionat (col·lisionat) amb els àtoms de la mostra i han estat reflectits, a diferència dels electrons secundaris (els que proporcionen les imatges tradicionals de SEM) que són electrons de baixa energia, que resulten de l'emissió per part dels àtoms constituents de la mostra (el més propers a la superfície) a causa de la col·lisió amb el feix incident.

La intensitat d'emissió dels electrons retrodispersats depèn del nombre atòmic dels àtoms de la mostra, essent els àtoms més pesats els que produeixen una major quantitat d'electrons retrodispersats. Una imatge originada per aquest tipus d'electrons posa de relleu diferències en la composició química per diferències de contrast. La principal utilitat d'aquesta tècnica resideix en què la seva emissió, que es deu a xocs de tipus elàstic i, per tant, amb energia del mateix ordre que la dels electrons incidents, depèn del nombre atòmic de la mostra. Això implica que dues parts de la mostra que tinguin diferent composició es revelen amb diferent intensitat (tal com es mostren les imatges de la figura 4.23) malgrat que no existeixi diferència topogràfica entre elles.

La microanàlisi en les zones més clares reflecteix la presència del coure en els microorganismes, enfront de l'absència d'aquest en la mostra control tal com es veu en els espectres següents.

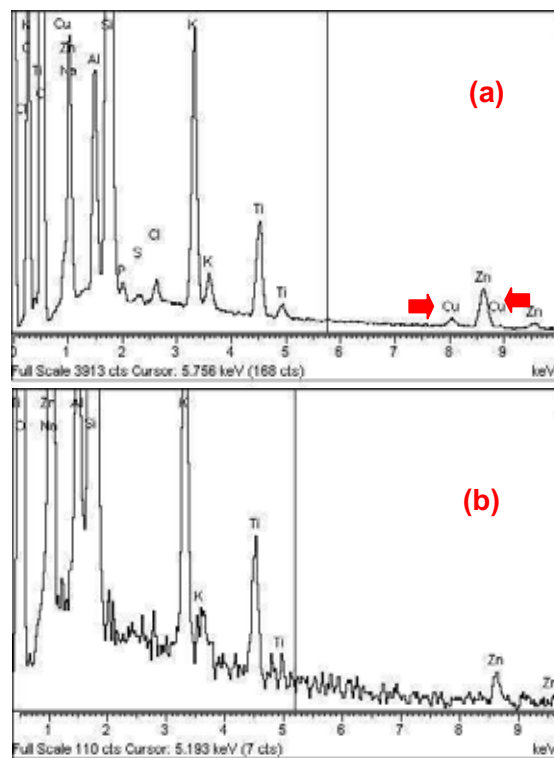


Fig. 4.24 Microanàlisi del microorganisme (a) i d'un blanc (b)

També es varen observar zones més electrodenses repartides a diferents zones del microorganisme que deixen entreveure la distribució irregular que té el metall en els bacteris; amb tot, la microanàlisi corresponent a les zones amb més o menys intensitat mostra la presència del coure en ambdues, si bé és en les zones més electrodenses on el pic del metall és major tal com es mostra en la figura 4.25.

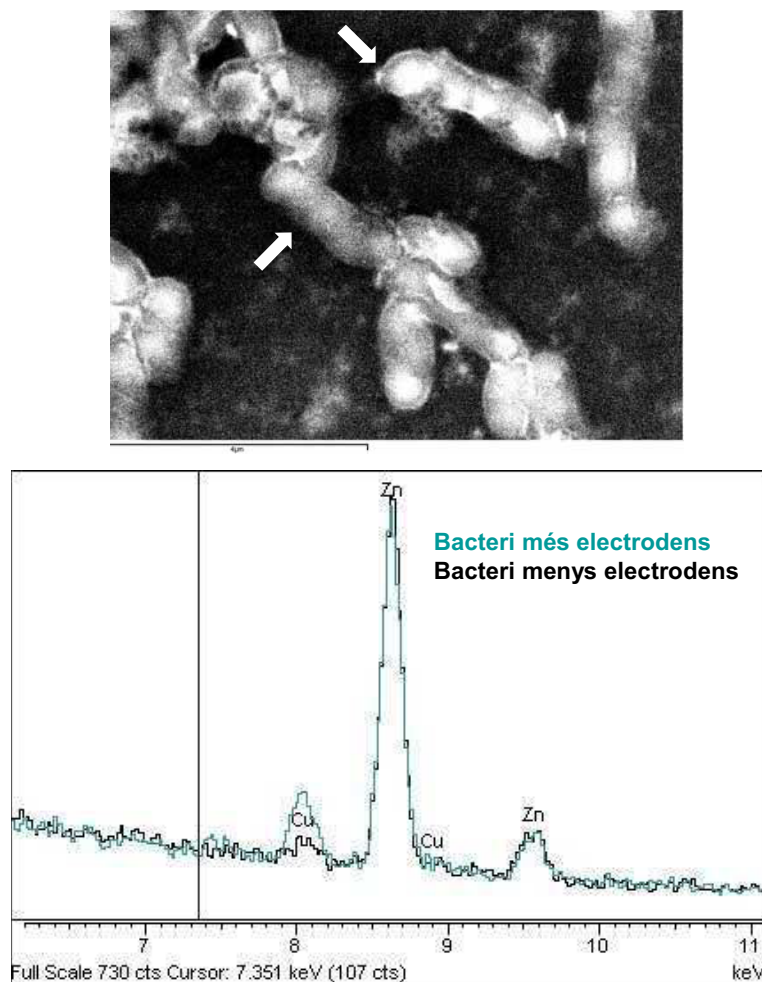


Fig. 4.25 Microanàlisi corresponent a zones amb més o menys intensitat de l'interior del microorganisme.

Altres estudis de microanàlisi de biopel·lícules formades *in vivo* mostren pics de coure en la superfície de l'EPS, i les anàlisis de les zones més electrodenses confirmaren l'adsorció del metall per part de la matriu polimèrica (Vilchez *et al.*, 2007), i no tots els estudis realitzats sobre cèl·lules bacterianes formadores de *biofilms* han demostrat que els bacteris siguin capaços d'acumular el coure intracel·lularment (Malik, 2004). A més, la distribució del coure no sempre és uniforme en tot el *biofilm*, sinó que es pot concentrar en determinades zones, sobretot en la superfície (White i Gadd, 2000).

El fet que les imatges obtingudes a partir del electrons retrodispersats no ens deixessin discernir si el coure estava a dins o embolcallant la cèl·lula es varen fer un seguit de fotografies amb microscòpia electrònica tal i com ja s'havia fet anteriorment amb *A. radiobacter* EPS-916, per visualitzar l'acumulació del metall. En la figura 4.26 es mostren les micrografies dels controls en a i b, així com en c i d les fotografies corresponents al microorganisme després d'haver estat en contacte amb els cupons de coure durant 72 hores.

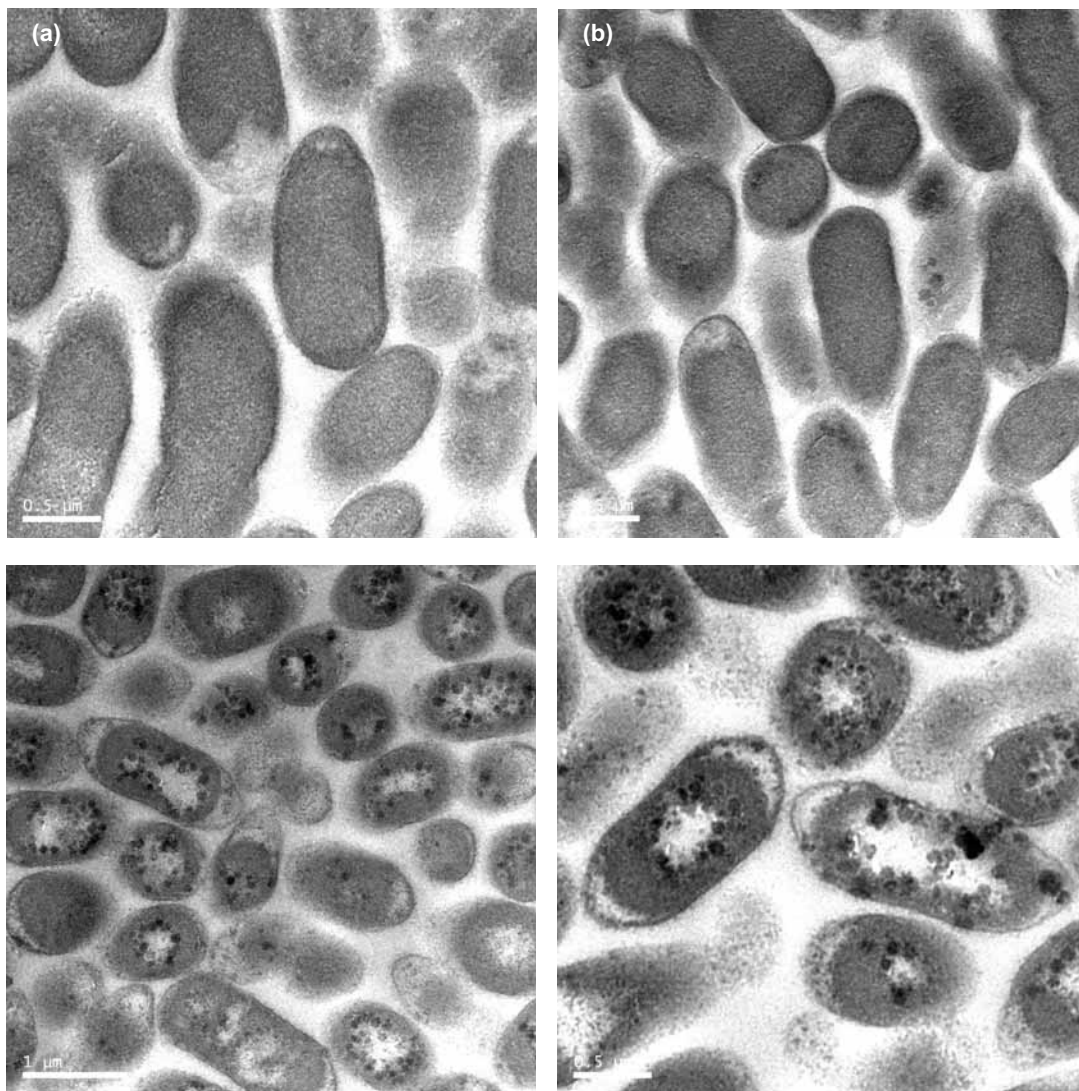


Fig 4.26. En c i d es mostren les micrografies corresponents a *P. putida* M-16 després d'haver estat en contacte amb cupons de coure durant 72 hores. En a i b es mostren les fotografies del mateix microorganisme sense haver estat en contacte amb els cupons (controls)

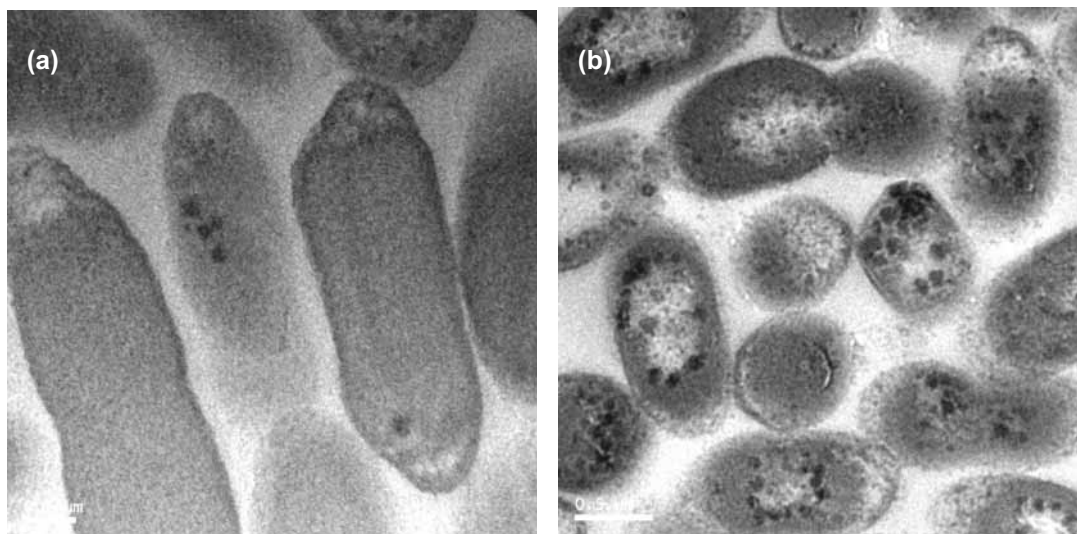


Fig.4.27 Detalls del microorganisme sense haver estat en contacte amb el cupó de coure (a) i després del contacte (b) . La morfologia del bacteri es veu afectada pel metall.

Les visualitzacions dels controls enfront a les mostres són significativament diferents. Si bé en alguna cèl·lula aïllada de les mostres control es poden observar també algun cúmulo més dens a l'interior del microorganisme, la morfologia d'aquest quan ha estat en contacte amb el coure es prou diferent de les mostres control. Els cúmuls més foscos també s'havien observat en les micrografies realitzades a la soca EPS-916 però la disposició dels mateixos sembla diferent, ja que els més densos semblen concentrar-se cap al centre de la cèl·lula mentre que en *A.radiobacter* la disposició era més uniforme per tot el citoplasma.

També es varen realitzar les corresponents microanàlisis dels cúmuls densos tant dels controls com de les mostres. Val a dir que el microscopi utilitzat per fer aquests anàlisis tenia un contrast i una resolució inferior a l'utilitzat en les anteriors anàlisis. Per tal d'evitar els errors de solapament de les bandes de l'espectre de l'osmi present en les mostres provinent del tractament d'aquestes per la seva visualització per microscòpia, es varen quantificar les proporcions relatives de coure de les determinacions realitzades. En la figura 4.28 es mostren les anàlisis realitzades en un microorganisme provinent del control, i en la figura 4.29 les observades en el microorganisme després d'haver estat en contacte amb el metall.

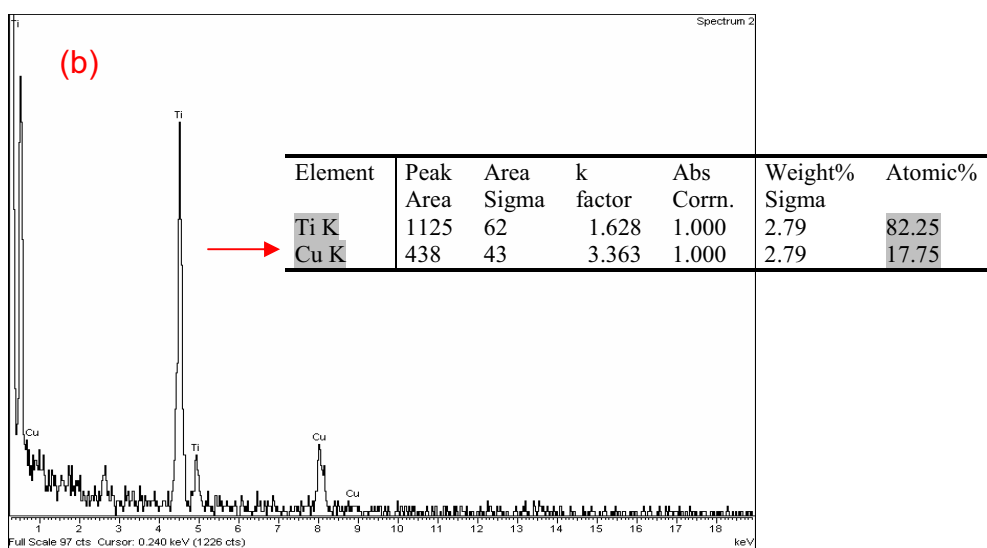
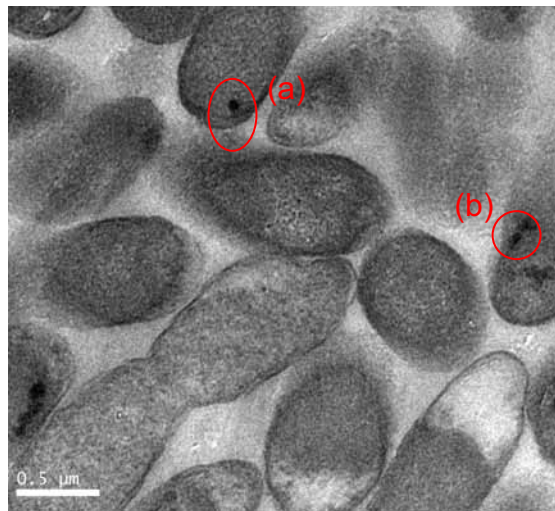
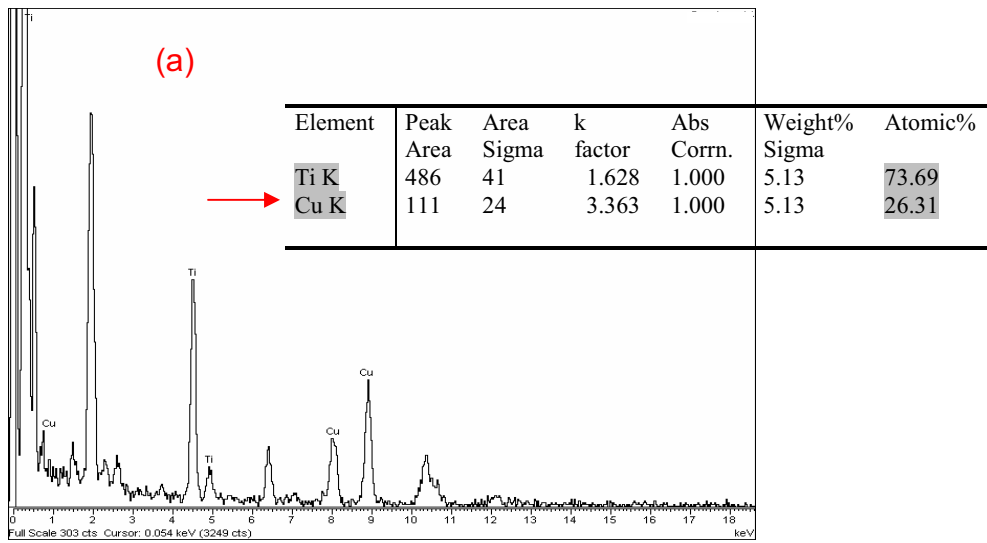


Fig 4.28. Resultats de les microanàlisis provinents de la mostra control. Els cúmuls densos observats en algun microorganisme aïllat tenen una petita proporció de coure, ja que aquest metall és essencial pel microorganisme.

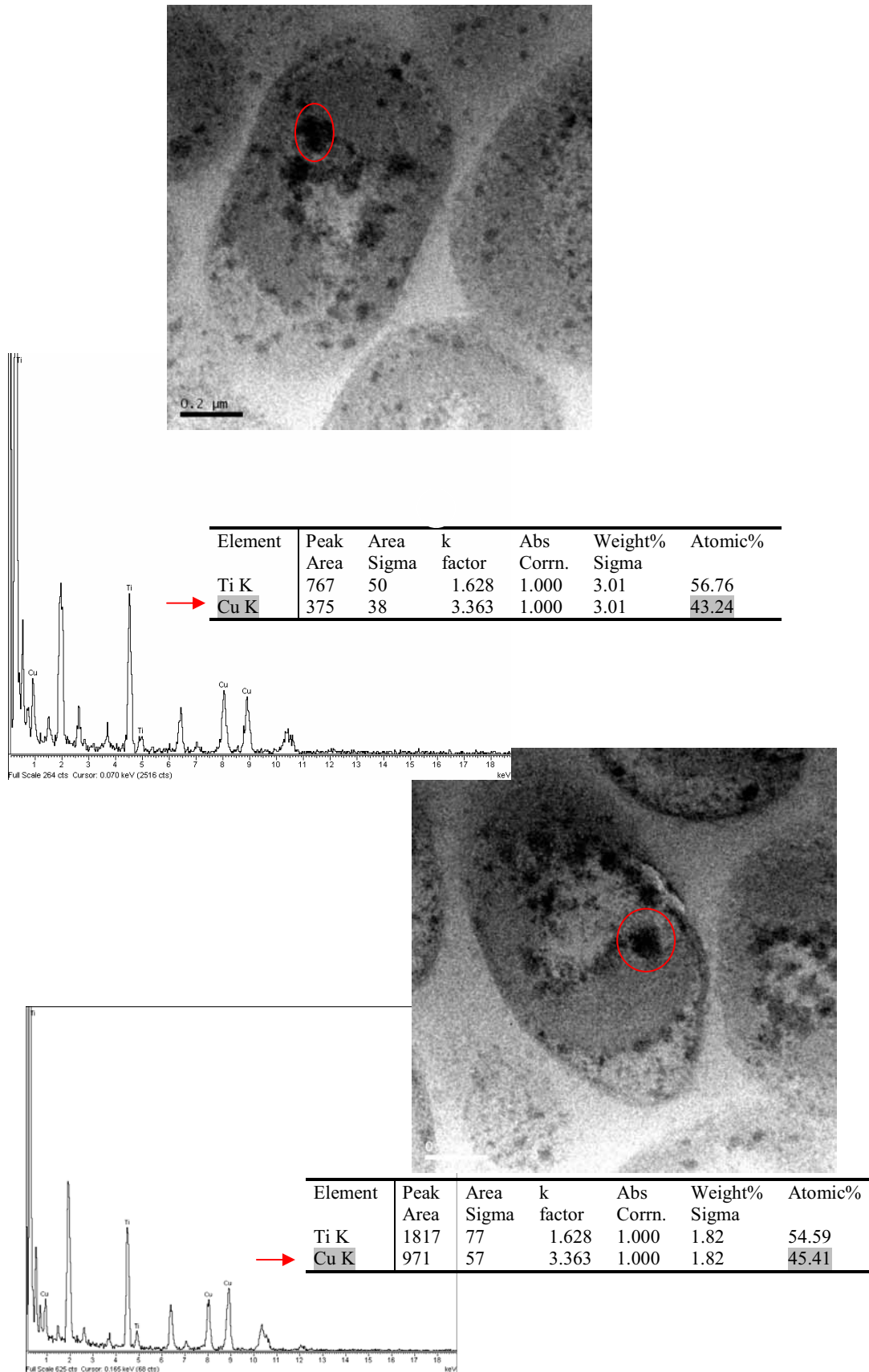


Fig 4.29. Resultats de les microanàlisis provinents del microorganisme en contacte amb els cupons de coure durant 72 hores. Els agregats visualitzats contenen una quantitat de coure considerablement més elevada que les mostres control.

4.11. Observació dels *biofilms* formats en una canonada de coure

Després d'observar la presència de *biofilms* a sobre la superfície dels cupons de coure, es va plantejar la hipòtesi de què podria succeir en la realitat a una canonada de coure exposada a un flux mínim d'aigua constant. Si bé les condicions en les quals es poden trobar les canonades que abasten d'aigua potable no es varen poder reproduir, es va acoblar un tros de canonada de coure mitjançant un tub de tefló a una aixeta que mantenia un goteig constant d'aigua, per poder visualitzar o no la presència de les biopel·lícules. En les imatges es pot observar la disposició dels mateixos. L'anella es va deixar un període de dos anys en contacte amb l'aigua. Passat aquest temps, es va separar amb cura l'anella del tub de tefló i es fa fer un tall horitzontal a l'anella per tal de poder-ne observar el seu interior. Les mostres es varen processar per la seva observació per microscòpia electrònica de rastreig (SEM).



Fig. 4.30. Les imatges mostren com es va adaptar un tros de canonada de coure en una aixeta mitjançant un tub de tefló. El tub i l'anella es varen separar per observar-los individualment.

Les imatges obtingudes es mostren tot seguit:

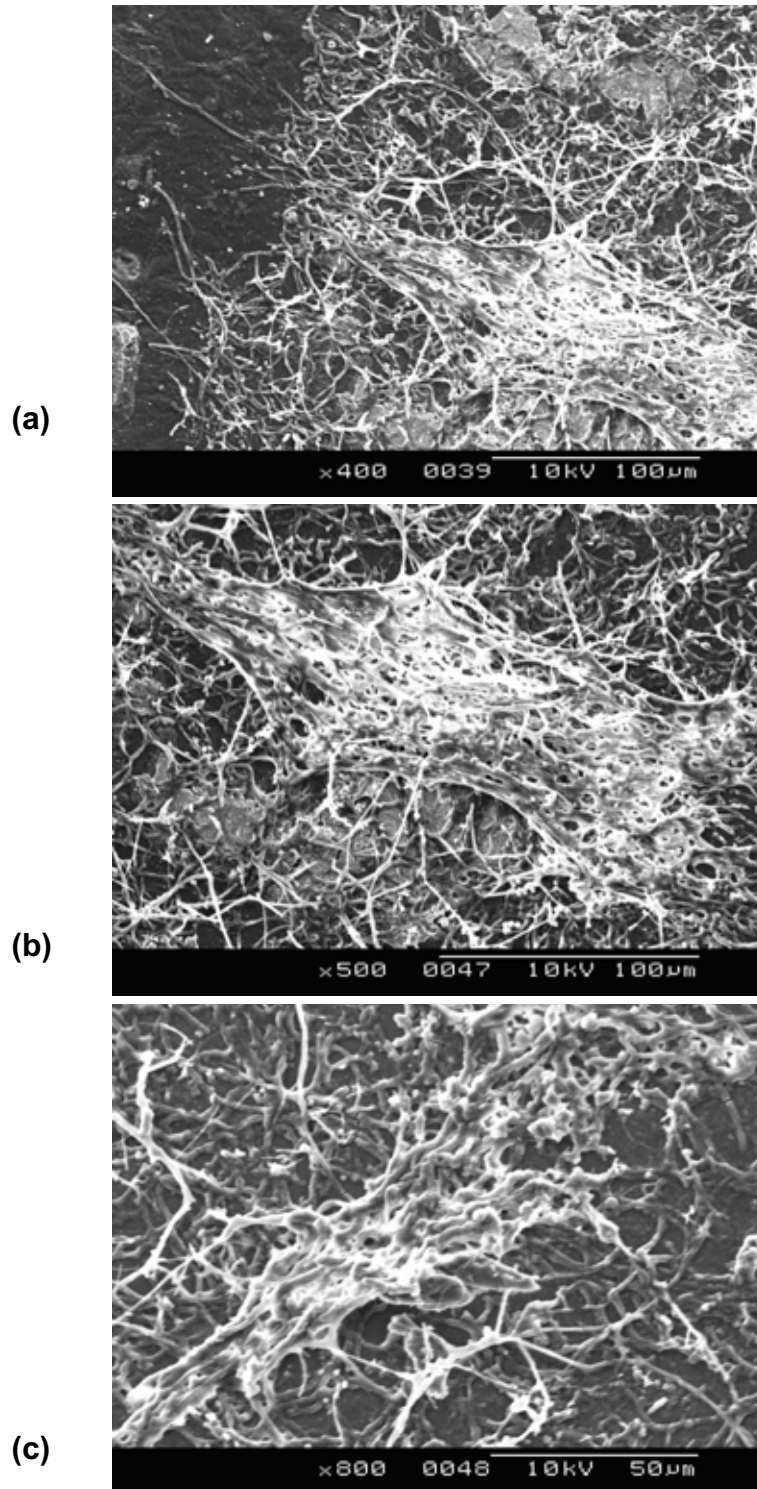


Fig. 4.31 Micrografies dels *biofilms* formats en el tub de tefló. En totes elles es pot apreciar, a diferents augments, la formació de la biopel·lícula com una xarxa polimèrica

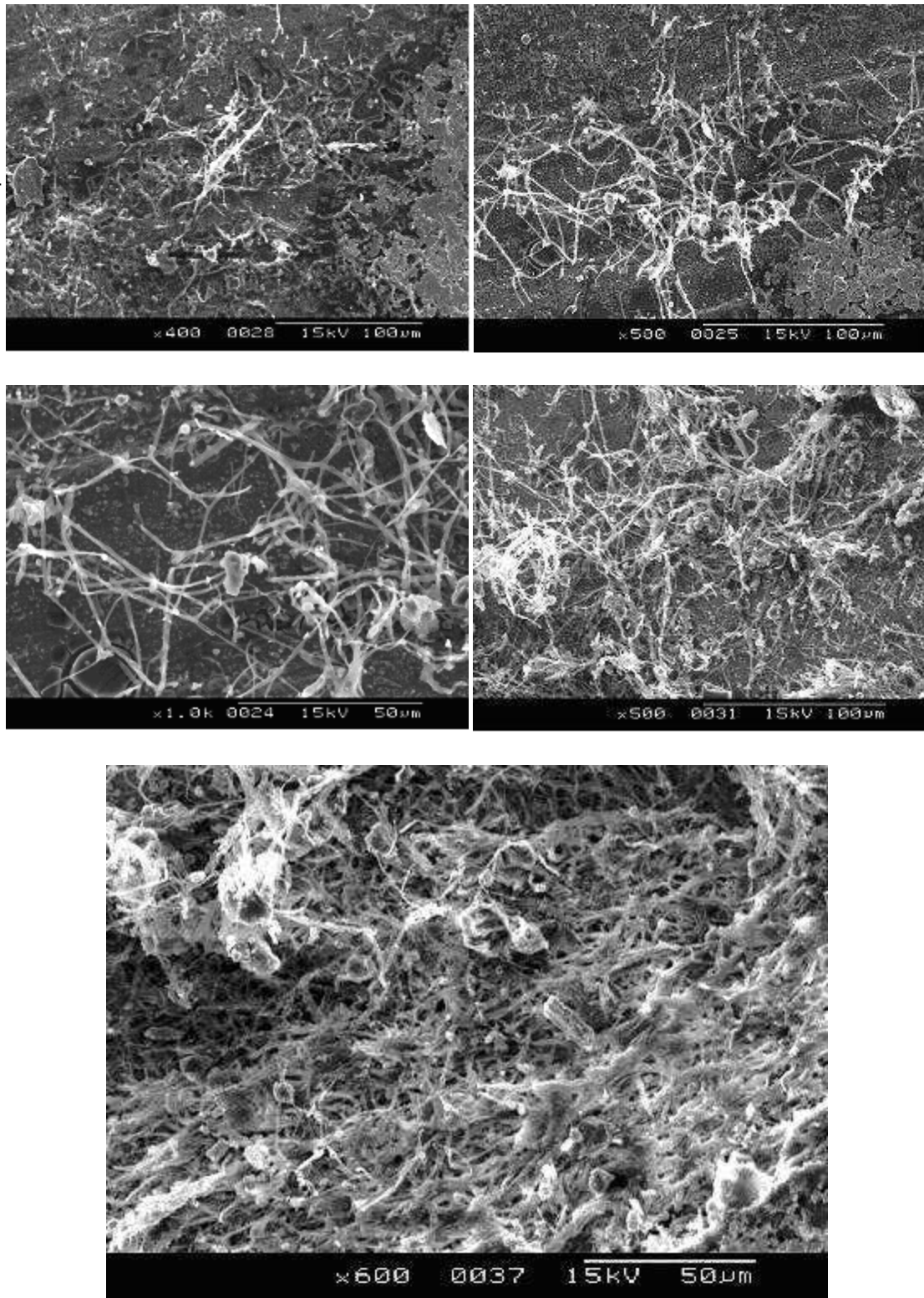


Fig. 4.32 Micrografies de les biopel·lícules formades a l'interior de la canonada de coure durant el període de dos anys.

A simple vista l'aspecte dels *biofilms* és diferent als observats anteriorment en el tub de tefló, possiblement a causa de les diferències de flux d'aigua existents entre una superfície i una altra. Amb tot, s'observa la formació de l'exopolímer que s'estén per gran part de la superfície. També s'observa diferent a les biopel·lícules visualitzades provinents dels cupons de coure, ja que el temps de contacte és molt diferent. En els *biofilms* formats després de dos anys de contacte la matriu de polímer ho embolcalla tot i no es va aconseguir visualitzar cap microorganisme aïllat, cosa que sí vàrem poder fer en el cas dels cupons.

La presència de microorganismes a les superfícies dels materials els poden afectar negativament, ja que poden promoure el creixement de les biopel·lícules i la formació, alhora, del *biofouling*. La presència dels *biofilms* provoquen reaccions físico-químiques a la superfície del metall desembocant en canvis indesitjats en les propietats dels mateixos, entenent com a biocorrosió o MIC a la corrosió influenciada per microorganismes (Beech *et al.*, 2005).

Acurant les tècniques de microscòpia, es poden observar una extensa varietat d'estructures que formen part de les biopel·lícules. Els senyals cèl·lula-cèl·lula i la influència de les condicions ambientals determinen els canvis fenotípics que experimenten els bacteris en estat sèssil i fan que s'envoltin de substàncies extracel·lulars polimèriques i canviïn l'estructura i la forma de les microcolònies. Una d'aquestes noves estructures són els *nanowires* que actuarien a mode de minúsculs fils connectors que ajudarien a entendre com l'energia es reparteix i es comparteix entre tots els bacteris integrants de les biopel·lícules o com les comunitats es poden moure mitjançant *twitching* (moviments mitjançant contraccions on intervenen els pilis) o *gliding* (que són moviments d'aproximadament 10 µm/seg que tenen lloc sense l'ajut de cap estructura especialitzada i que pot tenir lloc a causa de la secreció de polisacàrids o moviments de proteïnes a la superfície de la cèl·lula (Schaudinn *et al.*, 2007)).

Interessants també són els resultats de Vilchez i els seus col·legues (2007), que varen submergir un biofiltre, amb *biofilms* fixats en ell, en aigües subterrànies contaminades de coure per veure i caracteritzar els canvis en les comunitats que formen els *biofilms* i mirar d'esbrinar els mecanismes de retenció del metall.

Els resultats varen concloure que hi havia efectes clars sobre la incidència que té el coure sobre les biopel·lícules formades i la seva morfologia. Els *biofilms* controls (els que no havien estat en contacte amb el coure) mostraven una població heterogènia formada bàsicament per microorganismes filamentosos i bacteris, amb diferents morfologies, envoltats per EPS. En canvi, els *biofilms* que havien estat en contacte amb el metall presentaven més homogeneïtat i presentaven una morfologia d'agregats esfèrics embolcallats amb abundant EPS. Les biopel·lícules que nosaltres hem pogut observar no tenen aquesta morfologia esfèrica, sinó que es presenten com agregats filamentosos, formant una xarxa amb molta producció d'EPS. Altres visualitzacions de les biopel·lícules, en aquest cas de Singapur, mitjançant SEM, permeten veure *clusters* i canals d'aigua, i la presència de cocs agrupats en aquests *clusters* juntament amb material polimèric (Hu *et al.*, 2005).

D'ençà que Antoni Van Leeuwenhoek, considerat el primer científic que va parlar dels *biofilms*, l'any 1684, informant a la Royal Society de Londres que "*the number of these animalcules in the scurf of a man teeth are so many that I believe the exceed the number of men in a Kingdom*", s'ha avançat molt en el coneixement de la complexitat de les comunitats bacterianes. Els *biofilms* estan rebent, en els últims anys, l'atenció de la comunitat científica, augmentant la consciència de l'impacte que poden tenir en la salut, en el medi ambient, en els processos industrials i les repercussions que tenen sobre els materials. Els problemes associats als *biofilms* costen, als Estats Units, una despesa anual de bilions de dòlars en pèrdues d'energia, equipament malmès, productes contaminats i amb els tractaments d'infeccions. Els *biofilms* estan implicats en més d'un 80% de malalties inflamatòries i infeccioses causades per bacteris, incloent-hi otitis, endocarditis, úlceres gastrointestinals, infeccions del tracte urinari, infeccions pulmonars en pacients de fibrosi quística (Sauer *et al.*, 2007). Els *biofilms* que es troben en els sistemes d'aigua potable estan implicats directament en la corrosió dels interiors de les canonades de coure, podent, d'una banda, contribuir a la dissolució del coure (cuprosolvència) i fer que aquest augmenti les seves concentracions en l'aigua de beguda i, de l'altra, els microorganismes que formen aquestes biopel·lícules poder ser capaços de retenir-lo i actuar de reservori per aquest metall, contribuint a l'augment del coure en l'aigua, si aquests microorganismes es desprenen dels *biofilms*.

Malgrat tot, molts dels treballs de recerca en aquesta àrea han demostrat que els microorganismes que poden créixer i formar els *biofilms* a les canonades no posen en compromís la salut dels consumidors (Allen *et al.*, 2004), però sí que hi ha casos descrits en la literatura dels problemes gastrointestinals que pot causar el coure quan excedeix els valors recomanats, que a nivell europeu s'han establert en 2 mg/L. Després de finalitzar aquest treball, hem fet palès que hi ha microorganismes capaços d'acumular coure, provinent de solucions i de superfícies cúpriques, com els cupons de coure i les canonades, i que, alhora, són capaços de formar biopel·lícules. Microorganismes aïllats directament de les canonades de coure d'una llar domèstica han reforçat la capacitat que tenen certs microorganismes d'augmentar les concentracions de coure en l'aigua i de retenir-lo. Tot i les limitacions que comporta el fet de treballar a nivell de laboratori i de no poder reproduir les condicions reals en les quals es poden trobar les biopel·lícules en el medi ambient, els resultats obtinguts ens deixen veure tan sols una mica de llum del que succeeix *in vivo* a dins les comunitats bacterianes.

5. CONCLUSIONS

1. *Agrobacterium radiobacter* EPS-916 és capaç de captar coure provinent de solucions aquoses de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, a diferents concentracions, si bé el percentatge de captació més elevat es dona a les concentracions de coure més baixes. La captació augmenta en funció del temps i dels pHs estudiats; és en el de 5,4 on s'obtenen millors resultats.
2. L'exopolisacàrid produït per *A. radiobacter* ha demostrat la seva capacitat de retenir coure, si bé la captació és inferior a la que experimenten les cèl·lules.
3. Mitjançant microscòpia electrònica de transmissió s'ha comprovat que la captació del coure per part del microorganisme és intracel·lular, observant-se cúmuls densos en el citoplasma dels bacteris, que mitjançant microanàlisi s'ha comprovat la presència de coure en ells. Els espectres de difracció de raigs X han demostrat que el coure a dins els bacteris està en forma de sòlid amorf.
4. S'ha aïllat *Pseudomonas putida*-M16 de les canonades de coure d'ús domèstic i ha demostrat una resistència elevada a la sal de coure, essent també capaç d'acumular-lo a partir de solucions de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
5. Tant la soca EPS-916 com M16 mostren la capacitat de captar coure a partir de superfícies cúpriques, com el cupons de coure. A més, participen en fenòmens de cuprosolvència, tant elles com els seus polisacàrids.
6. Mitjançant microscòpia de rastreig s'ha observat la capacitat de *P. putida*-M16 de formar biopel·lícules sobre cupons de coure i les imatges d'electrons retrodispersats deixen veure la disposició del coure en el microorganisme.
7. Mitjançant microscòpia electrònica de transmissió s'ha pogut confirmar que l'acumulació del coure provinent dels cupons que té lloc en *P. putida* M-16 és intracel·lular, i els espectres de les microanàlisis corresponent així ho han demostrat.

8. Per microscòpia de rastreig s'ha pogut observar la formació de biopel·lícules tant en un tros de canonada de coure com en un tub de tefló que portaven un temps perllongat en contacte amb un goteig constant d'aigua.

6. BIBLIOGRAFIA

Abrusci, C., Martín-González, A., Del Amo, A., Catalina, F., Collado J. and Platas.G. (2005): "Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films". Int. Biodeterior. Biodegradation. Vol. 56(1).Pp. 58-68

Alison, D.G. and Sutherland, I.W. (1987): "Role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria." J. Gen. Microbiol. Vol 133. Pp. 1319-1327.

Allen, J.P., Atekwana, E.A., Atekwana, E. A., Duris, J.W., Werkema, D.D. and Rossbach, S. (2007): "The microbial community structure in petroleum-contaminated sediments corresponds to geophysical signatures". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 73(9). Pp. 2860-2870.

Allen M.J., Edberg, S.C. and Reasoner, D.J. (2004): "Heterotrophic plate count bacteria-what is their significance in drinking water".Int.J.Food.Microbiol. Vol.92. Pp. 265-274.

Amorena B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva., Oteiza, C., Pérez M., Alabart, J.L. and Hernández-Yago, J. (1999): "Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*". J. Antimicrob. Chemother. Vol.44. Pp. 43-55.

Anderl, J.N., Franklin, M.J. and Stewart, P.S. (2000): "Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella Pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin". Antimicrob. Agents Chemother. Vol. 44. Pp.1818-1824.

Araya, M. (2003): "Gastrointestinal symptoms and blood indicators of copper load in apparently healthy adults undergoing controlled copper exposure". Am. J. Clin. Nutr. Vol.77. Pp. 646-650.

Barkay, T. and Schaefer, J. (2001): "Metal and radionuclide bioremediation: issues, consideration and potentials". Curr. Opin. Microbiol. Vol 4. Pp. 318-323.

Barnhart, M. M. and Chapman, M.R. (2006): "Curli biogenesis and function" Annu. Rev. Microbiology. Vol 60. Pp. 131-147.

Bayes, J. (1992): "Aislamiento, identificación y caracterización de una cepa bacteriana con capacidad de reducir el cromo hexavalente". Tesina. Facultat de Farmàcia. Barcelona.

Beech, I.B (2004): "Corrosion of technical materials in the presence of biofilms current understanding and state of the art methods of study". Int. Biodeterior. Biodegradation. Vol 53. Pp. 177-183.

Beech, I.B. and Sunner, J. (2004) "Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals". Curr. Op. Biotechnology. Vol. 15. Pp. 181-186.

Beech, I.B. and Sunner, J.A., Hiraoka, K.(2005): "Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes". Int. Microbiol. Vol. 8. Pp. 157-168.

Betancourth, M., Botero, J.E. and Rivera, S.P. (2004) : "Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo". Colomb. Med. Vol 35 (3). Pp. 34-39

Bonet, R. (1990): "Captación de uranio por el exopolisacárido de *Pseudomonas sp. EPS-5028.*" Tesina. Facultad de Farmacia. Barcelona

Bossier, P., Hofte, M. and Verstraete, W. (1988): "Ecological significance of siderophores in soil". En: Advances in Microbial Ecology. Marshall. Ed. Kluwer Academic Publishers Group. New York.

Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. and Kolter, R. (2005): "Biofilms: the matrix revisited" . Trends Microbiol. Vol 13 (1). Pp. 20-26

Brock (2004): "Biología de los microorganismos". Octava edición. Prentice Hall Iberia.

Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W. (2000): "Microbial resistance to metals in the environment". Ecotoxicol Environ Saf. Vol. 45. Pp.198-207.

Calafat, P.(1998):"Captación de Torio por células bacterianas". Tesina de Licenciatura. Facultat de farmacia. Universitat de Barcelona.

Carmona, N., Laiz L., González, J.M., Garcia-Heras, M., Villegas, M.A. and Saiz-Jimenez, C. (2006): "Biodeterioration of historic stained glasses from the Cartuja de Miraflores (Spain)". Int. Biodeterior. Biodegradation. Vol.58. Pp. 155-161.

Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C, Read, R.R., Morck, D. and Buret, A. (1999): "The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms". J Clin Microbiol. Vol. 37. Pp. 1771-1776.

Coetser, S.E and Cloete, T.E. (2005): "Biofouling and biocorrosion in industrial water systems". Crit Rev Microbiol. Vol. 31. Pp. 213-232.

Congregado, F., Estañol, J., Espuny, M.J., Fusté, M.C., Manresa, M.A., Marqués, A.M., Guinea, J. and Simon-Pujol, M.D. (1985): "Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp. EPS-5028*". Biotechnol. Lett. Vol. 12. Pp. 883-888.

Costerton, JW., Cheng, K-J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J. (1987): "Bacterial biofilms in nature and disease". Annu. Rev. Microbiol. Vol. 41. Pp. 435-464

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G. (1994): "Biofilms, the customized microniche". J. Bacteriol. Vol.176. Pp. 2137-2142.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, DE., Korber, D.R. and Lappin-Scott, H. M.(1995): "Microbial biofilms". Annu Rev Microbiol.Vol 49. Pp. 711-745.

Costerton, J.W. (1999): "Introduccion to biofilm" Int.J. Antimicrob.Agents. Vol 11. Pp. 217-221.

Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P(1999): "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections". Science. Vol. 284. Pp. 1318-1322.

Costley, S.C. and Wallis, F.M.(2001): "Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor". Wat. Res. Vol. 35(15). Pp. 3715-3723.

Critchley, M.M., Cromar, N.J., McClure, N.C. and Fallowfield, H.J. (2001): "Biofilms and microbially influenced cuprosolvency in domestic copper plumbing systems". J.Appl.Microbiol. Vol. 91. Pp. 646-651.

Critchley M.M., Cromar N.J., McClure N.C. and Fallowfield H.J. (2002):"Biofilms in copper plumbing systems: sensitivity to copper and chlorine and implications for corrosion". Water Sci. Technol. Vol 2(4). Pp. 81-87.

Critchley, M.M., Cromar, N.J., McClure, N.C. and Fallowfield, H.J.(2003_a):"The assessment of biofilm community composition on plumbing materials in filtered and un filtered water distribution systems". Water Sci. Technol. Vol 3(1).Pp. 187-191.

Critchley, M.M., Cromar, N.J., McClure, N.C. and Fallowfield, H.J. (2003_b):"The influence of the chemical composition of drinking water on cuprosolvency by biofilm bacteria". J. Appl.Microbiol. Vol 94. Pp.501-507.

Critchley, M.M., Pasetto, R. and O'Halloran, R.J. (2004): "Microbiological influences in blue water copper corrosion." J. Appl.Microbiol. Vol. 97. Pp. 590-597.

Cullen, J.C. (1994): "The miracle of Bolsena. Growth of *Serratia* on sacramental bread and polenta may explain incidentes in medieval Italy". ASM News. Vol.60(4). Pp.187-191.

Cunha, M.V., Sousa, S.A., Leitao, J. H., Moreira, L.M., Videira, P.A. and Sácorreia, J.(2004): "Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by cystic fibrosis-associated isolates of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infections". J. Clin. Microbiol. Vol. 42(7). Pp. 352-3058.

Chambless, J.D., Hunt, S.M. and Stewart, P.S. (2006): "A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials". Appl. Environ. Microbiol. Vol.72 (3).Pp. 2005-2013.

Chen, X.C., Wang, Y.P., Lin, Q., Shi, J.Y., Wu, W.X. and Chen, Y.X. (2005): "Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1." Colloids Surf. B. Biointerfaces.Vol. 46. Pp.11-107.

Chmielewski, R.N.A. and Frank. J.F. (2003): "Biofilm formation and control in food processing facilities". Comp. Rev. Food Sci. Food Safety. Vol.2.Pp. 22-32.

Davey, M E. and O ´Toole, G.S. (2000) : "Microbial biofilms : from ecology to molecular genetics" Microbiol. Mol. Biol. Rev.Vol 64. Pp 847-867.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P.(1998): "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm". Science. Vol. 280. Pp. 295-298.

De Beer, D., Srinivasan, R. Stewart, P.S. (1994): "Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 60. Pp. 4339-4344.

De los Ríos, A. and Ascaso, C. (2005): "Contributions of in situ microscopy to the current understanding of stone biodeterioration". Int. Microbiol. Vol.8. Pp. 181-188.

De los Ríos, A., Grube, M., Sancho, L.G.and Ascaso, C.(2007): "Ultrastructural and genetic characteristics of endolithic cyanobacterial biofilms colonizing antarctic granite rocks". FEMS Microbiol. Ecol. Vol. 59 Pp. 386-395.

Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., Van Hoef, V., de Keersmaecker, B. and Ollevier F.(2007):"Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes".Microbiol.Res. Doi:10.1016/j.micres.2007.006.2001

Dietrich, A.M., Glindemann, D., Pizarro f., Olivares, M., Araya, M., Caper, A., Duncan, S., Dwyer, S., Whelton A.J., Younos T., Subramanian, S., Burlingame, G.A., Khiari, D. and Edwards, M. (2004): "Health and aesthetic impacts of copper corrosion on drinking water". Water Sci Technol.Vol. 2. Pp.55-62.

Dixon, B. (2006): "Living together". Microbe. Vol. 1(9). Pp. 398-399.

Donlan, R.M. (2002): "Biofilms: Microbial life on surfaces". Emerg Infect Dis. Vol. 8(9). Pp. 881-890.

Donlan, R.M. and Costerton, J. W. (2002): "Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin. Microbiol. Rev.Vol. 15(2). Pp. 167-193.

Dönmez, G. and Aksu, Z. (2001): "Bioaccumulation of copper(II) and Nickel(II) by the non.adapted and adapted growing *Candida sp.*" Wat. Res. Vol.6. Pp.1425-1434.

Dunne, W. M. (2002): "Bacterial Adhesion: seen any good biofilms lately?" Clin. Microbiol. Rev.Vol 15(2) Pp. 155-166.

Dutkiewicz, C.and Fallowfield, K. (1998): "Assesment of microbial involvement in the elevation of copper levels in drinking water". J. Appl. Microbiol.Vol. 85. Pp. 597-602.

Edwards, K.J., Bond, P.L., Gibring, T.M. and Bandfield, J., (2000): "An archeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drain-age." Science Vol. 287 Pp. 1796-1799.

Ehrlich, G.D., Hu, F.Z., Lin, Q., Costerton, J.W. and Post C.(2004): "Intelligent implants to battle biofilms".ASM News. Vol. 70(3). Pp.127-133.

Estañol, I. (1988): "Producción de un polisacárido extracelular por *Pseudomonas* sp *EPS-5028*". Tesis doctoral. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

Fah, T., Mah, C. and O'Toole, G.A. (2001): "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents". Trends Microbiol. Vol. 9 (1). Pp.34-39.

Fischer, W., Paradies, H.H. and Hannsel D., (1992): "Cooper deterioration in water distribution system of a country hospital in Germany caused by microbially induced corrosion. Description of the problem". Mater. Corros. Vol. 43. Pp. 56-62.

Flatau, G.N., Clement, R.L. and Ganthier, M.J. (1986): "Influence of the cell envelope on the accumulation of cadmium by a marine pseudomand". Lett. Appl. Microbiol. Vol(2). Pp. 111-114.

Fleming, H.C. (1993): "Biofilms and environmental protection". Water Sci. Technol. Vol 27. Pp. 1-10

Fleming, H.C. (2002): "Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures". Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 59. Pp. 629-640.

Ford, T. and Mitchell, R. (1992): "Microbial Transport of Toxic metals". En: (Ed.) R. Mitchell, J. Wiley & sons: "Environmental Microbiology". New York.

Foster, J.S. and Kolenbrander, P.E. (2004): "Development of a multi-species oral bacterial community in a saliva-conditioned flowcell". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 70. Pp. 4340-4348.

Fourest, E. and Roux, J.C. (1992): "Heavy metal biosorption by fungal mycelial by products mechanism and influence of pH". Appl. Microbiol. Biotech. Vol. 37. Pp. 399-403.

Fuqua, C., Winnans, S.C. and Greenberg, E.P. (1996): "Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators". Annu.Rev.Microbiol Vol. 50. Pp. 727-751.

Gadd, G.M. (2000): "Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization". Curr. Opin. Biotechnol. Vol 11. Pp. 271-279.

Gadd, G.M. and White, C. (1989): "Removal of thorium from simulated acid process streams by fungal biomass". Biotech.Bioengin. Vol. 33. Pp. 592-599.

Geesey G.G., Richardson W.T., Yeomans H.G., Irvin R. T. And Costerton J.W., (1977) "Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream". Can. J. Microbiol. Vol 23 (12). Pp. 1733-1736.

Gómez M.I. and Prince A.(2007):"Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis". Curr. Opin. Pharmacol. Vol. 7. Pp. 1-7.

Götz F. (2002):"*Staphylococcus* and biofilms".Mol. Microbiol. Vol 43(6). Pp.1367-1378.

Grasa J.M. (1996):"Captación de uranio por células bacterianas adaptadas a elevadas concentracions de metales pesados." Tesina de llicenciatura. Facultat de Farmàcia.Barcelona

Gristina, A.G. (1994) : " Biofilms and chronic bacterial infections". Clin. Microbiol. Newsletter. Vol.16. Pp. 171-178.

Harwood-Sears, V. and Gordon, A.S.(1990): "Copper-induced production of copper-binding supernatant proteins by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*". Appl.Environ.Microbiol. Vol.56(5).Pp. 1327-1332.

Honma, K., Inagaki S., Okuda, K., Kurumitsu, H.K. and Sharma, A.(2007): "Role of a *Tannerella forsythia* exopolysaccharide synthesis operon in biofilm development". Microb. Pathog. Vol. 42 Pp. 156–166.

Hu, J.Y., Yu, B., Feng, Y.Y., Tan, X.L., Ong S.L., Ng, W.J. and Hoe, W.C. (2005): "Investigation into biofilms in a local drinking water distribution system". Biofilms. Vol. 2. Pp. 19-25.

Hughes, M.N. and Poole, R.K. (1989): "Metal nutrition". En: Hughes M.N., Poole R.K". En: Metals and Microorganisms. Ed. Chapman and Hall. London

Ieven, M.M. and Hoymans, V.Y. (2005): "Involvement of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence." J. Clin. Microbiol. Vol. 43(1). Pp.19-24.

Jucker, B. A., Harms, H. and Zehnder, A. J. (1996): "Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and teflon". J. Bacteriol. Vol 178. Pp.1659-1669.

Karl, D.M. and Tilbrook, B.D (1994): "Production and transport of methane in oceanic particulate organic matter." Nature Vol. 368 Pp. 732-734.

Kaufmann, S.H.E. and Schaible, E.U. (2005): "100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus". Trends Microbiol. Vol.13(10). Pp. 469-75

Keller, L., and Surette, M.G. (2006): "Communication in bacteria : an ecological and evolutionary perspective". Nat. Rev. Microbiol. Vol. 4 Pp. 249-258

Kelly, D.P., Norris, P.R. and Brierley, C.L. (1979): "Microbiological methods for the extraction and recovery of metals." En: Bull, Ellwood and Ratledge (Ed.): "Microbial Technology: Current state, future aspects." Symposium 29. Cambridge University Press.

Kolter, R. and Greenberg, E.P. (2006) : "Microbial sciences: the superficial life of microbes". Nature. Vol. 441(7091). Pp. 300-302.

Kuchma, S.L. and O'Toole, G. (2000): "Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression". Curr. Opin. Biotechnol. Vol. 11. Pp. 429-433.

Kumar, C.G. and Anand, S. K. (1998): "Significance of microbial biofilms in food industry: a review." Int. J. Food Microbiol. Vol.42. Pp. 9-27.

Kunze, G.W. and Dixon, J.B. (1986): "Pretreatment for mineralogical analysis". En: A.Klute.(Ed.): "Methods-of-soil analysis, Part Y. Physical and Mineralogical methods". Cap.5: 91-100. (2^aed) American Society of Agronomy. Wisconsin. USA.

Lasa, I. (2006): "Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development" Int. Microbiology. Vol. 9. Pp..21-28.

Lastasa, C., Sola, C., Penadés, J.R. and Lasa, I. (2006): "Biofilm-associated proteins". C.R. Biologies. Vol. 329. Pp. 849-857.

LeChevallier, A.W., Cawthon, C.D. and Lee, R.G. (1998): "Inactivation of biofilm bacteria". Appl.Environ.Microbiol. Vol.54. Pp. 2492-2499.

Lee S.F., Li, Y.H., and Bowden, G.H. (1996): "Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity". Infect Immun. Vol. 64. Pp. 1035-1038.

Lehtola, M.J., Miettinen, I.T., Hirvonen, Arja., Vartiainen, T. and Martikainen, P.J. (2007): "Estimates of microbial quality and concentration of copper in distributed drinking water are highly dependent on sampling strategy". Int.J.Hyg.Environ.Health. Doi :10.1016/j.ijheh.2006.11.011

Lewis, k., (2001): "Riddle of biofilm resistance". Antimicrob.Agents.Chemother. Vol. 45. Pp. 999-1007.

Lopes, F.A., Morin, P., Oliveira, R. and Melo, L.F. (2006): "Interaction of *Desulfovibrio desulfuricans* biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism". J Appl Microbiol. Vol. 10.Pp.1087–1095.

López, A. (1999): "Biosorción de níquel por células libres e inmovilizadas de *Pseudomonas fluorescens* 4F39". Tesis de Licenciatura. Facultat de Farmàcia. Barcelona.

Lyon, S. (2004): "A natural solution to corrosion?". Nature. Vol. 427(29). Pp. 406-407.

Llovera, S., Bonet, R., Simon-Pujol, M.D. and Congregado, F. (1993): "Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916." App. Environ. Microbiol. Vol. 59. Pp. 3516-3518.

Macaskie, L.E. (1991): "The application of biotechnology to the treatment of wastes produced from the nuclear fuel cycle: biodegradation and bioaccumulation as a means of treating radionuclide-containing streams". Crit Rev Biotechnol. Vol. 11. Pp. 41-112.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (1997): "Microbial ecology" Pp. 532-605. En: Brock biology of microorganisms, 8 th ed Prentice Hall, Inc., Upper saddle River, N.J.

Mah, T.F. and O'Toole, G.A. (2001): "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents". Trends Microbiol. Vol. 9. Pp. 34-39.

Malik, A. (2004): "Metal bioremediation through growing cells". Environ. Int. Vol. 30. Pp. 261-278.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, F. (1982): "Molecular cloning: a laboratory manual". Pp. 456. Cold Spring Harbor, New York.

Marketon, M. M., Glenn, S.A., Eberhard A., and González, J.E (2003): "Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*". J. Bacteriol. Vol. 185 Pp. 325-331.

Marqués, A.M., Espuny, M.J., Congregado, F. and Simon-Pujol, MD. (1982): "Accumulation of Chromium by *Pseudomonas aeruginosa*." Microbios Lett. Vol. 21. Pp. 143-147.

Marqués, A.M., Estañol, I., Alsina ., Fusté, M.C., Simon-Pujol, M.D., Guinea, J. and Congregado, F. (1986): "Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide syntesizes by *Pseudomonas sp. EPS-5028*". Appl.Environ.Microbiol. Vol 52(5). Pp.1221-1223.

Marqués, A.M., Bonet, R., Simon-Pujol, M.D., Fusté, M.C. and Congregado, F. (1990): "Removal of uranium by an exopolysaccharide from *Pseudomonas sp.*" Appl .Microbiol. Biotechnol. Vol.34. Pp. 429-431

Marqués, A.M., Roca X., Simon-Pujol M.D., Fusté M.C. and Congregado F. (1991): "Uranium accumulation by *Pseudomonas sp. EPS-5028*". Appl .Microbiol. Biotechnol.Vol. 35. Pp. 406-410.

Marshall, K.C. (1992): "Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces". ASM News. Vol. 58(4).

Mateo, M. M., and Maestre, J.R. (2004): "Biofilm: modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos". Rev.Esp.Quimioterap. Vol 17(1). Pp. 26-28.

Massieux, B., Boivin, M.E.Y., Van den Ende, F.P., Langenskiöld, J., Marvan, P., Barranguet, C., Admiraal, W., Laanbroek, H.J and Zwart, G. (2004) : "Analysing structural and physiological profiles to assess the effect of Cu on biofilm forming microbial communities." Appl. Environ. Microbiol.Vol. 70. Pp. 4512-4521.

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender J. and Flemming, H.C.(1999): "The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms". Int J Biol Macromol. Vol. 26. Pp. 3-16.

Mclean, JS., Beveridge, T.J. and Phipps, D. (2000): "Isolation and characterization of a chromium-reducing bacterium from a chromium-contaminated copper arsenate-contaminated site." Environ.Microbiol.Vol. 2(8) Pp. 611-619.

McLean, R. J., Whiteley, M., Strickler, D.J. and Fuqua, W.C. (1997): "Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms". FEMS Microbiol.Lett. Vol. 154 Pp. 259-263.

Merroun, M.L., Ben Omar, N. and González-Muñoz, M.T. and Arias, J.M. (1998): "*Myxococcus xanthus* biomass as biosorbent for lead". J. Appl. Microbiol. Vol. 84. Pp. 63-67.

Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Eldere, J.V., Glupczynski Y., Laethem, Y.V., Jacobs, F., Malfroot, A., Tulkens, P.M. and Babeke, F.V. (2007): "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millenium". Clin.Microbiol.Infect. Vol.13. Pp.560-578.

Morton, L. H. G. And Surman S.B. (1994): "Biofilms in biodeterioration-a review." Int. Biodeterior. Biodegradation. Pp. 203-221.

Murray, P.R. (2000): "Manual of Clinical Microbiology". American Society for Microbiology.Washinton, DC.

Nordberg, A.B. and Persson, H. (1984): "Accumulation of heavy-metal ions by *Zooglea ramigera*". Biotechnol.Bioeng. Vol.26. Pp. 239-246.

Norris, P.R. and Kelly, D.P. (1977): "Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cervisiae*". J.Gen.Microbiol. Vol.99. Pp. 337-324.

Orlita, A. (2004): "Microbial biodeterioration of leather and its control: a review". Int. Biodeterior. Biodegradation. Vol 53. Pp.157-163.

O'Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R. (2000): "Biofilm formation as microbial development" Annu.Rev.Microbiology. Vol 54. Pp. 49-79.

Paerl, H.W. and Prufet, L.E. (1987): "Oxygen-poor microzones as potential sites of microbial N₂ fixation in nitrogen-depleted aerobic marine waters." Appl.Environ.Microbiol. Vol. 53 Pp. 1078-1087.

Paerl, H.W. and Priscu, J.C (1998): "Microbial phototrophic, hetetrophic and dizotrophic activities associated with agregates in the permanet ice cover of Lke Bonner Antarctica". Micro.Ecol. Vol 36 Pp- 221-230.

Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E. and Vega, M.(2003): "Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*". Anal. Bioanal Chem. Vol. 376. Pp.26-32.

Parsek, M. R., and Fuqua, C. (2004): "Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbiol life". J. Bacteriol. Vol. 186(4) Pp. 4427-4440.

Parsek, M. R. and Singh, P. K. (2003): "Bacteril biofilms: an emerging link to disease pathogenesis". Annu.Rev.Microbiol. Vol.57. Pp.667-701.

Pavlov, D., de Wet, C.M.E., Grabow, W.O.K and Ehlers, M.M. (2004): "Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water". Int.J.Food Microbiol. Vol.92. Pp.275-287.

Pepper, I.L., Rusin, P., Quintanar, D.R., Haney C., Josephson, K.L. and Gerba, C.P. (2004): "Tracking the concentration of heterotrophic plate count bacteria from the source to the consumer's tap". Int.J.Food Microbiol. Vol.92.Pp.289-295.

Pizarro, F., Olivares, M., Araya, M., Gidi, V. and Uauy, R. (2001): "Gastrointestinal effects associated with soluble and insoluble copper in drinking water". Environ. Health Perspect. Vol. 109(9).Pp. 949-952.

Priester, J. H., Olson, S. G., Webb, S. M., Neu, M. P., Hersman, L. E., Holden, P. A. (2006): "Enhanced Exopolymer Production and Chromium Stabilization in *Pseudomonas putida* Unsaturated Biofilms". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 72 Pp.1988-1996.

Pringet-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. and Lejeune, P. (1999): "Abiotic surface sensing and biofilm.dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*". J.Bacteriol.Vol, 181 (19). Pp. 5993-6002.

Pümpel, T. and Schinner, F. (1986): "Silver tolerance and silver accumulation of microorganisms from soil materials of a silver mine". Appl.Microbiol.biotechnol. Vol. 24. Pp.275-280.

Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P. and López-Ribot, J.L. (2005): "Candida biofilms: an update." Eukaryot. Cell. Vol. 4 (4) Pp. 633-638.

Ramage G., Martinez.M and López-Ribot J-L. (2006): "Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem." FEMS Yeast Res. Pp. 979-986.

Ramsing N.B., Ferris M.J. and Ward D.M. (2000): "Highly ordered vertical structure of Synechococcus populations within the 1-milimeter-thick photic zone of a hot spring cyanobacterial mat." Appl.Environ.Microbiol. Vol. 59 Pp. 1038-1049.

Roca, F.X.(1993): "Captación de uranio por células no proliferantes de *Pseudomonas sp. EPS-5028*". Tesina de llicenciatura. Facultat de Farmàcia. Barcelona.

Sakaguchi T., Nakajima A., and Horikoshi T. (1981): "Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVIII.Accumulation of Molybdenum by green microalgae. J.Appl.Microbiol.Biotechnol. Vol. 12. Pp. 84-89.

Sarin, P., Snoeyink, V.L., Bebee, J., Jim, K.K., Beckett, M.A., Kriven, W.M. and Clement, J.A.,(2004): "Iron release from corroded iron pipes in drinking water distribution systems: effect of dissolved oxygen".Water Res. Vol.38.Pp.1259-1269.

Sauer K., Camper, A. K., Ehrlich, G., Costerton, J.W. and Davies, D. G. (2002) : "Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm". J.Bacteriol. Vol. 184. Pp.1140-1154.

Sauer K., Rickard A.J. and Davies D.G. (2007):"Biofilms and biocomplexity". Microbe. Vol.7.Pp.347-353.

Schaudinn C., Stoodley P., Kainovic A., O'Keeffe T., Costerton B., Robinson D., Baum M., Ehrlich G. and Webster P. (2007): "Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts". Microbe. Vol.5.Pp.231-237.

Shimkets L.J. (1999): "Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*". Annu.Rev.Microbiol. Vol. 53. Pp. 525-549.

Silver, S. and Phung, L.T. (2005): "Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic" Appl Environ Microbiol. Vol. 71 (2). Pp. 599-608.

Simon-Pujol M.D., Marques A.M., Ribera M., and Congregado F.(1979): "Drug resistance of chromium tolerant gram negative bacteria isolated from river".Microb.Lett.Vol.7.Pp.139-44.

Singh, R., Debarati, P. and Rakesh, K.J.(2006): "Biofilms:implications in bioremediation". Trends Microbiol. Vol.14(9). Pp. 389-397.

Skillman, L.C., Sutherland, I.W. and Jones, M.V. (1999): "The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development." J.Appl.Microbiol.Symposium Supplement .Vol. 85.Pp. 13-18.

Song, B. and Left, G.(2005): "Identification and characterization of bacterial isolates from the Mir space station". Microbiol. Res. Vol. 160. Pp.111-117.

Soto, S. M., Smithson, J.A., Martinez, J. P., Horcajada, J.P., Mensa, J. and Vila, J. (2007): "Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance". J Urol. Vol. 177. Pp. 365-368.

Stewart, P.S. and Costerton, J.W. (2001): "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms".The Lancet. Vol. 358.Pp 135-138.

Stoodley, P., Dodds I., Boyle, J D. and Lappin-Scott, H.M. (1999):"Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure". J Appl. Microbiol. Vol 85. Pp 19-28.

Stoodley, P., Sauer K., Davies, D.G. and Costerton J.W. (2002):"Biofilms as complex differentiated communities" Annu. Rev. Microbiol. Vol 56. Pp 187-209.

Stoodley, L.H., Costerton, J.W. and Stoodley P. (2004): "Bacterial biofilms: from nature environment to infectious diseases". Nat. Rev. Microbiol. Vol.2. Pp. 95-108

Stranberg, G.W., Shumate S.E. and Parrot J.R. (1981): "Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 4. Pp. 237-245.

Sutherland, J.W. (1995): "Biofilm specific polysaccharids: do they exist?" En: The life and death of biofilm ed. Wimpenny, J.W.T. Pp.103-106. Cardiff: bioline publications.

Sutherland I.W.(2001): "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiol. Vol.147. Pp. 3-9.

Szewzyk U., Szewzyk R., Manz W. and Schleifer K-H (2000): "Microbial safety of drinking water". Annu.Rev.Microbiol.Vol. 54. Pp. 81-127.

Tsekova, K. and Ilieva, S. (2001): "Copper removal from aqueous solution using *Aspergillus niger* mycelia in free and polurethane-bound form". Appl.Microbiol.Biotechnol. Vol. 56. Pp. 573-575.

Tsezos, M. and Volesky, B. (1981): "Biosorption of uranium and thorium". Biotechnol. Bioeng. Vol. 23. Pp. 583-604.

Valls, M. and Lorenzo, V.D. (2002): "Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution". FEMS Microbiol.Rev. Vol 26. Pp. 327-338.

Vandevivere, P. and Kirchman, M.D.L. (1993): "Attachment stimulates exopolysaccharide syntesis by bacterium". Appl Environ Microbiol. Vol. 59. Pp. 641-653.

Veglio, F., Beolchini, F. and Gasbarro, A. (1997): "Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Arthrobacter sp.*" Process Biochem. Vol. 32. Pp. 99-105.

Videla, H.A. and Herrera, L.K. (2005): "Microbiologically influenced corrosion: looking to the future". Int. Microbiol. Vol.8. Pp.169-180.

Videla, H.A., Guiamet, P.S. and Gómez de Saravia, S.G.(2003): "Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya". Revista del museo de La Plata. Publicación Técnica y Didáctica. Vol. 44. Pp. 1-11.

Videla, H.A. (2002): "Prevention and control of biocorrosion". Int. Biodeterior. Biodegradation .Vol.49. Pp.259-270.

Vilaseca, A. (1984): "Estudio sobre la aplicación de la liofilización para la conservación de cepas microbianas". Tesina de Licenciatura. Facultat de Farmàcia.

Vilchez, R., Pozo, C., Gómez, M.A, Rodelas, B. and González-López, J. (2007): "Dominance of sphingomonads in a copper exposed biofilm community for groundwater treatment".Microbiol. Vol.153. Pp. 325-337.

Volesky, B. and Holan, Z.R. (1995): "Biosorption of heavy metals".Biotechnol. Prog. Vol 11.Pp. 235-250.

Walker, J.T., Bradshaw, D.J., Bennett, A.M., Fulford, M.R., Martin, M.V. and Marsh, P.D. (2000): "Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice.". Appl.Environ.Microbiol. Vol.66. Pp. 3363-67.

Watnick, P. and Kolter, R. (2000): "Biofilm, city of microbes". J. Bacteriol.Vol. 182 Pp. 2675-2679.

Welch, M., Mikkelsen, H., Seaton, J.E., Smith, D., Thomas, G. L., Glansdorp, F.G. and Spring, D.R. (2006): "Cell-cell communication in gram-negative bacteria". Mol Biosyst. Vol 1.Pp. 196-202.

White, C. and Gadd, G.M. (2000): "Copper accumulation by sulfate reducing bacterial biofilms. FEMS Microbiol.Lett. Vol.183. Pp. 313-318.

Whitman, W J., Coleman, D. C. and Wiebes, W. J. (1998): "Prokaryotes: The unseen majority". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.95. Pp. 6578–6583.

World Health Organization (2004): "Copper in drinking-water". Background document for development of WHO Guidelines for Drinking water Quality.

Wood, J.M. and Wang H.K. (1983): "Microbial resistance to heavy metals." Environ. Sci. Technol. Vol. 17. Pp.582A-590A.

Zacarías, I., Yáñez M.A., Oraka, Ch., Olivares, M. and Uauy, R. (2001): "Determination of the taste threshold of copper in water". Chem. Senses. Vol.26. Pp. 85-89.

Zeitz, B.P. (2003): "Epidemiological investigations on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply". Sci Total Environ. Vol. 302 Pp. 127-144.

Zobell, C. E. (1943): "The effect of solid surfaces on bacterial activity". J.Bacteriol. Vol. 46. Pp.39-56.

Zuercher, A.W., Horn, M.P., Wu, H., Song, Z., Bundgaard, C.J., Johansen, H.K., Hoiby, H., Marcus, P. and Lang, A.B. (2006): "Intranasal immunisation with conjugate vaccine protects mice from systemic and respiratory tract infection with *Pseudomonas aeruginosa*." Vaccine. Vol.24. Pp.4333-4342