



Determinació de l'origen de la contaminació fecal en aigües mitjançant la detecció molecular d'indicadors microbians

Elisenda Ballesté Pau

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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

**DETERMINACIÓ DE L'ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓ FECAL EN AIGÜES
MITJANÇANT LA DETECCIÓ MOLECULAR D'INDICADORS MICROBIANS**

Memòria presentada per Elisenda Ballesté Pau
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Programa de doctorat: Microbiologia Ambiental i Biotecnologia
Bienni: 2003-2005

Tesis realitzada sota la direcció del Doctor Anicet R. Blanch Gisbert, al departament de
Microbiologia de la Universitat de Barcelona.

El director

La doctoranda

Dr. Anicet Blanch

Elisenda Ballesté

Barcelona, Octubre 2008

“Mentre observava l’aigua [...] el moviment de la majoria d’aquells “animàculs” era tan àgil i tan variat, cap amunt, cap avall, en cercles, que era una cosa meravellosa de veure. I penso jo que algunes d’aquelles minúscules criatures eren més de mil vegades més petites que les més petites que mai hagués vist...”

Anton van Leeuwenhoek, carta a la Royal Society, 1 de juny de 1674

I al final... un cop recollit el fruit d'aquests anys voldria agrair a tots aquells que han estat al meu costat, que m'han recolzat, preguntat i interessat pel que aquí s'escriu.

Primer de tot, agrair a l'Anicet l'oportunitat de poder desenvolupar-me al seu grup, d'ensenyar-me, d'orientar-me i animar-me. Al Francisco i al Joan que més a distància han anat seguint el treball. A tots aquells que m'han ensenyat: al Xavi i la Cris que han estat allà, amb mi, al laboratori. Al Marc Viñas, l'Anna Maria i el seu aparell de DGGE; a l'Àlex i la Marta i les sessions de Fingerprinting II sense els quals no hagués pogut llegir els gels. Al Lluís Belanche i tots aquests números i models que semblaven tant complicats. A l'Amaya, l'Agustí i la resta de gent del parc que m'han donat un cop de mà amb la PCR quantitativa. A la Sara, sense la qual els experiments i excursions a Abrera per descobrir la persistència dels respectius microorganismes no hauria estat tant "divertit".

A tota aquella gent que han estat al meu costat, dia a dia al laboratori l'Arnau, l'Imma, la Maru, la Lejla, la Míriam, l'Ana i l'Anna, el Sergi, la Sílvia, el Byron i byroncito, el Jesús i els seu animalets, la Carol, la Ruth, la Maite, el Néstor, la Pili, l'Ale, la Marize, el Michel i la Laura, la Rosario, la Raquel i l'Aiora, a les noies i al guiri del 7... Déu ni do quants noms i els que em deixo, però que han estat allà.

I fora del laboratori... al Jordi, l'Helena i el Miquel per ser-hi. A la Marina. Als companys d'àrab que m'han ajudat a abstreure i a escriure al revés. Als garriguencs de l'Ateneu. I als companys d'aigües que m'han acollit al final.

Als meus pares, a ma germanes, tietes i cosines. I al meu padrí.

A la Renfe i les llargues, llargues, ... estones que m'han retingut i que m'han ensenyat a concentrar-me, llegir i escriure en qualsevol adversitat.

Al S. Pey i els seu sinònims.

Al Joan Brossa i a Bilibin per deixar-me utilitzar els seus dibuixos. Mercés.

A l'Arcadi, el Ryszard i el Joan per ensenyar-me a veure, mirar i entendre. Al Pascal i a l'Enric per acompanyar-me.

A tots aquells que m'han esperat.

I finalment a tres ... tres ... tres... personatges ... al Carles (ell menys, que no ho ha patit tant), a l'Ayalke i al Jordi, per haver-me aguantat.

Moltes gràcies a tots i totes.

ÍNDIX DE CONTINGUTS

Capítol 1. Introducció General.....	1
1.1 Ús i contaminació de l'aigua.....	3
1.2 “Microbial Source Tracking”.....	9
1.2.1 Indicadors químics.....	9
1.2.1.1 Indicadors químics directes.....	9
1.2.1.2 Indicadors químics indirectes.....	11
1.2.2 Indicadors microbiològics.....	12
1.2.2.1 Mètodes dependents de bases de dades.....	12
1.2.2.2 Mètodes independents de bases de dades i dependents de cultiu.....	17
1.2.2.3 Mètodes independents de bases de dades i de cultiu.....	20
1.3 Els gèneres <i>Bifidobacterium</i> i <i>Bacteroides</i> com a indicadors de l'origen de la contaminació fecal.....	28
1.3.1 Abundància a la microbiota intestinal d'humans i animals.....	28
1.3.2 Indicadors de contaminació fecal.....	30
1.3.2.1 <i>Bifidobacterium</i> com a microorganisme indicador de la contaminació fecal.....	31
1.3.2.2 <i>Bacteroides</i> com a microorganisme indicador de la contaminació fecal.....	35
1.4 Estat actual de MST.....	40
Objectius	43
Capítol 2. Anàlisi comparatiu de mètodes per a la detecció de l'origen de la contaminació fecal en aigües basats en l'amplificació d'àcid nucleics.....	47
2.1 Introducció.....	49
2.1.1 Detecció del grup <i>Bacteroides</i>	53
2.1.2 Detecció d'espècies de <i>Bifidobacterium</i>	54
2.1.3 Detecció del gen <i>esp</i> d' <i>Enterococcus faecium</i>	54
2.1.4 Detecció d'ADN mitocondrial.....	54
2.2 Materials i Mètodes.....	57
2.2.1 Mostres analitzades.....	57
2.2.2 Soques, medis de creixement utilitzats i extracció d'ADN.....	59
2.2.2.1 Grup Bacteroidetes.....	59

2.2.2.2	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> i <i>Bif. dentium</i>	60
2.2.2.3	<i>Enterococcus faecium</i>	61
2.2.2.4	ADN mitocondrial.....	61
2.2.3	Processament i anàlisi de les mostres.....	62
2.2.3.1	Detecció del grup Bacteroidetes.....	62
2.2.3.2	Detecció per PCR múltiple de <i>Bif. adolescentis</i> i <i>Bif. dentium</i>	63
2.2.3.3	Detecció de la proteïna de superfície esp d' <i>Enterococcus faecium</i>	65
2.2.3.4	Detecció d'ADN mitocondrial de cèl·lules humanes, bovines i porcines.....	67
2.2.4	Anàlisi estadística i obtenció de models.....	68
2.3	Resultats.....	71
2.3.1	Detecció del grup Bacteroidetes.....	71
2.3.2	Detecció de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> i <i>Bif. dentium</i>	72
2.3.3	Detecció de la proteïna esp d' <i>Enterococcus faecium</i>	74
2.3.4	Detecció d'ADN mitocondrial de diferents hostes.....	75
2.3.5	Models predictius.....	76
2.3.5.1	Avaluació dels marcadors considerant 4 orígens de les mostres: humà boví, porcí i avícola.....	77
2.3.5.2	Avaluació dels marcadors considerant humà respecte no humà.....	80
2.4	Discussió.....	85

Capítol 3. Diversitat del gènere *Bifidobacterium* en aigües

	residuals d'origen humà i animal.....	95
3.1	Introducció.....	97
3.2	Materials i Mètodes.....	105
3.2.1	Disseny experimental.....	105
3.2.2	Soques de referència medis de cultiu i condicions de creixement.....	106
3.2.3	Mostres analitzades.....	108
3.2.4	Extracció del material genètic.....	108
3.2.5	Amplificació mitjançant la reacció de PCR.....	109
3.2.5.1	Amplificació per a la detecció mitjançant gels de DGGE.....	109
3.2.5.2	Amplificació de les bandes de DGGE.....	111
3.2.5.3	Amplificació de soques ambientals.....	111
3.2.6	Electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant.....	112
3.2.6.1	Preparació del gel de gradient desnaturalitzant.....	112
3.2.6.2	Visualització i anàlisi dels perfils genètics.....	114
3.2.7	Extracció de les bandes de DGGE.....	114

3.2.8	Reacció de seqüenciació.....	115
3.2.9	Anàlisi de les seqüències d'ADN.....	116
3.2.10	Disseny de sondes específiques i recuperació de soques ambientals mitjançant hibridació colonial.....	117
3.2.10.1	Marcatge de les bandes de DGGE característiques dels diferents origens mitjançant UTP-digoxigenina.....	117
3.2.10.2	Disseny de noves sondes a partir de les seqüències obtingudes.....	117
3.2.11	Recuperació de soques ambientals del gènere <i>Bifidobacterium</i> característiques dels diferents orígens estudiats.....	118
3.2.12	Confirmació de soques ambientals “característiques” dels diferents orígens.....	120
3.3	Resultats.....	123
3.3.1	Anàlisi de les soques tipus amb gels de gradient desnaturalitzant.....	123
3.3.2	Anàlisi de mostres d'aigua residual de diferents orígens amb gels de gradient desnaturalitzant.....	126
3.3.2.1	Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen humà.....	126
3.3.2.2	Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen avícola.....	127
3.3.2.3	Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen porcí.....	128
3.3.2.4	Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen boví.....	129
3.3.2.5	Anàlisi de mostres d'aigua residual de diferents orígens.....	130
3.3.3	Identificació de les bandes de DGGE de les mostres d'aigua residual de diferent orígens.....	132
3.3.3.1	Identificació de les bandes de mostres d'origen humà.....	133
3.3.3.2	Identificació de les bandes de mostres d'origen avícola.....	136
3.3.3.3	Identificació de les bandes de mostres d'origen porcí.....	136
3.3.3.4	Identificació de les bandes de mostres d'origen boví.....	137
3.3.4	Recuperació d'espècies majoritàries i exclusives d'aigües residuals de diferents orígens.....	139
3.3.4.1	Marcatge de les bandes de DGGE.....	139
3.3.4.2	Disseny de sondes a partir de les seqüències de les bandes de DGGE.....	143
3.4.	Discussió.....	147
3.4.1	Anàlisi de les soques tipus amb gels de gradient desnaturalitzant.....	147
3.4.2	Anàlisi de mostres d'aigua residual de diferents orígens amb gels de gradient desnaturalitzant.....	147
3.4.3	Identificació de les espècies majoritàries que conformen els perfils ..	149
3.4.3.1	Identificació d'espècies d'origen humà.....	149
3.4.3.2	Identificació d'espècies d'origen avícola.....	150

3.4.3.3	Identificació d'espècies d'origen porcí.....	151
3.4.3.4	Identificació d'espècies d'origen boví.....	153
3.4.4	Recuperació de mostres ambientals.....	154

Capítol 4. Desenvolupament d'una PCR quantitativa en temps real per a l'enumeració del gènere *Bacteroides*.....157

4.1	Introducció.....	159
4.1.1	PCR quantitativa en temps real.....	162
4.1.2	PCR quantitativa en temps real aplicada al gènere <i>Bacteroides</i>	166
4.2	Materials i mètodes.....	169
4.2.1	Determinació del límit de quantificació de la PCR-Q.....	169
4.2.2	Determinació del límit de detecció de la PCR-Q.....	170
4.2.3	Desenvolupament de les diferents PCR-Q en temps real.....	171
4.2.3.1	PCR-Q en temps real utilitzant la molècula intercalant SYBRGreen.....	171
4.2.3.2	Disseny d'una PCR-Q en temps real utilitzant una sonda TaqMan.....	172
4.2.3.3	Avaluació d'una PCR-Q descrita prèviament (Layton et al. 2006).....	173
4.2.4	Càlcul de l'eficiència de la PCR-Q.....	174
4.3	Resultats.....	177
4.3.1	Caracterització de la composició de la corba estàndard.....	177
4.3.2	Avaluació de les diferents PCR-Q.....	178
4.3.3	Determinació del límit de quantificació de les PCR-Q.....	180
4.3.4	Determinació del límit de detecció de les PCR-Q.....	181
4.4	Discussió.....	183

Capítol 5. Avaluació de la inactivació de *Bacteroides* “in situ” en aigua de riu.....187

5.1	Introducció.....	189
5.1.1	<i>Bacteroides</i> spp. al medi ambient.....	190
5.1.2	Factors ambientals que intervenen en la persistència dels microorganismes.....	192
5.1.2.1	La temperatura.....	192
5.1.2.2	La presència de depredadors.....	193
5.1.2.3	L'oxigen.....	194
5.1.2.4	La radiació solar.....	195
5.1.2.5	Les sals, els nutrients i el pH.....	196

5.1.2.6	Sedimentació i adsorció a partícules.....	196
5.2	Materials i Mètodes.....	199
5.2.1	Enumeració de <i>Bacteroides</i> utilitzant tècniques de cultiu.....	199
5.2.1.1	Enumeració amb el medi selectiu i diferencial BBE.....	199
5.2.1.2	Enumeració amb el medi ric BPRM i hibridació amb la sonda Bac303.....	200
5.2.2	Confirmació de presumptes <i>Bacteroides</i> mitjançant hibridació colonial.....	200
5.2.3	Avaluació dels medis BBE i BPRM i de la hibridació colonial.....	202
5.2.4	Detecció amb PCR i PCR-Q específiques del grup Bacteroidetes.....	203
5.2.4.1	Anàlisi mitjançant una PCR convencional.....	203
5.2.4.2	Anàlisi mitjançant una PCR quantitativa en temps real.....	204
5.2.5	Enumeració de coliformes i enterococs fecals.....	205
5.2.6	Assaig de la persistència “in situ” en aigua de riu.....	206
5.2.7	Assaigs de persistència en microcosmos (model experimental).....	209
5.2.8	Càlcul de la inactivació i anàlisis dels valors.....	211
5.3	Resultats.....	213
5.3.1	Valoració del medi BBE, BPRM i hibridació colonial.....	213
5.3.2	Valoració de la inactivació natural del gènere <i>Bacteroides</i> “in situ” mitjançant tècniques moleculars i medis selectius.....	214
5.3.2.1	Assaig 1: Anàlisi de la persistència de les soques tipus <i>Bacteroides fragilis</i> i <i>B. thetaiotaomicron</i> “in situ” en aigua de riu.....	215
5.3.2.2	Assaig 2: Anàlisi de la persistència de <i>B. fragilis</i> “in situ” en aigua de riu estèril.....	223
5.3.2.3	Assaig 3: Anàlisi de la persistència de <i>Bacteroides</i> spp. i altres indicadors microbians “in situ” en aigua de riu.....	227
5.3.3	Inactivació natural de <i>B. fragilis</i> i <i>B. thetaiotaomicron</i> en microcosmos al laboratori.....	233
5.3.3.1	Microcosmos de <i>Bacteroides fragilis</i>	233
5.3.3.2	Microcosmos de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	236
5.4	Discussió.....	241
5.4.1	Valoració de la recuperació en BBE i BPRM/HC.....	241
5.4.2	Persistència de les diferents poblacions microbianes en aigua de riu “in situ”.....	242
5.4.2.1	Persistència de cèl·lules cultivables de <i>Bacteroides fragilis</i>	243
5.4.2.2	Persistència de cèl·lules cultivables de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	245

5.4.2.3	Persistència de <i>Bacteroides</i> spp., coliforms fecals i enterococs d'aigua residual d'EDAR en aigua de "in situ".....	246
5.4.2.4	Persistència al medi de <i>B. fragilis</i> i <i>B. thetaiotaomicron</i> com a marcadors moleculars de la contaminació fecal a l'aigua.....	249
5.4.3	Persistència de <i>B. fragilis</i> i <i>B. thetaiotaomicron</i> en microcosmos al laboratori.....	251
Conclusions.....		255
Bibliografia.....		261
Annex I. Determinacions Bacteriològiques.....		293
Annex II. Mètodes generals, reactius i solucions.....		289

Llistat d'abreujaments

ADN	àcid desoxiribonucleic
16S ADNr	seqüència cromosòmica que codifica pel gen del 16S ARNr
AE	aigua estèril
AFLP	anàlisi de polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció amplificats (Amplified Fragment Length Polymorphism)
APS	persulfat amònic
ARA	anàlisi de resistència a antibiòtics (Antibiotic Resistance Analysis)
ARDRA	anàlisi de fragments amplificats de restricció d'ADN ribosomal (Amplified rDNA Restriction Analysis)
ARN	àcid ribonucleic
ARNr	ARN ribosòmic
ATLL	Aigües del Ter Llobregat
BBE	<i>B. fragilis</i> bilis esculina agar
BHQ	Black Hole Quencher
Bomito	marcador de MST basat en ADN mitocondrial de bovins
BPRM	Bacteroides Phages Recovery Medium
CBA	medi Columbia Blood Agar
CF	coliforms fecals
CRSA	Centre de Recerca en Seguretat Animal
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate
CSU	utilització de fonts de carboni (Carbon source utilization)
C _T	cicle d'una PCR-Q en que la fluorescència emesa supera la fluorescència llindar
CTC	5-ciano-2,3-ditolil clorur de tetrazolium
DAPI	4,6- <i>diamino</i> -2-fenilindol
DGGE	Electroforesi de gels de gradient desnaturalitzant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dNTP	desoxinucleòtid trifosfat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DVC	comptatge directe de viables (DVC: direct viable count)
EDTA	àcid etilen-diamino-tetraacètic
EF	enterococs fecals
EPA	Environmental Protection Agency
FISH	Hibridació fluorescent <i>in situ</i> (Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization)
FRET	transferència d'energia fluorescent mitjançant ressonància (FRET: Förster resonance energy transfer)
FWAs	agents blanquejant fluorescents (Fluorescence Whitening Agent)
G+C	Contingut de guanines i citosines
HBSA	Human Bifidobacteria Sorbitol-fermenting Agar

HC	hibridació colonial
Humito	marcador de MST basat en ADN mitocondrial d'humans
LABs	alquilbenzens de cadena llarga (Linear Alkyl Benzene)
MAR	resistència múltiple a antibiòtics (Multiple Antibiotec Resistance)
mEA	medi <i>Enterococcus</i> Agar
mFC	modified Fecal Coliform
MST	Microbial Source Tracking
NCBI	National Center for Biotechnological Information
PCR	reacció en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PCR-Q	PCR quantitativa
PFGE	electroforesi en gels de camp polsat (Pulsed Fiel Electrophoresis)
Pomito	marcador de MST basat en ADN mitocondrial de porcíns
p/v	relació pes per volum
RAPD	anàlisi de polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb iniciadors arbitraris (Random Amplification of Polymorphic DNA)
RCM	medi Reinforced Clostridium Medium
RDP	Ribosomal Database Project
Rep-PCR	amplificació múltiple (Repetitive element PCR)
ROS	espècies reactives de l'oxigen (Reactive Oxygen Species)
rpm	revolucions per minut
SDS	dodecil sulfat sòdic
SSC	tampó clorur sòdic citrat sòdic
STP	trifosfat sòdic (Sodium TriPhosphate)
TAE	tampó Tris, àcid acètic i EDTA
Taq	polimerasa termoestable utilitzada en la PCR. El seu nom prové del bacteri del qual es va extreure <i>Termus aquaticus</i> .
TBE	tampó Tris, àcid bòric i EDTA
TGGE	electroforesi de gels de gradient de temperatura (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
T _m	temperatura de desnaturalització d'una doble cadena d'ADN
T ₉₀	temps que tarda una població bacteriana a reduir-se un 90%
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
T-RFPL	anàlisi terminal de polimorfismes en longitud de fragments de restricció (Terminal Restriction Fragment Lenght Polymorphism)
TSA	Tryptone Soy Agar
TSB	Tryptone Soy Broth
UFC	unitats formadores de colònies
UTP-Dig	nucleòtid uracil conjugat amb la molècula digoxigenina
UV	llum ultraviolada
VBNC	cèl·lules viables però no cultivables (viable but not culturable)

Capítol 1

Introducció General

1.1 Ús i contaminació de l'aigua

Tots som conscients de la importància vital de l'aigua, de la seva necessitat per beure, per la producció d'aliments i per la neteja i la higiene. De l'aigua també depèn un bon desenvolupament econòmic ja que és necessària en la producció industrial, és important per generar energia i pel transport de béns i persones. L'aigua és essencial per assegurar la integritat i la sostenibilitat dels ecosistemes del planeta.

Tot i que l'aigua és un recurs renovable, té uns límits. El cicle global de l'aigua sembla incapaç de poder-se adaptar a la creixent demanda de les pròximes dècades. L'augment demogràfic mundial implica un increment proporcional de la demanda d'aigua (Gardner-Outlaw, T. et al, 1997) i la generació d'un elevat volum d'aigües residuals que s'ha de gestionar i tractar adequadament. Per exemple a l'àrea metropolitana, l'any 2006, es va tractar un total de 290 milions de m³ d'aigua residual el que correspon a 113.000 m³/dia (Dades Ambientals Metropolitanas 2006: www.amb.cat).

La contaminació de l'aigua pot estar provocada per residus humans, residus industrials i químics i residus provinents de l'agricultura com fertilitzants i pesticides. Les aigües residuals generades aporten al medi microorganismes, substàncies d'origen químic (metalls pesants, compostos orgànics...), i es poden veure modificats paràmetres físics com un augment de temperatura de l'aigua, modificació de l'alcalinitat, la terbolesa, etc.

La contaminació fecal és una de les principals causes del deteriorament de la qualitat de l'aigua. La matèria fecal pot aportar microorganismes patògens al cicle, contaminant tant aigües superficials, com aqüífers i zones costaneres. Aquest fet pot comportar un potencial risc sanitari per a la població, importants costos econòmics quan es veuen afectats diferents ambients aquàtics utilitzats per l'home com zones d'abastament d'aigua potable, zones pesqueres, cultius de peixos i mariscs i zones recreatives (llacs, rius, mars...) i greus costos ambientals pels ecosistemes.

Als Estats Units, país on des de l'any 1971 existeix un programa de vigilància específic de malalties transmeses per l'aigua, s'han verificat un total de 39 brots relacionats amb malalties de transmissió hídrica entre els anys 1999 i 2000. Vint d'aquests s'han relacionat amb un origen microbiològic: un 35% deguts a paràsits com *Cryptosporidium parvum* i *Giardia duodenalis*, un 45% a bacteris (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp. i *Campylobacter jejuni*) i un 20% a virus (Calicivirus) (Carraro, E. et al,

2004). A Europa no existeix un pla al mateix nivell que el dels EUA, i això fa que l'aparició de brots de gastroenteritis estigui subestimada. Un estudi publicat per l'Agència Ambiental Europea i l'oficina regional de la OMS a Europa (Bartram, J., 2002) dut a terme entre els anys 1986 i 1996 a 18 països europeus, ha indicat 710 brots d'origen hídric, que han afectat una mitja de 220 persones per brot (de 2 a 3500) (Taula 1.1). S'ha vist que el número de brots epidèmics transmesos per aliments és de 300 a 350 vegades superior que el número de casos registrats; i s'estima que aquesta proporció és la mateixa en el cas dels brots transmesos per l'aigua (Bartram, J., 2002).

La contaminació fecal pot tenir un origen humà o un origen animal (d'animals domèstics, salvatges o de granges). Tant si la contaminació fecal prové d'un origen o d'un altre comporta un risc sanitari, ja que ambdós poden portar associats diferents tipus de malalties. Així per exemple, les femtes humanes poden aportar a l'aigua alguns patògens bacterians com *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* sv. *typhi* que causa la febre tifoide i *Shigella* spp. entre d'altres. També hi podem trobar associats en femtes humanes virus com els de l'hepatitis A, enterovirus i virus Norwalk que produeixen alteracions digestives. En canvi, d'altres patògens com l'agent causant de la salmonel·losi: *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Giardia* i *Cryptosporidium*, i alguns virus com el de l'hepatitis E (Field, K.G., 2005) es troben associats a femtes d'animals de sang calenta. La Taula 1.2. mostra una relació d'alguns dels patògens transmesos per l'aigua.

La concentració d'agents causants de malalties presents habitualment a l'aigua és baixa. A més a més, la seva detecció i la seva enumeració en estudis epidemiològics o de risc sanitari es veu dificultada perquè són microorganismes de difícil recuperació ja que poden estar metabòlicament sota un estrès fisiològic o poden haver perdut la seva viabilitat de cultiu. Addicionalment, el cultiu de la majoria de patògens demana elevats requeriments nutricionals (és el cas de bacteris, protozous i helmints) o precisen de línies cel·lulars establertes (com en els virus). Per tant, la seva detecció i anàlisi al laboratori requereix d'uns procediments adients, de temps, i els costos econòmics són elevats. Aquests problemes poden ser pal·liats actualment amb l'avanç de les tècniques moleculars (Toze, S., 1999) tot i que també tenen les seves limitacions relacionades amb els límits de detecció, amb la valoració de la viabilitat de cultiu i la capacitat d'infecció. Cal tenir en compte que la concentració de les mostres implica, també, la concentració de substàncies inhibidores que pot emascarar el resultat. A més a més, la presència de patògens a l'aigua dependrà de que hi hagi episodis infecciosos. Conseqüentment,

Taula 1.1 Epidèmies transmeses per l'aigua associades a l'aigua de beguda i de bany. Dades obtingudes a 18 països europeus entre el període 1986-1996 (Modificada de Bartram (2002)).

País	Núm d'epidèmies	Núm de casos	Agent etiològic o malaltia
Albània	14	59	Disenteria amèbica (5), febre tifoide (5), còlera (4)
Alemanya	0	0	No s'han recollit epidèmies
Croàcia	29	1931	Disenteria bacteriana (14), gastroenteritis (6), Hepatitis A (4), tifus (4), criptosporidiosi (1)
Eslovènia	45	n.d.	Gastroenteritis ¹ (33), disenteria bacteriana (8), Hepatitis A (2), disenteria amèbica (1), giardiosi (1)
Espanya	208	n.d.	Gastroenteritis ¹ (97), disenteria bacteriana (47), Hepatitis A (28), tifus (27), giardiosi (7), criptosporidiosi (1), no especificat (1)
Estònia	12	1010	Disenteria bacteriana (7), Hepatitis A (5)
Grècia	2	16	Disenteria bacteriana (1), tifus (1)
Hongria	27	4884	Disenteria bacteriana (17), gastroenteritis ¹ (6), salmonel·losi (4)
Islàndia	1	10	Disenteria bacteriana (1)
Letònia	1	863	Hepatitis A (1)
Lituània	0	0	No s'han recollit epidèmies
Malta	162	19	Gastroenteritis ¹ (152), disenteria bacteriana (4), Hepatitis A (4), giardiosi (1), tifus (1)
Noruega	0	0	No s'han recollit epidèmies
Regne Unit	20	2810	Criptosporidiosi (13), gastroenteritis ¹ (6), giardiosi (1)
Rep. Txeca	18	76	Gastroenteritis ¹ (15), disenteria bacteriana (2), Hepatitis A (1)
Rep. Eslovaca	61	5173	Disenteria bacteriana (30), gastroenteritis ¹ (21), Hepatitis A (8), tifus (2)
Romania	57	745	Disenteria bacteriana (36), gastroenteritis ¹ (8), Hepatitis A (8), còlera (3), tifus (2)
Suïssa	53	27074	Gastroenteritis ¹ (36), campil·lobacteriosi (8), virus Norwalk-like (4), giardiosi (4), criptosporidiosi (1), disenteria amèbica (1), <i>Aeromonas</i> sp. (1)
Total	710		Gastroenteritis ¹ (410), disenteria bacteriana (191), Hepatitis A (71), febre tifoide (45), criptosporidiosi (16), giardiosi (14), campilobacteriosi (8), disenteria amèbica (7), còlera (7), virus Norwalk-like (4), <i>Salmonella</i> (4), <i>Aeromonas</i> sp. (1), no especificat (1)

¹Agent etiològic conegut; n.d. no determinat

Taula 1.2 Patògens associats a la contaminació fecal en l'aigua (Anònim, 2006b).

	Patògens	Persistència en l'aigua	Capacitat d'infecció	Origen (H: humà; A: animal)
Bacteris	<i>Legionella</i> spp.	Es multiplica	Moderada	H
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pot multiplicar-se	Baixa	H
	<i>Salmonella typhi</i>	Moderada	Baixa	H
	<i>Shigella dysinterae</i>	Curta	Moderada	H
	<i>Vibrio cholera</i>	Curta	Baixa	H
	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Moderada	Moderada	A
	<i>E. coli</i> enterohemorràgica	Moderada	Alta	A
	<i>E. coli</i> enteropatogènica	Moderada	Baixa	A
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Llarga	Baixa	A
	Altres salmonel·les	Poden multiplicar-se	Baixa	A
Virus	Adenovirus	Llarga	Alta	H
	Enterovirus	Llarga	Alta	H
	Hepatitis A	Llarga	Alta	H
	Rotavirus	Llarga	Alta	H
	Hepatitis E	Llarga	Alta	Potencial A
	Norovirus	Llarga	Alta	Potencial A
Protozois	<i>Acanthamoeba</i> spp.	Llarga	Alta	H
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Llarga	Alta	H
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Moderada	Alta	H
	<i>Naegleria fowleri</i>	Pot multiplicar-se	Alta	H
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Llarga	Alta	A
	<i>Giardia intestinalis</i>	Moderada	Alta	A
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Llarga	Alta	A
Hel·mints	<i>Dracunculus medinensis</i>	Moderada	Alta	H
	<i>Schistosoma</i> spp.	Curta	Alta	A

per tal de poder mesurar la càrrega de contaminació fecal i el risc associat a la possible presència de patògens a l'aigua cal determinar uns paràmetres indicadors.

Els indicadors de la contaminació fecal són principalment microorganismes associats al tracte intestinal. La seva presència a l'aigua fa pensar en una possible contaminació fecal d'aquesta. Per tal que un grup o població microbiana sigui utilitzat com a indicador ha de complir els següents requisits (Maier, R.M. et al, 2000):

- Han d'estar associats a la presència del patogen. L'indicador ha d'estar present quan hi ha contaminació fecal a l'aigua.
- L'indicador no ha d'estar present al medi ambient quan no hi ha hagut contaminació.
- L'indicador hauria de ser vàlid en qualsevol tipus d'ambient (aigües superficials, subterrànies i aigües marines).
- Han de poder ser aïllats i cultivats al laboratori de manera fàcil, ràpida i econòmica. I els tests han de ser específics i no donar falsos positius.
- La concentració de l'indicador ha de ser superior o igual a la dels patògens.
- Ha d'haver-hi correlació entre l'indicador i el patogen, de manera, que al quantificar l'indicador es tingui una estimació directa del nombre de patògens.
- Han de presentar un comportament semblant al dels patògens. És a dir, incapaç de reproduir-se al medi ambient i presentar igual o major resistència a tractaments de depuració i processos d'inactivació.

S'han establert alguns indicadors microbians que permeten detectar la càrrega de la contaminació fecal en les aigües. Entre els més utilitzats s'hi troben els coliformes totals, coliformes fecals, *Escherichia coli*, enterococs fecals, espores de clostridis sulfít reductors i fags somàtics.

Les normatives vigents que estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de les aigües a Espanya es basen en l'anàlisi d'aquests tipus d'indicadors per tal de determinar si hi ha contaminació fecal a l'aigua. Així el Real Decreto 140/2003 (Anònim, 2003) i la directiva europea 98/83/CE del Consell (Anònim, 1998) demanen l'absència total d'*E. coli*, d'*Enterococcus* i d'espores de clostridis sulfít reductors en 100 ml d'aigua quan aquestes estan destinades a aigües de consum. Pel que fa a l'aigua de bany el RD

1341/2007 (Anònim, 2007a) i la directiva 2006/7/CE sobre aigües de bany (Anònim, 2006a) contempnen l'anàlisi d'enterococs fecals i d'*E. coli* acceptant com a una qualitat bona de l'aigua uns valors de 400 i 1000 UFC/100ml respectivament en aigües continentals i de 200 i 500 UFC/100 ml en zones de transició.

Per fer front a la creixent demanda d'aigua agreujada pels dèficit de precipitacions actual, cada cop pren més importància la reutilització de l'aigua depurada. L'aigua regenerada pot ser utilitzada per al reg de jardins privats, zones verdes, de diferents tipus de cultius, camps de golf, per a la neteja, per a l'ús en torres de refrigeració, per la recàrrega d'aqüífers i pel manteniment de zones humides, cabals insuficients, etc. Els paràmetres microbiològics que contempla el RD 1620/2007 (Anònim, 2007b) són el comptatge d'*E. coli* i de nemàtodes intestinals. El número d'*E. coli* requerit dependrà de l'ús que se li doni a l'aigua: des de 0 UFC/100 ml en el cas de l'ús de l'aigua per al reg de jardins particulars, recàrrega de sanitaris, en torres de refrigeració i recàrrega d'aqüífers per injecció directa; fins a 10.000 UFC/ml per a l'aigua usada per regar cultius llenyosos en els que l'aigua no entri en contacte directe amb el fruit, plantes ornamentals, cultius per a ús industrial, i també l'aigua destinada per a processos i per a la neteja de la indústria no alimentària i per a reomplir estanys i caudals ornamentals.

En els darrers anys s'ha anat proposant i consolidant l'ús d'indicadors que a més de detectar i quantificar la càrrega de la contaminació fecal a l'aigua permetin discriminar la font causant d'aquesta. Això permetria poder millorar la seva gestió i mitigar la contaminació en l'origen recuperant amb més eficiència les zones afectades; es podria estimar el risc sanitari que porta associat; prendre les mesures legals oportunes i establir responsabilitat econòmiques. La directiva europea que regula la qualitat de les aigües de bany 2006/7/EC, ha donat èmfasi a la la importància de poder determinar l'origen de la contaminació fecal i contempla el seu anàlisi (www.europarl.europa.eu/oeil/file.jsp?id=226822).

Així que disposar d'indicadors que a més a més de mesurar la càrrega de la contaminació fecal ens indiquin el seu origen ens suposa una eina fonamental per a la gestió d'un recurs únic i insubstituïble com és l'aigua.

1.2 “Microbial Source Tracking”

“Microbial Source Tracking” (MST) és un terme anglès emprat per parlar de la traçabilitat de la contaminació fecal en aigües, amb l'objectiu d'identificar l'origen d'aquesta contaminació. S'han proposat diferents tipus d'indicadors de MST, i alhora diferents metodologies per a detectar-los. Hi trobem des de la determinació de fags que infecten *Bacteroides fragilis*, a *Rhodococcus coprophilus* que forma part de la microbiota intestinal d'herbívoros, passant per l'avaluació amb marcadors no microbians com molècules químiques, fins a la detecció de l'ADN mitocondrial de les cèl·lules de l'organisme implicat. Pel que fa a metodologies, s'utilitza tant la detecció amb els mètodes tradicionals de cultiu, com mitjançant les tècniques moleculars recents basant-se en la diversitat genètica microbiana. Per tant, atenent a la naturalesa de l'indicador podem diferenciar els indicadors químics i els indicadors microbiològics.

1.2.1. *Indicadors químics*

Els indicadors químics es basen en la detecció de molècules químiques relacionades amb un determinat origen fecal. També tenen un paper rellevant entre els indicadors de l'origen de la contaminació fecal. Es diferencien dos tipus d'indicadors químics: els indicadors químics directes i els indirectes.

Els *indicadors químics directes*, són aquells que es basen en la detecció d'una molècula diana que forma part de la matèria fecal per estar relacionada amb la fisiologia de l'hoste. Els *indicadors químics indirectes*, es basen en la detecció de molècules associades amb descàrregues de femtes o a les activitats humanes.

1.2.1.1 *Indicadors químics directes*

a. Els esterols fecals

La matèria fecal conté una determinada composició d'esterols que dependrà de la dieta de l'individu, de la producció metabòlica d'esterols pel propi organisme i de la microbiota anaeròbia present al sistema digestiu. Els esterols presents a la matèria fecal són biohidrogenats per la microbiota corresponent a diferents isòmers d'estenols. S'ha descrit que en els humans el colesterol es redueix, principalment, a coprostenol. En els herbívors trobem, en canvi, majoritàriament, 24-etil coprostanol i 24-etil epicoprostanol (Leeming, R. et al, 1996). Per tant, s'ha postulat que els diferents isòmers d'esterols fecals poden ser utilitzats com a biomarcadors de l'origen de la contaminació fecal a

l'aigua. S'ha proposat els quocients de coprostanol:24-etil coprostanol i coprostanol:24-etil epicoprostanol com a indicadors de l'origen fecal de la contaminació. Quan aquests quocients són alts determinen una possible contaminació fecal humana (Leeming, R. et al, 1996). La detecció dels esterols fecals utilitza la tècnica de cromatografia de gasos d'alta resolució i l'espectrometria de masses.

Existeixen limitacions pel seu ús com a indicadors de MST com són: el seu elevat cost i la complexitat analítica. A més a més, cal afegir que aquestes molècules presenten una persistència molt curta en la columna d'aigua, essent d'una a dues setmanes (Seurinck, S. et al, 2005a). Tot i així, cal tenir en compte que són hidrofòbiques i que s'associen amb la matèria particulada de l'aigua residual precipitant en forma de sediments. Un cop dipositats, estaran sotmesos a condicions anòxiques i en aquest estadi la seva persistència augmenta, arribant fins a 450 dies a 15°C (Isobe, K.O. et al, 2002). S'ha detectat aigües on s'havia eliminat la població de coliformes mitjançant processos de cloració i tractament de calor i en canvi, la presència d'esterols fecals es mantenia elevada (Tabak, K.H. et al, 1972). La possible degradació en la columna d'aigua, la manca de correlació entre la presència de contaminació i de l'indicador, conjuntament amb una metodologia complexa i cara, limita la seva utilitat com a marcador de MST.

b. Cafeïna

La cafeïna és una molècula consumida exclusivament en la dieta d'humans. La cafeïna és absorbida per l'intestí, s'excreta a l'ambient per l'orina i va a parar a les aigües residuals urbanes (Sankararamakrishnan, N. et al, 2005). Ha estat detectada en aigües residuals i superficials, pel que s'ha definit com a potencial indicador de contaminació d'origen humà (Seiler, R.L. et al, 1999). Per a la seva detecció s'utilitza les tècniques de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC: High-performance liquid chromatography) i l'espectrometria de masses (Seiler, R.L. et al, 1999).

Els mètodes utilitzats per a la detecció de la cafeïna són cars i laboriosos. A més a més, es tracta d'un compost que és fàcilment degradable pels microorganismes del sòl i que per tant, pot no ser detectar tot i haver-hi contaminació fecal humana a l'aigua.

1.2.1.2 Indicadors químics indirectes

a. Agents blanquejants fluorescents

Els agents blanquejants fluorescents (FWA: Fluorescence Whitening Agent) són compostos incorporats als detergents per al blanqueig de la roba. Per tant, estan associats a abocaments d'aigües de neteja i són potencials indicadors de contaminació urbana (Close.M et al, 1989). Poden ser detectats fàcilment mitjançant fluorimetria (Close.M et al, 1989; Hartel, P.G. et al, 2007) o per HPLC (Hayashi, Y. et al, 2002).

Les baixes concentracions a les aigües, les possibles interferències amb compostos orgànics fluorescents, la inestabilitat amb la llum solar i els pocs estudis realitzats per a la seva detecció, limiten el seu ús com a agent químic indicador.

b. Trifosfat sòdic

El trifosfat sòdic (STP: sodium triphosphates) és el principal component dels detergents, i per tant també està relacionat amb abocaments urbans. Pot ser mesurat mitjançant cromatografia d'intercanvi iònic combinat amb tècniques colorimètriques (Cimenti, M. et al, 2007).

Aquesta molècula s'hidrolitza fàcilment a ortofosfat en aigües superficials i pot quedar adsorbida als sediments, de manera que la seva concentració es pot reduir significativament limitant el seu ús com a indicador de contaminació fecal (Sinton, L.W. et al, 1998).

c. Alquilbenzens de cadena llarga

Els alquilbenzens de cadena llarga (LABs: Linear Alkyl Benzene) són hidrocarburs sintètics. S'utilitzen per a la producció d'alquil benzens sulfonats lineals que són els surfactants aniònics més abundants en detergents. La seva detecció es pot dur a terme mitjançant l'extracció amb dissolvents orgànics seguit de cromatografia de gasos (Cimenti, M. et al, 2007; Murray, A.P. et al, 1987).

En general, els LABs són molècules estables en el temps però alguns són més fàcilment degradables pels microorganismes. Poden interaccionar amb substàncies húmiques com fenols, clorats i nitrats presents a l'aigua fet que pot prolongar la seva presència al medi. El que fa que la seva correlació amb una possible contaminació fecal a l'aigua sigui qüestionable (Seurinck, S. et al, 2005a). Es poden considerar indicadors

que complementen els esterols fecals com marcadors d'una possible contaminació fecal humana (Sinton, L.W. et al, 1998).

L'anàlisi d'indicadors químics implica un laboriós tractament de les mostres, filtracions, extraccions i/o una conversió abans de poder ser identificat el compost mitjançant tècniques llargues i costoses (fluorimetria, cromatografia, ...). Les molècules químiques poden ser alterades pels microorganismes ambientals i la sensibilitat de l'anàlisi pot estar afectada per molècules de l'ambient (Seurinck, S. et al, 2005a). Per tant, l'ús rutinari d'aquests tipus d'indicadors és limitat.

1.2.2. *Indicadors microbiològics*

Els indicadors microbiològics són aquells que detecten un microorganisme patogen o comensal que habitualment està relacionat amb la microbiota intestinal de l'ésser causant de la contaminació fecal. Els mètodes que s'utilitzen habitualment poden classificar-se dins les següents categories: mètodes dependents de base de dades, mètodes independents de base de dades, mètodes que precisen de cultiu i mètodes independents de cultiu.

Els mètodes dependents de base de dades de referència es basen en el cultiu, aïllament, tipificació i classificació segons la font, de soques de diferents orígens fecals i de mostres d'aigua. La determinació de l'origen de la contaminació es fa mitjançant la comparació estadística entre els aïllats ambientals i els perfils compresos a la base de dades generada a partir de la tipificació de soques d'origen conegut.

Els mètodes independents de base de dades es basen en la detecció a nivell de la mostra d'un microorganisme específic d'hoste mitjançant el seu cultiu o la detecció d'un marcador molecular d'aquest.

1.2.2.1 *Mètodes dependents de bases de dades*

Els mètodes dependents de bases de dades es poden classificar segons si els caràcters analitzats són fenotípics o genotípics.

Anàlisi de caràcters fenotípics:

a. Resistència a antibiòtics

La resistència a antibiòtics s'ha desenvolupat com a mètode per a determinar la contaminació fecal a l'aigua aprofitant que la microbiota de cada hoste desenvolupa resistències a aquells antibiòtics als quals és més habitualment exposada. L'ús de diferents antibiòtics en humans i en animals crea uns patrons de resistència diferents a la microbiota intestinal. Aquestes resistències, normalment es troben codificades en plasmidis que estaran sotmesos a una forta selecció, pèrdua o conjugació, segons l'ús d'antibiòtics en una determinada població. Així les resistències a antibiòtics observades en poblacions microbianes de l'intestí de porcíns seran diferents a la que s'observen en aus.

Aquest mètode es basa en l'obtenció prèvia de bases de dades de les resistències a antibiòtics que presenta un grup bacterià en funció dels diferents hostes on es troba. Posteriorment, aquesta base de dades de referència servirà per a classificar les soques aïllades. Existeixen principalment dos tipus diferents d'assajos: la *Resistència Múltiple a Antibiòtics* (MAR) és un anàlisi qualitatiu que consisteix en avaluar els microorganismes aïllats amb diferents antibiòtics; i l'*Anàlisi de Resistència a Antibiòtics* (ARA) que és quantitatiu ja que inclou diferents concentracions de cada antibiòtic a valorar.

S'han generat bases de dades d'aquest tipus per a *E. coli*, estreptococs fecals i coliforms fecals (Choi, S. et al, 2003; Hagedorn, C. et al, 1999; Parveen, S. et al, 1997; Wiggins, B.A., 1996). Aquest mètode és senzill i no demana material ni personal especialitzat. Però requereix la creació d'una base de dades de referència de soques cultivables, feina llarga i tediosa, que pot ser específica segons la zona geogràfica a testar i que pot presentar variacions temporals (Parveen, S. et al, 2006; Wiggins, B.A. et al, 2003).

b. Utilització de fonts de carboni

El fenotipatge de poblacions de coliforms fecals i d'enterococs també s'ha utilitzat per a la determinació de l'origen de la contaminació fecal. Aquesta metodologia compara diferències en la utilització de fonts de carboni (CSU: carbon source utilization) i nitrogen pels diferents bacteris aïllats mitjançant sistemes tradicionals o kits comercials miniaturitzats com el Biolog Sytem (Hagedorn, C. et al, 2003) o PhenePlate System (Wallis, J.L. et al, 2003). S'obtenen diferents perfils fenotípics per a cada aïllat segons els substrats metabolitzats que es comparen a la base de dades prèviament generada.

Aquest mètode és senzill i fàcil de dur a terme. Ara bé, a més a més de presentar els mateixos desavantatges que els altres mètodes fenotípics, s'ha vist que presenta poca capacitat d'identificació amb un percentatge de classificació correcta molt limitat (Field, K.G., 2005).

Anàlisi de caràcters genotípics:

Aquests mètodes es basen en l'anàlisi de característiques genòmiques (seqüències d'ADN o ARN) dels microorganismes aïllats. S'obtenen uns perfils que s'associen a un determinat origen de contaminació fecal i que són comparats amb la base de dades creada.

a. Amplificació múltiple

L'amplificació múltiple (rep-PCR: repetitive element PCR) consisteix en l'obtenció de perfils mitjançant l'amplificació per PCR de fragments específics i repetitius del genoma microbià, que són visualitzats mitjançant una posterior electroforesis. Els iniciadors utilitzats amplifiquen fragments flanquejats per zones conservades i repetides en la majoria de genomes microbians. Aquestes seqüències es troben normalment localitzades en regions no codificants al llarg de tot el genoma, poden estar orientades en qualsevol direcció i també en tàndem (Koeuth, T. et al, 1995; Lupski, J.R. et al, 1992; Versalovic, J. et al, 1991). Depenent de l'iniciador emprat s'anomenen: REP-PCR quan els iniciadors reconeixen elements palindròmics repetitius extragènics de 35-40 pb, ERIC-PCR quan amplifiquen seqüències repetitives intergèniques de consens d'enterobactèries de 124-127 pb i PCR-BOX quan amplifiquen una seqüència conservada anomenada Box d'unes 145 pb. El resultat és l'obtenció d'un perfil de bandes amplificades per a cada soca analitzada que es compara amb la base de dades de referència (Field, K.G., 2005). Perfils iguals representen la mateixa soca i perfils semblants són soques relacionades genèticament.

S'han utilitzat els iniciadors de BOXA1R, REP1R i REP2I per a crear perfils d'*E. coli* mitjançant la rep-PCR i ser utilitzats per a determinar l'origen de la contaminació fecal (Dombek, P.E. et al, 2000). Aquesta tècnica presenta variacions temporals i geogràfiques. El mètode té un cost elevat i l'obtenció de la base de dades és un procés llarg i laboriós. La reproduïbilitat de la tècnica ha estat qüestionada (Seurinck, S. et al, 2005b).

b. Anàlisi de polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb iniciadors arbitraris

L'anàlisi de polimorfismes en la longitud dels fragments amplificats per PCR amb iniciadors arbitraris (RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA) consisteix en l'amplificació mitjançant PCR de soques aïllades utilitzant iniciadors no selectius. S'utilitzen oligonucleòtids curts, d'uns 8 a 12 nucleòtids, creats arbitràriament. Els fragments obtinguts són amplificats a l'atzar segons el joc d'iniciadors utilitzats. L'ADN amplificat es analitza en un gel de manera que s'obté una sèrie de bandes específiques de la soca que s'utilitza com a perfil del genoma bacterià. Aquests perfils són els que es comparen amb les bases de dades creades. La RAPD s'ha utilitzat per a examinar la diversitat d'*E. coli* (Wang, G. et al, 1993).

c. Anàlisi de polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció amplificats (AFLP)

En la tècnica d'anàlisi de polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció amplificats (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) l'ADN genòmic és digerit amb dos enzims de restricció. Seguidament s'incorporen uns adaptadors al final dels fragments digerits, mitjançant una lligació, que aporten uns fragments suficientment llargs i de seqüència coneguda. Posteriorment, es fa una amplificació selectiva d'aquests fragments emprant com a iniciadors seqüències corresponents als adaptadors introduïts (Janssen, P. et al, 1996). Els fragments amplificats poden ser visualitzats en un gel de poliacrilamida o si els iniciadors estan marcats amb una molècula fluorescent mitjançant un seqüenciador automàtic.

Aquest mètode ha estat utilitzat en *E. coli* però s'obtenia un elevat nombre de bandes que limitava la seva utilitat (Arnold, C. et al, 1999). Per a pal·liar aquesta limitació es feia una reamplificació dels fragments amb jocs de primers als quals s'havia afegit 1 o 2 nucleòtids a l'extrem 3', de manera que es reduïa el nombre de dianes on unir-se.

La resolució que s'obté amb aquest mètode és millor que la obtinguda amb altres mètodes genotípics. S'ha comparat les tècniques d'AFLP, MAR i l'anàlisi de seqüències del gen del 16S rARN en soques d'*E. coli* aïllades de bestiar, animals salvatges i femtes humanes (Guan, S. et al, 2002). S'ha observat una molt més bona discriminació amb l'AFLP que amb les altres dues tècniques utilitzades. Un altre estudi comparant ERIC-PCR amb AFLP (Leung, K.T. et al, 2004) dona, també, millor resultat amb l'AFLP. Aquest mètode requereix de personal especialitzat, és laboriós, lent i car. A més a més, s'ha observat variacions geogràfiques i temporals que limiten la seva aplicació.

d. Electroforesi en gels de camp polsat

L'electroforesi en gels de camp polsat (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis) consisteix en la digestió, utilitzant un enzim de restricció de tall poc freqüent, de l'ADN genòmic total de la soca aïllada. El resultat de la digestió és l'obtenció de 10 a 30 fragments d'ADN massa grans per a poder ser analitzats mitjançant un gel d'agarosa. Per a l'anàlisi d'aquests fragments s'utilitza un gel de camp polsat, en el qual l'orientació del camp elèctric varia en diferents intervals i en diferents direccions. L'ADN es reorienta de manera que els fragments més petits van canviant més de pressa de direcció que els grans, i així s'aniran separant les bandes (Tenover, F.C. et al, 1995).

Aquesta tècnica s'ha aplicat utilitzant *E. coli* com a indicador (McLellan, S.L. et al, 2003) i en enterococs (Dicuonzo, G. et al, 2001), mostrant una major capacitat de discriminació que la REP-PCR i l'ERIC-PCR (McLellan, S.L. et al, 2003; Myoda, S.P. et al, 2003). És una tècnica que tot i no necessitar una PCR prèvia, és llarga i tediosa tenint en compte que ha de ser aplicada a cada soca aïllada.

e. Ribotipatge

La tècnica del ribotipatge dona patrons de bandes del gen del 16S ARNr. El procediment implica l'extracció i purificació de l'ADN dels microorganismes aïllats i posterior digestió del producte mitjançant determinats enzims de restricció. Els fragments amplificats són analitzats en un gel d'electroforesi, desnaturalitzats i transferits en una membrana sobre la qual s'hibridarà amb les sondes específiques. La imatge obtinguda servirà per classificar els aïllats segons la font de la contaminació (Cimenti, M. et al, 2007).

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per a determinar la contaminació d'origen humà i no-humà analitzant els ribotips d'*E. coli* (Carson, C.A. et al, 2001; Parveen, S. et al, 1999). Es va dur a terme un anàlisi per a intentar discernir entre boví, porcí i aus i no va tenir èxit (Scott, T.M. et al, 2003). També s'ha observat una variació geogràfica de les bases de dades (Hartel, P.G. et al, 2002; Parveen, S. et al, 1999). El ribotipatge és una tècnica llarga i costosa que requereix personal i material especialitzat.

L'estabilitat geogràfica i temporal d'aquestes bases de dades està en controvèrsia pel que sovint cal desenvolupar-ne de noves segons l'àrea geogràfica a examinar. La fiabilitat del mètode es veu afectada per la mida de la base de dades i el mètode d'anàlisi utilitzat (Stoeckel, D.M. et al, 2007). Aquests mètodes són normalment laboriosos i precisen d'un anàlisi elevat de mostres per tal de disposar d'un número de dades

suficientment representatiu. S'ha d'esmerçar esforç, material, temps i diners per a realitzar una base de dades de referència adequada. S'obtenen més bons resultats utilitzant l'anàlisi de caràcters genotípics que no pas fenotípics, però ambdós mostren un elevat número de falsos positius (Griffith, J.F. et al, 2003). A més a més, s'ha de disposar de les eines estadístiques o mètodes numèrics més adients per a una bona discriminació.

1.2.2.2 Mètodes independents de bases de dades i dependents de cultiu

a. Enterococs fecals

Una de les primeres aproximacions metodològiques per tal d'identificar la contaminació fecal a l'aigua fou el quocient entre coliformes fecals i enterococs (CF/EF) (Feachem, R.G., 1975; Geldreich, E.E. et al, 1969). Aquesta proporció es basa en l'existència d'una major abundància dels enterococs fecals en mostres fecals no humanes, i aquesta relació s'inverteix en mostres fecals humanes. Es va proposar que quan el quocient CF/EF és superior a 4, la contaminació es relaciona amb un possible origen humà, i quan és menor que 0'7 amb animals.

La diferent capacitat de supervivència en el medi dels dos grups bacterians qüestiona la seva validesa al donar-se un envelliment de la contaminació fecal (Jagals, P. et al, 1996). S'ha qüestionat per alguns autors la incapacitat de coliforms fecals i enterococs fecals de poder créixer en diferents ambients. Si es donés aquest creixement contribuiria a disminuir la fiabilitat d'aquesta aproximació metodològica (Sinton, L.W. et al, 1998).

b. *Bifidobacterium* spp.

Bifidobacterium spp. és un dels gèneres majoritaris a l'aparell digestiu d'humans i animals conjuntament amb els gèneres *Bacteroides*, *Eubacterium* i *Clostridium*. *Bifidobacterium* spp. és un gènere anaerobi i que necessita elevats requeriments nutricionals, factors que compliquen el seu aïllament i cultiu al laboratori. S'han descrit diferents medis selectius i procediments per a la seva recuperació, però són complexes i el seu cultiu requereix temps (Nebra, Y. et al, 1999). S'ha observat que algunes espècies de *Bifidobacterium* localitzades en el sistema digestiu d'humans, com *Bif. adolescentis* i *Bif. breve*, tenen la capacitat de fermentar el sorbitol, en contra del que s'observa en espècies característiques d'animals. El medi Human Bifidobacteria Sorbitol-fermenting Agar (HBSA) és selectiu per *Bifidobacterium* spp. i diferencial per les espècies

fermentadores de sorbitol pel que ens permet diferenciar les espècies potencialment específiques d'humans (Mara, D.D. et al, 1983).

La detecció de *Bifidobacterium* mitjançant el seu cultiu és fàcil i més o menys barat. No obstant, el fet que precisi d'elevats requeriment nutricionals, i condicions d'anaerobiosi dificulta la seva manipulació i cultiu al laboratori. Presenta una baixa persistència al medi ambient pel que la seva detecció indica la presència de contaminació fecal recent.

c. Fags de *Bacteroides* spp.

Bacteroides spp. és un dels gèneres anaerobis majoritaris a l'aparell digestiu humà. La seva fisiologia anaeròbia li comporta una baixa capacitat de supervivència en ambients aquàtics. Els bacteriòfags capaços d'infectar aquesta espècie tenen una major resistència a processos de desinfecció naturals i artificials i són incapaços de reproduir-se a l'ambient. Es va suggerir la detecció de bacteriòfags que infecten la soca *Bacteroides fragilis* HSP40 com a possible indicador de la contaminació fecal humana (Tartera, C. et al, 1987).

La ubicació geogràfica de la soca HSP40 es restringeix a la zona mediterrània, també s'ha detectat a Sud Àfrica, però no al Nord d'Europa ni als EUA (Payan, A. et al, 2005). S'ha proposat un mètode per aïllar soques de *Bacteroides* spp. específiques d'hoste susceptibles a ser infectades per fags a cada zona geogràfica d'interès. També s'ha suggerit la soca de *B. thetaiotaomicron* GA17 marcadora de contaminació fecal humana que presenta una més ampla distribució geogràfica (Payan, A. et al, 2005).

Per tant la disponibilitat de soques específiques d'un hoste esdevé necessari per poder utilitzar els bacteriòfags de *Bacteroides* com a marcadors específics de la contaminació fecal.

d. Genotips de bacteriòfags F- específics d'ARN

Els fags F-específics d'ARN són fags icosaèdrics que infecten específicament els coliformes a través dels pilis codificats pel plasmidi F. S'han classificat en 4 genotips atenent a varies propietats biològiques i físico-químiques (Furuse, K. et al, 1983). Els genotips II i III s'associen majoritàriament a orígens fecals humans i els genotips I i IV majoritàriament a animals (Havelaar, A.H. et al, 1986; Schaper, M. et al, 2002). Un cop detectats, la seva identificació pot realitzar-se mitjançant un serotipat (Cole, D. et al, 2003) o mitjançant una hibridació amb sondes específiques de cada grup que permeten

diferenciar de forma fàcil i relativament ràpida aquests genotips (Hsu, F.C. et al, 1995; Schaper, M. et al, 2000).

Els colifags F-RNA presenten un comportament semblant al dels virus entèrics en aigües ambientals, per tant poden ser utilitzats com a marcadors vírics de l'origen de la contaminació fecal. Diferències en la seva persistència fan variar les seves proporcions quan s'envelleix la contaminació fecal en l'aigua i per tant es veu modificada l'associació a un origen fecal determinat (Schaper, 2002).

e. *Rhodococcus coprophilus*

Rhodococcus coprophilus és un actinomicet que ha estat definit en femtes d'herbívors, i es troba absent en femtes humanes. Per tant, s'ha proposat aquest indicador com a possible traçador de contaminació fecal d'herbívors (Mara, D.D. et al, 1981; Oragui, J.I. et al, 1983). S'ha observat una supervivència d'aquets microorganisme en medi aquàtic d'entre 12 i 24 setmanes a una temperatura de 20°C, el que fa que es requereixi un altre indicador per tal de determinar una contaminació fecal recent (Sinton, L.W. et al, 1998).

El principal inconvenient de la utilització d'aquest marcadors és que el mètode de recuperació i enumeració és llarg i laboriós amb un temps d'incubació de 17-18 dies. A més a més, es desconeix la capacitat de resistència d'aquest microorganisme a processos de desinfecció.

f. Amplificació específica d'un gen

Aquest mètode combina la tècnica molecular de la PCR amb un cultiu previ de l'indicador, ja que normalment, aquest es troba a una baixa concentració i per tant caldrà un enriquiment previ per a poder ser detectat.

S'han proposat les diferents variants de toxines d'una *E. coli* enterotoxigènica com a marcadors de l'origen de la contaminació fecal en aigües. Les variants de l'enterotoxina termostable STIb i STII s'han associat amb contaminació fecal humana (Oshrio, R.K. et al, 1997) i de bestiar porcí respectivament (Khatib, L.A. et al, 2003), i l'enterotoxina termolàbil LTIIa s'ha associat a remugadors (Khatib, L.A. et al, 2002). Khatib i col·laboradors han definit iniciadors específics per a la detecció d'aquestes toxines indicadores mitjançant PCR. Per això, cal una concentració prèvia de la mostra que s'ha descrit mitjançant una filtració i incubació durant 1,5 hores a 35°C i a 44°C tota la nit o sotmetent l'extracte de la mostra o les colònies crescudes a una hibridació mitjançant sondes magnètiques que permeten la concentració i separació del gen de la toxina. Un cop

s'ha obtingut una suficient concentració d'ADN es duu a terme l'amplificació amb els iniciadors específics.

Un altre gen específic d'hoste que s'ha utilitzat com a marcador de contaminació fecal humana és el gen que codifica per una proteïna de superfície d'*Enterococcus faecium* (Scott, T.M. et al, 2005). S'ha postulat que la proteïna *esp* només és present en soques aïllades d'humans. Per tant la seva detecció mitjançant l'amplificació amb PCR usant iniciadors específics indicaria la presència de contaminació fecal humana. El gen *esp* es troba en un baix número d'aïllats, pel que cal fer una concentració mitjançant filtració, incubació durant 48h en medi *Enterococcus* Agar (mEA) i un enriquiment de 3h en TSB previ a la PCR.

Recentment s'ha qüestionat l'especificitat d'alguns d'aquests marcadors. S'ha detectat la proteïna *esp* d'*Ent. faecium* en algunes mostres de gossos, gavines, ratolí i d'ocells, tot i que en més baixa proporció que en humans (Seurinck, S. et al, 2005b). S'han obtingut resultats positius per la toxina LTIIa, associada a remugadors, en mostres de porcs i humans a Tailàndia (Withman, 2007), tot i així s'han definit aquests marcadors com temporalment i geogràficament estables. La seva distribució és molt esporàdica ja que tan sols un número petit d'aïllats porten la toxina (Field, K.G., 2005).

Aquests mètodes consten d'una part dependent de cultiu i d'una part d'anàlisi molecular, per tant precisen de temps per a fer créixer les soques i alhora necessiten les tècniques i material per al seu anàlisi. A més a més, el pretractament d'enriquiment de les mostres necessari per a la detecció dels gens fa que no siguin aplicables per a realitzar estudis quantitius.

Els mètodes de detecció de la contaminació fecal mitjançant tècniques independents de bases de dades i que precisen de cultiu són en general senzills i fàcils de dur a terme, fent-los assequibles per l'anàlisi rutinari. Aquests mètodes, però, es limiten al cultiu de certes espècies fàcilment cultivables. Molts patògens i la majoria de bacteris fecals són de difícil creixement. A més, les comunitats microbianes pateixen canvis de composició quan són cultivades, de manera que poden no reflectir la composició i l'abundància de l'ambient on s'han extret (Field, K.G., 2005).

1.2.2.3 Mètodes independents de bases de dades i de cultiu

Es calcula que tan sols d'un 0,1% a un 10% de les espècies bacterianes de diferents ambients han pogut ser cultivades (EPA, 2005; Staley, J.T. et al, 1985; Torsvik, V. et al, 2002). La microbiota intestinal de diferents hostes està més o menys ben caracteritzada

incloent la d'humans (Suau, A. et al, 1999), la de porcs (Leser, T.D. et al, 2002) i la de bovins (Ramsak, A. et al, 2000). Els mètodes independents de cultiu suggereixen que les poblacions bacterianes majoritàries a l'aparell digestiu són anaeròbiques i pertanyen al grup de Gram positius amb un contingut baix de G+C i al fílum Bacteroidetes (Eckburg, P.B. et al, 2005). Tanmateix aquests bacteris no són fàcilment cultivables al laboratori, cosa que ha limitat el seu ús com indicadors en el passat. Els bacteris més fàcilment cultivables com *E. coli* i *Enterococcus* spp. es troben en una menor concentració. Actualment, s'està desenvolupant un elevat nombre de mètodes genètics i kits per tal d'aïllar àcids nucleics d'organismes sense necessitat de cultivar-los. Un cop feta l'extracció, es poden utilitzar diferents mètodes per a la detecció d'ADN. La majoria de les tècniques classificades en aquest grup es basen en la utilització de la reacció en cadena de la polimerasa.

a. Detecció específica mitjançant PCR

La detecció específica de fragments d'ADN mitjançant PCR permet la utilització d'indicadors microbians de difícil o impossible cultiu al laboratori. La tècnica de la PCR és molt útil, sensible i ràpida i pot ser aplicada tant a organismes cultivables al laboratori com a mostres ambientals (EPA, 2005). L'avanç de les tècniques moleculars ha sufragat els problemes derivats del seu cultiu. Per tant, ja poden ser utilitzats com a indicadors les espècies anaeròbies predominants a l'aparell digestiu que abans eren problemàtiques com el gènere *Bifidobacterium* i *Bacteroides* o d'aquelles que precisen d'un temps d'incubació massa llarg per a ser viable com a iniciador, com seria el cas de *Rhodococcus coprophilus* (Bernhard, A.E. et al, 2000a; Bonjoch, X. et al, 2004; Savill, M.G. et al, 2001).

S'han desenvolupat diferents modificacions de la PCR que ens permeten la detecció simultània de més d'una diana d'ADN (*PCR múltiple*), l'increment de la sensibilitat de la tècnica mitjançant una doble amplificació consecutiva (*PCR niuada*) o la quantificació de la concentració d'ADN inicial (*PCR a temps real* o *PCR quantitativa* (PCR-Q)) (Bonjoch, X. et al, 2004; Martellini, A. et al, 2005; McQuaig, S.M. et al, 2006)

També s'han dissenyat PCRs específiques aplicades a MST per a la detecció de:

- *Bifidobacterium* spp. La detecció de *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium* mitjançant una PCR multiplex (Bonjoch, X. et al, 2004). indica un possible origen humà de la contaminació fecal. També s'ha dissenyat una hibridació sobre el producte amplificat amb iniciadors específics del gènere *Bifidobacterium* utilitzant una sonda específica de *Bif. adolescentis* (Lynch, P.A. et al, 2002; Langedijk, P.S. et al, 1995) i de *Bif. dentium* per tal d'associar la mostra a un origen humà (Nebra,

Y. et al, 2003). També s'ha utilitzat la PCR-Q per a detectar específicament *Bif. longum*, *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium* (Matsuki, T. et al, 2004).

- *Bacteroides* spp. S'han desenvolupat iniciadors i sondes específiques d'espècie per a la detecció mitjançant PCR i posterior hibridació d'algunes espècies indicadores de contaminació fecal humana com: *B. distasonis*, *B. thetaiotamicron* i *B. vulgatus* (Kreader, C.A., 1995). S'ha definit, també, iniciadors específics per a detectar mitjançant PCR marcadors genètics no cultivats de contaminació fecal humana, de remugadors (Bernhard, A.E. et al, 2000b), de porc i de cavall (Dick, L.K. et al, 2005). Més recentment, també s'ha dissenyat diferents PCR-Q per a la detecció d'espècies de *Bacteroides* (Dick, L.K. et al, 2004), *Bacteroides* específics d'humans (Reischer, G.H. et al, 2007; Seurinck, S. et al, 2005a), específics de bestiar boví (Layton, A. et al, 2006; Shanks, O.C. et al, 2008) i de porcs (Okabe, S. et al, 2007a).

Els inconvenients que suposava la detecció de *Bacteroides* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal amb tècniques de cultiu es veuen salvats amb les metodologies moleculars. Tot i així, encara es coneix poc la dinàmica de *Bacteroides* en el medi ambient com la seva supervivència, la capacitat de resistència a tractaments de depuració, etc.

- *Rhodococcus coprophilus*. S'ha dissenyat iniciadors específics per a l'amplificació de *R. coprophilus* mitjançant PCR i PCR-Q (Savill, M.G. et al, 2001). Això ha permès reduir el temps que necessitava la seva detecció amb tècniques de cultiu que s'ha reduït de 18 a 2-3 dies. Aquest microorganisme s'ha detectat en vaca, ovella, cavall i cérvol. Per tant, indicarà si la contaminació és deguda a un herbívor o a un no herbívor. La seva elevada persistència al medi ambient fa que es precisi d'un altre indicador per tal d'indicar una contaminació més recent de l'aigua (Savill, M.G. et al, 2001).
- *ADN mitocondrial*. La diana d'aquest mètode de MST no és pròpiament un microorganisme, si no un gen mitocondrial de l'individu causant de la contaminació. Les cèl·lules epitelials de l'aparell digestiu tenen una taxa de renovació bastant alta. Les cèl·lules senescents són excretades juntament amb les femtes pel que la detecció de l'ADN mitocondrial d'aquestes pot ser utilitzat com a marcador de l'origen de la contaminació fecal. S'ha dissenyat varies PCRs niuades i una PCR múltiple per tal de poder detectar contaminació fecal humana, porcina, bovina i ovina (Martellini, A. et al, 2005). Recentment, s'ha dissenyat una PCR-Q múltiple per a detectar a la vegada contaminació fecal

humana, de bestiar boví i de porcí (Caldwell, J.M. et al, 2007). Aquesta tècnica presenta una elevada sensibilitat; tant, que s'ha detectat ADN mitocondrial de bovins en dos humans que havien consumit carn bovina 24 h abans, tot i que en un més baix ordre de magnitud.

- *Indicadors moleculars vírics.* La contaminació fecal de les aigües també implica una aportació de virus patògens als ecosistemes. Així que s'han definit indicadors moleculars vírics per tal d'avaluar l'existència de virus. Alguns d'aquests indicadors vírics s'han postulat també com a potencials indicadors de l'origen de la contaminació fecal. Habitualment s'utilitza la tècnica d'amplificació mitjançant PCR amb iniciadors específics per a la detecció d'adenovirus humans (Pina, S. et al, 1998), de porcins i de bovins (Maluquer de, M.C. et al, 2004), enterovirus humans (Tsai, Y.L. et al, 1993), enterovirus bovins (Ley, V. et al, 2002) i tescovirus porcins (Jimenez-Clavero, M.A. et al, 2003). S'han desenvolupat mètodes utilitzant la PCR-Q per a la detecció de poliomavirus humans (McQuaig, S.M. et al, 2006). Ara bé, la concentració de virus a l'aigua és baixa pel que es requereix habitualment del tractament d'un elevat volum de mostra i/o un pas de concentració. L'anàlisi de marcadors de MST vírics ha donat un important número de falsos negatius que poden ser deguts a la concentració de substàncies inhibidores de la PCR que interfereixen en la seva detecció (Griffith, J.F. et al, 2003). A més a més, la seva presència a l'aigua depen de la incidència i afectació per infeccions víriques de les poblacions causants de la contaminació fecal.

La majoria de mètodes que precisen l'amplificació mitjançant PCR presenten algunes limitacions. La baixa eficiència dels mètodes d'extracció d'àcids nucleics i l'amplificació esbiaixada degut a conformacions que poden agafar els iniciadors o l'ADN poden produir desviacions i inhibicions.

A la Taula 1.3 es mostra una relació d'alguns dels mètodes utilitzats en el MST amb les seves característiques i el material requerit.

Taula 1.3 Mètodes utilitzats en l'anàlisi dels indicadors de MST (Adaptació de Microbial Source Tracking guide (EPA, 2005))

Mètode	Indicadors	Cultiu	Base de dades	Equips especials	Material específic	Temps requerit
Resistència a Antibiòtics	<i>E. coli</i> Estreptococs fecals <i>Enterococcus</i> spp.	Aïllament de soques	Si	Cap	Antibiòtics Microplaques de 96 pouets	4-5 dies
Ús de fonts de Carboni	<i>E. coli</i> Estreptococs fecals <i>Enterococcus</i> spp.	Aïllament de soques	Si	Cap Lector de plaques (opcional)	Microplaques amb substrat (Biolog, PhenePlate)	2-5 dies
Rep-PCR	<i>E. coli</i>	Aïllament de soques	Si	Termociclador Unitat d'electroforesis	Reactius i fungible per a la PCR Gel d'electroforesi	1 dia
RAPD	<i>E. coli</i>	Aïllament de soques	Si	Termociclador Unitat d'electroforesis	Reactius i fungible per a la PCR Gel d'electroforesi	1 dia
AFLP	<i>E. coli</i>	Aïllament de soques	Si	Termociclador Seqüenciador automàtic	Kit d'extracció d'ADN Kit d'AFLP	5 dies
PFGE	<i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> spp.	Aïllament de soques	Si	Unitat d'electroforesis de gel de camp polsat	Enzims de restricció Gel d'electroforesis	2-4 dies
Ribotipatge	<i>E. coli</i> Estreptococs fecals <i>Enterococcus</i> spp.	Aïllament de soques	Si	Unitat d'electroforesis Forn d'hibridació	Reactius de purificació d'ADN Enzims de restricció Gel d'electroforesi Solucions d'hibridació i detecció Sonda marcada	1-3 dies

Creixement en medi selectiu	<i>Bifidobacterium</i> <i>Enterococcus</i> Fags de <i>Bacteroides</i>	Cultiu de la mostra	No	Cap	Medis de cultiu selectiu	1-2 dies
Serotipat o Genotipat de fags	F + colifags	Aïllament de fags	No	Forn d'hibridació (no cal en el serotipat)	Solucions d'hibridació i detecció Sonda marcada o antigen específic del fag	1-3 dies
PCR específica de gen	Gens de la toxina d' <i>E. coli</i> Gen esp d' <i>E. faecium</i>	Enriquiment de la mostra	No	Termociclador Unitat d'electroforesis	Reactius i fungible per a la PCR	2 dies
PCR específica d'hoste	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Rhodococcus</i> ADN mitocondrial Enterovirus Adenovirus	Cap	No	Termociclador Unitat d'electroforesis	Unitat de filtració Reactius i fungible per a la PCR	6-8 hores
Q-PCR	<i>Bacteroides</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Bifidobacterium</i> Poliomavirus	Cap	No	Termociclador fluoerescent	Unitat de filtració Reactius i fungible per a la PCR	1-3 hores

b. Anàlisi de comunitats

S'ha proposat l'estudi de les comunitats microbianes de l'aigua residual de diferents orígens per a crear perfils típics de la font causant de la contaminació i poder ser utilitzats per a determinar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua. Aquest mètode es basa en l'estudi de la mida de l'ADN amplificat o de la seva composició gènica. En ecologia microbiana s'utilitza l'anàlisi del gen de 16S del ARN ribosòmic (ARNr) per a l'anàlisi de comunitats. El gen del 16S ARNr està constituït per unes 1500 pb prou diferents per a poder discriminar entre espècies, però suficientment conservades per a poder classificar-les i fer estudis filogenètics entre elles. Les seqüències del 16S ARNr es van acumulant en les bases de dades públiques com el Ribosoma Data Project (RDP) o el National Center for Biotechnological Information (NCBI) de manera que són a disposició del públic per a poder ser utilitzades. Actualment la majoria d'espècies poden ser classificables fins al nivell d'espècie basant-se amb la seqüència d'aquest gen. Utilitzant aquest gen s'ha analitzat comunitats microbianes de diferents ambients com del sòl, del mar, de l'aparell digestiu, etc (Zoetendal, E.G. et al, 2004).

Algunes tècniques utilitzades per a l'estudi de les comunitats són l'anàlisi mitjançant LH-PCR (length heterogeneity PCR) i l'anàlisi terminal de polimorfismes en longitud de fragments de restricció (T-RFLP: terminal restriction fragment length polymorphism). Aquestes tècniques es basen en l'anàlisi de la mida de fragments amplificats del 16S ARNr, digerits o no. D'altres tècniques són l'anàlisi de fragments per electroforesis en gels de gradient desnaturalitzant (DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) o electroforesis en gels de gradient de temperatura (TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis), que es basen en l'anàlisi de la composició genòmica dels fragments analitzats.

- LH-PCR i T-RFLP: Aquestes tècniques es basen en l'amplificació del 16S ARNr mitjançant iniciadors, un o els dos, marcats amb un compost fluorescent que permet la seva detecció amb l'ús d'un seqüenciador automàtic. Amb la LH-PCR s'analitza l'amplificat directament, i en la T-RFLP hi ha una digestió prèvia de l'amplificat amb enzims de restricció. Es detecten els fragments marcats i s'obté un perfil electroforètic format per bandes de diferents mides que dependrà de la composició microbiana de la comunitat. S'han utilitzat ambdós tècniques per a obtenir perfils típics de les comunitats presents a l'aigua contaminada per humans i remugadors (Bernhard, A.E. et al, 2000a). Es van utilitzar iniciadors específics del grup Bacteroidetes i

Bifidobacterium, d'aquesta manera s'obté un número més baix i més manejable de bandes que les obtingudes amb iniciadors més generals.

- DGGE i TGGE: Aquestes tècniques es basen en la detecció de diferències en la composició d'ADN dels fragments amplificats. Es sotmet l'ADN a una electroforesis en un gel d'acrilamida al que s'aplica un gradient creixent desnaturalitzant. Aquest gradient pot estar constituït per substàncies químiques que desnaturalitzen el material genètic, com la urea i la formamida (DGGE) o per temperatura (TGGE) (Muyzer, G. et al, 1998). A mesura que els amplificats van avançant es van creant dominis de desnaturalització que produeixen diferències de migració entre fragments. La creació d'aquests dominis de desnaturalització dependrà de la composició de la seqüència, per tant, diferents seqüències es posicionaran a diferent lloc creant perfils de bandes diferents. Recentment, s'ha aplicat la DGGE per a detectar l'origen de la contaminació fecal analitzant l'espai intragènic del 16S-23S d'*E. coli* i s'ha observat diferències entre els perfils humans i els perfils animals (D'Elia, T.V. et al, 2007).

Aquests mètodes resulten molt útils a l'hora d'estudiar una comunitat microbiana. Són més o menys ràpids, però tenen un cost elevat i precisen de material i personal especialitzat. Alguns estudis que comparen aquestes tècniques mostren que s'obtenen resultats similars (Smalla, K. et al, 2007), però cada tècnica presenta les seves limitacions i avantatges.

Per tal de dur a terme la identificació genètica de les espècies que conformen el perfil de LH-PCR i T-RFLP caldrà crear una biblioteca de clons que s'haurà de sotmetre a aquestes mateixes tècniques per saber quin clon es responsable de cada banda i un cop sabuda, obtenir la seqüència del clon (Vaughan, E.E. et al, 2000). En canvi les bandes dels gels de DGGE i TGGE són més fàcilment caracteritzables. Una vegada escindides es poden seqüenciar directament; tot i que en alguns casos s'han de clonar prèviament (Muyzer, G. et al, 1996). La tècnica de T-RFLP presenta una major reproduccibilitat i pot automatitzar-se més fàcilment. En canvi, la DGGE pot presentar variacions entre gels. La DGGE i la TGGE permeten l'anàlisi de com a màxim 500 pb. Per tant, el patró obtingut dependrà de la zona analitzada. La T-RFLP dependrà de l'enzim utilitzat i de que la digestió s'hagi completat adequadament. Les quatre tècniques poden presentar les desviacions i limitacions típiques de les metodologies que es basen en l'extracció i amplificació del material genètic.

1.3 Els gèneres *Bifidobacterium* i *Bacteroides* com a indicadors de l'origen de la contaminació fecal

Els indicadors microbians de contaminació fecal han d'estar relacionats amb la presència del patògen i per tant amb les femtes i la microbiota intestinal. A la vegada, la capacitat de poder determinar l'origen de la contaminació depèn de l'exclusivitat de les espècies de la microbiota cada hoste. Els gèneres *Bifidobacterium* i *Bacteroides* representen un paper important en la microbiota d'humans i altres animals i a la vegada han mostrat una diferent representació de les seves espècies en funció de cada hoste. Per tant són bon candidats per ser utilitzats com a marcadors de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua.

1.3.1 Abundància a la microbiota intestinal d'humans i animals

El colon humà conté la major població bacteriana que habita en l'organisme amb un nombre que arriba a 10^{11} - 10^{12} organismes per gram de pes humit. Es reparteixen en un total de 300 a 500 espècies diferents, la majoria de les quals són anaeròbies (Guarenr, G.R. et al, 2003). La majoria dels microorganismes mantenen una relació mutualista amb l'individu aportant beneficis per a l'organisme hoste. La microbiota intestinal pot actuar directament evitant l'establiment de microbiota externa protegint les cèl·lules epitelials, ajudant a digerir carbohidrats convertint-los en molècules més fàcilment absorbibles pels enteròcits (Wexler, H.M., 2007) i sintetitzant vitamines com la biotina i la vitamina K (Zocco, M.A. et al, 2007). De manera indirecta actuen modulant l'expressió de varis gens de l'hoste relacionats amb l'absorció de nutrients, la fortificació de la barrera mucosa i la producció de factors angiogènics (Hooper, L.V. et al, 2003). També estimulen la formació i desenvolupament del sistema immune en els recent nascuts (Eckburg, P.B. et al, 2005; Zocco, M.A. et al, 2007).

La microbiota intestinal comença la colonització de l'aparell digestiu en el moment del part quan la mare inocula el nadó amb microorganismes del canal del part i posteriorment, amb la lactància. La fase de lactància condicionarà d'entrada la microbiota intestinal en l'adult ja que hi haurà variacions de la microbiota segons si s'alimenten amb llet materna o llet artificial (Harmsen, H.J. et al, 2000). En nadons alimentats amb llet materna predomina el gènere *Bifidobacterium* amb un 91% de les espècies presents; en canvi en nadons alimentats amb llet artificial hi haurà una més gran varietat formada per enterobacteriàcies, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Clostridium*. Després del període de lactància es constitueix la

microbiota que es mantindrà més o menys estable durant tota l'edat adulta. Estarà formada bàsicament d'espècies del gènere *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus* i *Peptostreptococcus* (Matsuki, T. et al, 2002).

Estudis realitzats utilitzant tècniques moleculars mostren que del 60 al 80% dels microorganismes que formen part de la microbiota no han estat cultivats encara (Eckburg, P.B. et al, 2005; Suau, A. et al, 1999; Wang, G.C. et al, 1995). Això ha fet que l'estudi de la microbiota de l'aparell digestiu mitjançant tècniques que precisen el cultiu quedessin limitades. Les noves tècniques moleculars permeten complementar els estudis de comunitats microbianes analitzant principalment el gen del 16S ARNr. Destaquen entre aquestes tècniques: la DGGE, TGGE, LH-PCR i la RFLP i que permeten conèixer la biodiversitat de la comunitat bacteriana de l'aparell digestiu.

L'ús d'aquestes tècniques ha portat a un millor coneixement de la composició de la microbiota, la seva estabilitat en el temps, la comparació entre individus, la determinació dels factors que els afecten, etc. Estudis analitzant la composició de *Bifidobacterium* de les femtes d'humans adults mitjançant la DGGE mostren que les diferències entre individus són majors que les que hi pot haver dins del mateix subjecte (Satokari, R.M. et al, 2001a). Aquesta variació es veu afectada per l'edat, la dieta, l'estat de salut i les interaccions d'adhesió de la microbiota amb la barrera mucosa (Dethlefsen, L. et al, 2006).

L'anàlisi de l'estabilitat temporal de la microbiota mitjançant la DGGE mostra que algunes poblacions autòctones de la microbiota com espècies del gènere *Bacteroides* i *Bifidobacterium* es mantenen més o menys estables en el temps (Vanhoutte, T. et al, 2004). En canvi, espècies del grup *Lactobacillus* presenten variacions temporals. L'anàlisi de poblacions d'*E. coli*, ha mostrat que només el 33% dels aïllats són residents habituals de la microbiota, la resta són soques viatgeres que s'hi troben de forma temporal (Jenkins, M.B. et al, 2003). Zoetendal i col·laboradors també van utilitzar la DGGE per observar diferències entre la presència, més o menys homogènia, del grup *Lactobacillus* en diferents parts de l'intestí, i en les femtes, on variava significativament la composició (Zoetendal, E.G. et al, 2004). D'altres autors han utilitzat la tècnica de T-RFLP per analitzar la composició de la microbiota intestinal humana (Hayashi, H. et al, 2003; Nagashima, K. et al, 2003).

La microbiota intestinal d'animals no està de bon tros tan estudiada i caracteritzada a nivell global com en els humans, però també hi ha estudis que s'han encarregat d'analitzar-la. Es coneix que la microbiota intestinal de porcíns durant la

primera setmana de vida està dominada pels gèneres *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Un estudi mitjançant l'anàlisi de seqüències del gen del 16S ARNr ha mostrat que aquestes poblacions són substituïdes ràpidament per poblacions anaeròbies estrictes (Leser, T.D. et al, 2002). En els porcs adults trobem principalment els gèneres *Bacteroides*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Cap de les espècies de *Bacteroides* que van ser seqüenciades presentaven una homologia superior al 97% amb les bacteries conegudes, el que suggereix que moltes de les espècies que constitueixen la microbiota intestinal de porcs no han estat, encara, cultivades ni identificades. S'ha utilitzat la tècnica de la DGGE per a observar canvis en la microbiota intestinal segons l'edat, la dieta i el compartiment anatòmic de l'aparell digestiu (Simpson, J.M. et al, 2000; Simpson, J.M. et al, 1999). També s'ha utilitzat la tècnica de T-RFLP per a estudiar les variacions de la microbiota segons les dietes administrades, l'edat, les diferents parts de l'aparell digestiu i l'estat de salut (Castillo Gómez, M.S., 2006; Leser, T.D. et al, 2002).

Diferents autors han caracteritzat la microbiota del rumen mitjançant PCR i seqüenciació de biblioteques de clons creades a partir del rumen de vaques (Tajima, K. et al, 1999; Whitford, M.F. et al, 1998). S'han identificat principalment dos grups majoritaris: Gram positius amb un baix contingut de G+C, relacionats amb *Clostridium* spp. (del 55 al 61,9% dels clons) i membres del grup *Bacteroides-Prevotella* (del 30 al 32,1%); en menor quantitat espiroquetes i proteobacteries. La tècnica de la DGGE també s'ha utilitzat per a analitzar variacions de la microbiota del rumen segons el tipus de dieta administrada (Kocherginskaya, S.A. et al, 2001).

La microbiota intestinal de pollastres, també ha estat analitzada mitjançant les tècniques de la DGGE i PCR-Q (van der Wielen, P.W. et al, 2002; Gong, J. et al, 2008). Aquests estudis mostren variacions de bandes de DGGE en funció de l'edat, la zona de l'aparell digestiu, però cap dels estudis ha arribat a profunditzar en l'anàlisi de les espècies.

1.3.2 Indicadors de contaminació fecal

Ja a la dècada dels anys 80 els gèneres *Bacteroides* (Allsop, K. et al, 1985; Fiksdal, L. et al, 1985) i *Bifidobacterium* (Resnick, I.G. et al, 1981) van ser proposats com a possibles indicadors, però la limitació del seu maneig al laboratori i la facilitat d'analitzar els indicadors tradicionals de contaminació fecal en va frenar les expectatives. La utilització d'*E. coli*, coliforms i enterococs com a indicadors s'ha

mostrat molt efectiva en el control microbiològic de la qualitat de les aigües, però l'avanç de les tècniques moleculars ha confirmat que no són les espècies majoritàries a l'aparell digestiu. Aquests indicadors permeten quantificar la càrrega de la contaminació però no permeten la identificació de l'origen de la contaminació. Per tant, l'ús com a possibles indicadors d'aquests gèneres més abundants i que semblen estar molt associats a l'hoste ha anat prenent pes en el si de la comunitat científica en els últims anys; principalment per a la seva aplicació en MST.

1.3.2.1 *Bifidobacterium* com a microorganisme indicador de la contaminació fecal

Bifidobacterium spp. és un dels gèneres majoritaris en la microbiota autòctona de l'intestí humà i altres animals de sang calenta amb un número de 10^9 - 10^{10} cèl·lules per gram de femta (Chevalier, P. et al, 1991). Les principals característiques del gènere *Bifidobacterium* es mostren al Panell 1. La seva fisiologia anaeròbia, juntament amb elevats requeriment nutricionals i dificultat per a multiplicar-se per sota de 30°C, fan que les espècies de *Bifidobacterium* spp. no puguin replicar-se a nivell extraentèric (Sinton, L.W. et al, 1998). Això, ha permès una possible coevolució de la microbiota intestinal amb el seu hoste i que algunes de les espècies siguin exclusives.

Existeix una bona adaptació dels bifidobacteris en els diferents hàbitats on s'han descrit. *Bif. infantis* i *Bif. breve* habiten principalment en l'aparell digestiu d'infants; mentre que *Bif. adolescentis*, *Bif. bifidum*, *Bif. catenulatum*, *Bif. angulatum*, *Bif. longum* i *Bif. dentium* es troben en els adults. Altres espècies s'han relacionat amb la microbiota intestinal d'animals com: *Bif. choerinum* i *Bif. thermophilum*, relacionades amb porcs; *Bif. merycicum* i *Bif. ruminantium* relacionades amb bestiar boví; i *Bif. pullorum* i *Bif. gallinarum*, que s'han descrit en pollastres. A la Taula 1.4 s'observa una relació de les espècies de *Bifidobacterium* descrites i els seus possibles hàbitats. Aquesta especiació ha portat a postular *Bifidobacterium* com a possible traçador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Mara, D.D. et al, 1983).

Una limitació a l'hora d'aplicar aquest gènere a nivell rutinari com a indicador de la contaminació fecal és la manca d'una metodologia de treball ràpida i senzilla que permeti obtenir resultats fiables en poc temps. Les mateixes característiques que han permès una coevolució de *Bifidobacterium* spp. amb l'hoste: microorganisme anaerobi, de creixement lent i amb una fisiologia complexa, fan que requereixi unes condicions de treball adequades amb medis de cultiu complexos i amb elevats requeriment nutricionals. El gènere està compost per una gran diversitat d'espècies amb diferents característiques fisiològiques i està poc descrit i estudiat taxonòmicament cosa que

complica un anàlisi de tot el grup. Els mètodes de cultiu que utilitzen agents selectius per a la detecció de *Bifidobacterium* no són suficients per a eliminar la flora acompanyant i poden afectar el creixement dels mateixos bifidobacteris en les mostres analitzades (Beerens, H., 1998).

S'han descrit diversos medis selectius i diferencials per a la detecció i l'enumeració de *Bifidobacterium* spp. mitjançant el recompte en placa: l'HBSA (Mara, D.D. et al, 1983), *Bifidobacterium* iodoacetat medium 25 (Muñoa, F.J. et al, 1988), *Bifidobacterium* Medium (BFM) (Nebra, Y. et al, 1999) entre d'altres. Els mètodes d'enumeració en un medi selectiu i diferencial seguit d'identificació dels aïllats precisen temps, presenten una baixa selectivitat i inhibició recíproca (Fasoli, S. et al, 2003). Per tal de pal·liar aquests inconvenients, s'estan desenvolupant més tecnologies moleculars per a la seva detecció, identificació i enumeració. Aquest interès creixent també ha estat motivat per l'ús dels bifidobacteris en aliments funcionals o com a probiòtics.

L'interès industrial en l'ús de soques bacterianes com a additius alimentaris en productes de consum diari ha anat incrementant progressivament (Leahy, S.C. et al, 2005). Els principals gèneres utilitzats com a probiòtics són *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. El seu ús requereix de mètodes del control de la qualitat d'aquests productes i mètodes específics per a la identificació de les soques que els conformen (Charteris, W.P. et al, 1997). Això ha estimulat l'interès sobre aquest microorganisme i ha fet que recentment hagin aparegut diverses metodologies moleculars per a la identificació de les espècies de *Bifidobacterium* (Fasoli, S. et al, 2003).

L'estudi de la diversitat mitjançant aquestes tècniques revela un número de soques desconegut fins ara i ajuda a entendre la composició microbiana de l'aparell digestiu. Aquests resultats mostren que les cèl·lules cultivables són només una fracció del total i no representen la diversitat d'un hàbitat (Suau, A. et al, 1999).

Panell 1**Característiques del gènere *Bifidobacterium***

El gènere *Bifidobacterium* pertany al fílum dels Actinobacteris i comparteix la família de les Bifidobacteriàcies juntament amb els gèneres *Gardnerella*, *Scardovia* i *Parascardovia*. El gènere *Bifidobacterium* conté actualment unes 30 espècies mentre que els altres gèneres estan formats per una sola espècie.

Són bacils Gram positius, no mòbils, no esporulats i catalasa negatius (excepte *Bif. indicum* i *Bif. asteroides*). Segons la composició del medi presenten en alguns casos les morfologies bifurcades característiques, en forma de Y o de V. Són anaerobis estrictes, però algunes soques poden tolerar l'oxigen.

Són microorganismes amb un elevat contingut de G+C que varia de 55-67%. (Biavati, B. et al, 2006). S'ha seqüenciat el genoma de *Bif. longum*, *Bif. adolescentis*, *Bif. breve* i *Bif. dentium*. La mida del genoma d'aquestes espècies és entre 2 i 2'6 Mb i el número d'operons de l'ARNr va de 2 còpies a *Bif. breve* a 5 en *Bif. adolescentis*.

La temperatura òptima de creixement es troba entre 37 i 41°C. No hi ha creixement per sota dels 20°C ni per sobre dels 46°C, amb excepció de *Bif. thermacidophilum* que pot créixer fins a 49'5°C (Dong, X.Z. et al, 2000). Sembla que existeixi una relació entre la temperatura de creixement i el seu l'hàbitat. S'ha observat que les soques que habiten l'aparell digestiu humà poden créixer entre 26 i 38°C. En el cas de les soques animals l'òptim es troba a 45°C. Les bifidobactèries són organismes àcid-tolerants, amb un òptim de creixement entre 6,5 i 7. No hi ha creixement per sota d'un pH de 4,5 ni per sobre de 8,5. Amb l'única excepció de *Bif. thermacidophilum* que pot créixer a un pH de 4 (Dong, X.Z. et al, 2000).

Les bifidobactèries presenten una ruta de fermentació d'hexoses característica i exclusiva que s'ha descrit tan sols a *Gardnerella vaginalis* (Gavini, F. et al, 1996), que s'agrupa dins de la mateixa família. No tenen els enzims aldolasa ni la glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, al seu lloc presenten l'enzim fructosa-6-fosfat fosfocetolasa (Scardovi, V. et al, 1965). Aquest enzim trenca l'hexosa-6-fosfat a acetil fosfat i a eritrosa-4-fosfat. El resultat d'aquesta ruta metabòlica serà l'obtenció d'àcid acètic i làctic en una proporció teòrica de 3:2.

Taula 1.4 Espècies de *Bifidobacterium* spp. i hàbitats on han estat descrites (Adaptada de Annals of Microbiology (Biavati, B. et al, 2000)).

Espècie	Hàbitat	Origen
<i>Bif. adolescentis</i>	Femtes d'humans adults, rumen boví; vagina	Reuter, 1963
<i>Bif. angulatum</i>	Femtes d'humans adults	Scardovi i Crociani, 1974
<i>Bif. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	Femtes de rata, pollastre, conill, vedell i cobai	Scardovi i Trovatelli, 1974
<i>Bif. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	Llet fermentada	Masco et al, 2004
<i>Bif. asteroides</i>	Intestí d' <i>Apis mellifera</i>	Scardovi i Trovatelli, 1969
<i>Bif. bifidum</i>	Femtes d'humans adults, infants i vedells lactants; vagina	Orla-Jensen, 1924
<i>Bif. boum</i>	Rumen boví, femtes de garrí	Scardovi et al, 1979
<i>Bif. breve</i>	Femtes d'infants, vedells lactants, vagina	Reuter, 1963
<i>Bif. catenulatum</i>	Femtes d'infants i adults humans; vagina	Scardovi i Crociani, 1974
<i>Bif. choerinum</i>	Femtes de garrí	Scardovi et al, 1979
<i>Bif. coryneforme</i>	Intestí d' <i>Apis mellifera</i>	Biavati et al, 1982
<i>Bif. crudilactis</i>	Llet i formatge	Delcenserie, 2007
<i>Bif. cuniculi</i>	Femtes de conill	Scardovi et al, 1979
<i>Bif. dentium</i>	Caries dental humana i cavitat oral; femtes d'humans adults	Scardovi i Crociani, 1974
<i>Bif. gallicum</i>	Femtes humanes	Lauer, 1990
<i>Bif. gallinarum</i>	Cec i femtes de pollastre	Watabe et al, 1993
<i>Bif. indicum</i>	Intestí d' <i>Apis cerana</i> i <i>A. dorsata</i>	Scardovi i Trovatelli 1969
<i>Bif. infantis</i>	Femtes d'infants i de vedells lactants; vagina	Reuter, 1963
<i>Bif. longum</i>	Femtes d'humans adults, infants, garrí i vedells lactants;	Reuter, 1963
<i>Bif. magnum</i>	Femtes de conill	Scardovi i Zani, 1974
<i>Bif. merycicum</i>	Rumen	Biavati i Mattarelli, 1991
<i>Bif. minimum</i>	Aigua residual	Biavati, 1982
<i>Bif. pseudocatenulatum</i>	Femtes d'infants i vedells lactants	Scardovi et al, 1979
<i>Bif. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	Femtes de porc, vedells lactants, rata, conill i corder; rumen	Yaeshima, 1992
<i>Bif. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	Femtes de porc, pollastre, bou, vedell, rata i cobai; rumen	Mitsuoka 1969
<i>Bif. psychraerophilum</i>	Cec porcí	Simpson, 2004
<i>Bif. pullorum</i>	Femtes de pollastre	Trovatelli et al, 1974
<i>Bif. ruminantium</i>	Rumen	Biavati i Mattarelli, 1991
<i>Bif. saeculare</i>	Femtes de conill	Biavati, 1992
<i>Bif. scardovii</i>	Orina i sang d'humans	Hoyles, 2002
<i>Bif. subtile</i>	Aigua residual	Biavati, 1982
<i>Bif. thermacidophilum</i> ssp. <i>porcinum</i>	Femtes de garrins	Zhu, 2003
<i>Bif. thermacidophilum</i> spp.	Digestor anaeròbic	Dong et al, 2000
<i>Bif. thermophilum</i>	Femtes de porc, pollastre i vedells lactants; rumen	Mitsuoka, 1969
<i>Bif. tsurumiense</i>	Placa dental de hàmmster	Okamoto et al, 2008

Per a l'anàlisi de *Bifidobacterium* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua s'han utilitzat tant tècniques moleculars com les tècniques clàssiques de cultiu. Les tècniques utilitzades fins a l'actualitat amb aquesta finalitat, s'esmenten a continuació:

- Detecció de colònies fermentadores de sorbitol relacionades amb soques aïllades d'humans en el medi HBSA (Mara, D.D. et al, 1983).
- Discriminar l'origen de la contaminació en funció del creixement de les soques en "tripticosa phyton yeast broth" a 45°C. La majoria de les soques animals poden créixer en aquesta temperatura cosa que no passa amb les humanes (Gavini, F. et al, 1991).
- Detecció de *Bif. adolescentis*, indicador de contaminació fecal d'humans, mitjançant el creixement en el medi BFM i hibridació amb sonda específica (Lynch, P.A. et al, 2002).
- Detecció de *Bif. dentium*, indicador de contaminació fecal humana, mitjançant amplificació amb PCR i hibridació amb sonda específica (Nebra, Y. et al, 2003).
- Anàlisi específica per *Bif. dentium* i *Bif. adolescentis* mitjançant PCR múltiple (Bonjoch, X. et al, 2004).
- Detecció de *Bifidobacterium* spp. específiques d'humans mitjançant PCR-Q (Gueimonde, M. et al, 2004).

1.3.2.2 *Bacteroides* com a microorganisme indicador de la contaminació fecal a l'aigua

L'hàbitat habitual del gènere *Bacteroides* és l'aparell intestí d'humans i animals mantenint una relació de mutualisme. Tot i així, aquest gènere representa dos terços dels bacteris anaerobis aïllats en clínica (Jeffrey Smith, C. et al, 2006). Ja que s'ha vist associat a algunes patologies incloent abscessos en varies parts de l'organisme (abdomen, fetge, pelvis, etc) i bacterèmia causades quan traspasa la barrera de cèl·lules de l'aparell intestinal i penetra en l'organisme (Wexler, H.M., 2007).

És el gènere majoritari a les femtes humanes i de remugants on representa al voltant d'un 30% de la microbiota total en ambdós hostes (Holdeman, L.V. et al, 1976; Wang, X. et al, 2003; Whitford, M.F. et al, 1998). *Bacteroides* és també un dels gèneres predominants en porcs però amb menys representació, que s'ha postulat al voltant d'un 11% (Leser, T.D. et al, 2002). Degut a la seva naturalesa anaeròbica, presenta una baixa capacitat de supervivència en l'ambient cosa que dificulta el seu

cultiu i havia limitat el seu ús com a indicador de l'origen de la contaminació fecal. Alhora, aquesta limitació ens indica, com en el cas de *Bifidobacterium*, una possible especiació entre hostes que no ha estat tan ben caracteritzada (Taula 1.5).

Degut a la seva complexitat bioquímica i genètica (Panell 2) *Bacteroides* és un gènere que ha estat poc estudiat (Wexler, H.M., 2007) i la seva filogènia ha vist varies revisions en els últims anys. Moltes espècies que no han estat cultivades ni classificades i d'altres com *B. distasonis* i *B. merdae* han estat reclassificades al nou gènere *Parabacteroides* (Sakamoto, M. et al, 2006). Les espècies que actualment estan descrites es citen a la Taula 1.6, però cal tenir en compte que un elevat nombre d'espècies s'han caracteritzat filogenèticament mitjançant l'anàlisi del gen del 16S ARNr, però encara no han pogut ser classificades ni identificades (Hold, G.L. et al, 2002; Leser, T.D. et al, 2002).

Taula 1.5 Presència de *Bacteroides* spp. a la microbiota fecal d'humans i animals. X: organisme present a la mostra; 0: organisme no present; i nd: anàlisi no realitzat (Jeffrey Smith, C. et al, 2006).

	Comptatge /gr de pes sec en femtes humanes	% de mostres humanes positives	Animals domèstics	Porcí	Boví	Oví	Aus	Equí
<i>B. thetaiotaomicron</i>	4,5x10 ¹⁰	67-100	X	X	X	X	X	X
<i>B. vulgatus</i>	4,2x10 ¹⁰	47-100	X	X	X	X	X	0
<i>B. distasonis</i>	2,9x10 ¹⁰	36-64	X	X	X	X	X	0
<i>B. eggerthii</i>	2,8x10 ¹⁰	2,1-5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B. fragilis</i>	2,3x10 ¹⁰	17-68	0	X	0	X	0	0
<i>B. ovatus</i>	0,8x10 ¹⁰	17-44	0	0	0	0	X	0

La complexitat d'aquest gènere també es veu reflectida en els medis que s'han descrit per al seu aïllament i cultiu. S'han definit pocs medis amb elevats requeriments nutricionals i pocs d'ells han arribat a ser aplicats de manera habitual. El medi més utilitzat per a l'aïllament de *Bacteroides* és el medi *B. fragilis* bilis esculina agar (BBE) (Livingston, S.J. et al, 1978). D'altres medis que s'han descrit són el medi Kanamicina-Vancomicina Brucella sang agar (KVLB) (Summanen, P.H. et al, 1993) que permet l'aïllament selectiu de *Bacteroides* spp. i *Prevotella* spp., el medi Kanamicina-Esculina Bilis Agar (KEB) (Chan, P.C.K. et al, 1977) i el medi *B. fragilis* grup agar (FRAG) (Lyznicki, J.M. et al, 1982).

Panell 2**Característiques del gènere *Bacteroides***

El gènere *Bacteroides* pertany a l'ordre del Bacteroidals juntament amb els gèneres *Prevotella*, *Porphyromonas* i el recentment gènere escindit de *Bacteroides*: *Parabacteroides* (Sakamoto, M. et al, 2006). Aquest ordre pertany al filum Bacteroidetes, al qual, també s'hi agrupen les classes Flavobacteria i Epsilonbacteriia.

Són bacils gram negatius, no mòbils, no esporulats, anaerobis estrictes i resistent a la bilis. Poden créixer fins a una concentració de bilis del 20%. Metabolitzen un elevat nombre de polisacàrids com la cel·lulosa, hemicel·lulosa, midó i pectines ajudant a la digestió de fibres vegetals. La paret cel·lular és una estructura complexa constituïda per la superposició d'un elevat nombre de capes entrelaçades entre elles amb molècules poc comunes com els esfingolípids (Wexler, H.M., 2007).

Les espècies de *Bacteroides* presenten diferent grau de tolerància a concentracions d'oxigen (Baughn, A.D. et al, 2004). Algunes espècies són de les més aerotolerants d'entre les espècies anaeròbiques, el que representa un important factor de virulència. S'ha observat que les espècies aïllades de mostres clíniques són més resistent a l'oxigen que les d'origen fecal (Jeffrey Smith, C. et al, 2006).

L'any 2003 es va seqüenciar el genoma de *B. thetaiotaomicron* (Xu, J. et al, 2003) i el 2004 de *B. fragilis* (Kuwahara et al, 2004) que ha facilitat poder entendre els mecanismes d'adaptació a l'aparell digestiu. Presenten un baix contingut de G+C entre 39-48%. La mida del genoma varia entre les 4,4 Mb de *B. eggerthi* a 6,7 Mb de *B. ovatus*. També s'ha seqüenciat *B. vulgatus* i *P. distasonis*. El nombre d'operons del gen del 16S ARNr oscil·la de 7 a *B. vulgatus* a 5 a *B. thetaiotaomicron*. Una de les còpies d'aquesta última espècie conté 100 pb de bases menys que la resta.

Els medis de cultiu de *Bacteroides* demanen els requeriments típics de l'ambient on creix. La majoria d'espècies poden créixer en un medi amb sucres fermentables, hemina, vitamina B₁₂, amoni com a font de nitrogen, diòxid de carboni i sulfat (Jeffrey Smith, C. et al, 2006).

Actualment ha pres importància com a indicador de l'origen de la contaminació fecal, pel que van incrementant els estudis destinats a identificar-los. La complexitat del seu cultiu al laboratori, ha portat a que la majoria de tècniques que s'utilitzen per a identificar *Bacteroides* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua siguin tècniques moleculars. Les tècniques descrites amb aquesta finalitat fins a l'actualitat es detallen a continuació:

- Detecció de la contaminació fecal humana mitjançant sondes específiques de *Bacteroides* humans (Kreader, C.A., 1995).
- L'anàlisi mitjançant LH-PCR i T-RFLP de les poblacions de *Bacteroides* d'humans i de remugants va portar a definir pics característics de l'origen de les mostres (Bernhard, A.E. et al, 2000a; Fogarty, L.R. et al, 2005).
- A partir dels resultats obtinguts amb les tècniques anteriors es va definir iniciadors específics per a detectar la contaminació fecal d'humans i de remugants (Bernhard, A.E. et al, 2000b). Posteriorment es va caracteritzar el perfil de T-RFLP de soques específiques de porcs i cavalls, i es van definir iniciadors específics per a la seva detecció (Dick, L.K. et al, 2005).
- S'han definit uns iniciadors específics per a la detecció de *B. thetaiotaomicron* com a indicador de contaminació fecal humana (Carson, C.A. et al, 2005).
- També s'han posat a punt tècniques basades en la PCR-Q. *Bacteroides* és un gènere en que moltes de les espècies no han pogut ser cultivades, això fa que aquesta tècnica sigui molt útil per a identificar i quantificar *Bacteroides* com a indicador de la contaminació fecal. Últimament s'han desenvolupat algunes PCR-Q descrites per: la detecció de contaminació fecal humana (Fogarty, L.R. et al, 2005; Kildare, B.J. et al, 2007; Layton, A. et al, 2006; Okabe, S. et al, 2007a; Reischer, G.H. et al, 2007; Seurinck, S. et al, 2005a; Stricker, A.R. et al, 2008), de bovins i remugants (Fogarty, L.R. et al, 2005; Kildare, B.J. et al, 2007; Layton, A. et al, 2006; Okabe, S. et al, 2007a; Reischer, G.H. et al, 2006; Shanks, O.C. et al, 2008; Stricker, A.R. et al, 2008), de porcs (Okabe, S. et al, 2007a) i de gossos (Kildare, B.J. et al, 2007).

Taula 1.6 Espècies del gènere *Bacteroides* i *Parabacteroides*

Espècie	Origen
<i>B. acidifaciens</i>	Miyamoto et al, 2000
<i>B. barnesiae</i>	Lan et al, 2006
<i>B. caccae</i>	Johnson et al, 1986
<i>B. capillosus</i>	Kelly et al, 1957
<i>B. cellulosityticus</i>	Robert et al, 2007
<i>B. cellulostolvans</i>	Murray et al, 1984
<i>B. coagulans</i>	Eggerth et al, 1933
<i>B. coprocola</i>	Kitahara et al, 2005
<i>B. coprophilus</i>	Hayashi et al, 2007
<i>B. coporosuis</i>	Whitehead et al, 2005
<i>B. dorei</i>	Bakir et al, 2006
<i>B. eggerthi</i>	Holdeman et al, 1974
<i>B. finegoldii</i>	Bakir et al, 2006
<i>B. fragilis</i>	Veillon et al, 1898
<i>B. galacturonicus</i>	Jensen et al, 1986
<i>B. gallinarum</i>	Lan et al, 2006
<i>B. helcogenes</i>	Benno et al, 1983
<i>B. intestinalis</i>	Bakir et al, 2006
<i>B. massiliensis</i>	Fenner et al, 2005
<i>B. nordii</i>	Song et al, 2005
<i>B. ovatus</i>	Eggerth et al, 1933
<i>B. plebeius</i>	Kitahara et al, 2005
<i>B. propionicifaciens</i>	Ueki et al, 2008
<i>B. pyogenes</i>	Benno et al, 1983
<i>B. salanitronis</i>	Lan et al, 2006
<i>B. salyersaie</i>	Song et al, 2005
<i>B. stercoris</i>	Johnson et al, 1986
<i>B. suis</i>	Benno et al, 1983
<i>B. tectus</i>	Love et al, 1986
<i>B. thetaiotamicron</i>	Distao et al, 1912
<i>B. uniformis</i>	Eggerth et al, 1933
<i>B. urolyticus</i>	Jackson et al, 1978
<i>B. vulgatus</i>	Eggerth et al, 1933
<i>B. xylanisolvans</i>	Chassard et al, 2008
<i>B. xylanolyticus</i>	Scholten-koerselman et al, 1986
<i>P. distasonis</i>	Eggerth et al, 1933
<i>P. goldsteinii</i>	Song et al, 2006
<i>P. johnsonii</i>	Sakamoto et al, 2007
<i>P. merdae</i>	Johnson et al, 1986

1.4 Estat actual de MST

Actualment tenim, doncs, un important número de mètodes descrits i s'han definit varis microorganismes susceptibles de ser utilitzats com a marcadors de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Scott, T.M. et al, 2002; Seurinck, S. et al, 2005b; Sinton, L.W. et al, 1998). La majoria d'aquests estan en una primera fase experimental, i poden presentar algunes limitacions que s'han de conèixer i poder salvar-les.

Molts d'aquests mètodes s'han definit en una determinada àrea geogràfica i suposen que les poblacions que formen la microbiota són estables en el temps. Per tant, fa falta conèixer la seva universalitat. Alguns dels mètodes descrits per ha ser utilitzats en el MST presenten variacions dins l'àrea geogràfica on s'han estudiat (Hartel, P.G. et al, 2002; Scott, T.M. et al, 2003). En d'altres casos no s'ha estudiat possibles variacions pel que s'ha de tenir en compte (Gordon, D.M., 2001; Payan, A. et al, 2005). El mateix passa amb possibles variacions temporals de la microbiota intestinal. S'ha observat que una part dels microorganismes va variant, de manera que hi ha soques que es mantenen mentre que d'altres es van mudant (Jenkins, M.B. et al, 2003; Vaughan, E.E. et al, 2000).

Per tal de poder ser utilitzats com a indicadors de la contaminació fecal a l'aigua s'ha de conèixer la seva estabilitat. Quan un microorganisme intestinal passa del seu hàbitat natural al medi ambient estarà sotmès a factors que poden afectar la seva supervivència. La persistència a l'aigua dependrà de factors ambientals com la temperatura, la salinitat, la irradiació, la manca de nutrients o la depredació (Rhodes, M.W. et al, 1999; Seurinck, S. et al, 2005b). És important conèixer el seu comportament en el medi ambient i així definir la persistència, la resistència a diferents tractaments i la seva relació amb els patògens (Okabe, S. et al, 2007b; Savichtcheva, O. et al, 2007). Una avantatge d'utilitzar un microorganisme anaeròbic com a indicador és la seva incapacitat de sobreviure al medi ambient. Això implica que la seva detecció determinarà una contaminació fecal recent de l'aigua.

S'ha vist que cap dels mètodes químics o microbians descrits fins ara, dona per si sol la suficient capacitat de discriminació per a poder determinar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Blanch, A.R. et al, 2004; Griffith, J.F. et al, 2003). Ara bé, la combinació de més d'un paràmetre ha permès definir models experimentals de MST en punts d'abocament de contaminació de manera exitosa (Blanch, A.R. et al, 2006). La millora d'aquests models requereix la incorporació de nous paràmetres (indicadors) que permetin al mateix temps determinar diferents orígens animals de la

contaminació fecal, la influència dels factors de dilució en les aigües receptores de l'abocament i la persistència en l'entorn natural dels diferents indicadors escollits (Blanch, A.R. et al, 2006; Stewart, J.R. et al, 2003).

Objectius

El treball experimental realitzat, s'ha centrat en l'estudi de mètodes de MST per tal de detectar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua i dels diferents factors que intervenen en la seva aplicació. Per aquest propòsit s'han definit els següents objectius:

1. Avaluació de diferents mètodes moleculars descrits prèviament com a bons indicadors de la contaminació fecal analitzant mostres de l'entorn geogràfic de Catalunya i d'aquesta manera valorar possibles variacions geogràfiques d'aquests indicadors.
2. Anàlisi estadístic per valorar la combinació més adequada del mètodes de MST analitzats anteriorment per a obtenir un major encert alhora de detectar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua.
3. Anàlisi de les comunitats de *Bifidobacterium* que habiten a l'aigua residual provinent de diferents orígens aplicant la tècnica de la DGGE.
4. Avaluació i identificació de les soques de *Bifidobacterium* spp. exclusives de l'aigua residual d'un determinat origen com a possibles indicadores de l'origen de la contaminació.
5. Identificació en mostres d'aigua residual de cada origen les espècies que s'han definit com a possibles indicadores de la contaminació fecal a l'aigua.
6. Desenvolupar una PCR quantitativa a temps real per a quantificar la presència de *Bacteroides* spp. en l'aigua residual.
7. Valorar la persistència del gènere *Bacteroides* en aigua de riu "in situ", mitjançant tècniques de cultiu i moleculars:
 - a. Valorar la inactivació natural de poblacions descrites com indicadores de la contaminació fecal en aigües amb soques ambientals de *Bacteroides* en aigua de riu i en condicions naturals.
 - b. Valorar la inactivació natural de les soques tipus *B. fragilis* DSM 2151^T i *B. thetaiotaomicron* DSM 2079^T en aigua de riu i en condicions naturals.

- c. Valorar la inactivació natural de la soca tipus *B. fragilis* DSM 2151^T en aigua de riu autoclavada i en condicions naturals.
- 8. Valorar la persistència de les soques tipus *B. fragilis* DSM 2151^T i *B. thetaiotaomicron* DSM 2079^T en microcosmos al laboratori.

Capítol 2

Anàlisi comparatiu de mètodes
per a la detecció de l'origen de
la contaminació fecal en aigües
basats en l'amplificació d'àcids
nucleics

2.1 Introducció

La contaminació fecal de l'aigua implica un important risc sanitari per la població, així com greus conseqüències ambientals i econòmiques. Per tant, el manteniment de la qualitat i de la seguretat microbiològica de l'aigua, és un factor clau que cal regular, controlar i gestionar. S'han descrit diferents riscos sanitaris associats a la font causant de la contaminació fecal, així que, poder determinar l'origen de la contaminació en ambients aquàtics és essencial per estimar el risc associat i fer estudis epidemiològics. Tal i com s'ha indicat en el capítol anterior conèixer la font també facilita poder prendre les mesures adequades per a recuperar la zona contaminada, adoptar les mesures legals i establir les responsabilitats econòmiques.

En els darrers anys s'han proposat un nombre important de nous microorganismes indicadors de l'origen de la contaminació fecal aigua, així com noves tècniques per a la seva detecció. Al capítol 1 s'ha donat una visió general dels tipus d'indicadors: molècules químiques, microorganismes o ADN mitocondrial, i la majoria dels mètodes utilitzats per a la seva detecció descrits fins ara. Tot i que tots els mètodes comporten avantatges, també presenten limitacions (Field, K.G., 2005; Malakoff, D., 2002; Stewart, J.R. et al, 2003). Aquestes limitacions poden ser degudes a l'anàlisi de mostres complexes com és el cas de mostres molt diluïdes, mostres contaminades a partir de diferents fonts o mostres de contaminació no recent (Blanch, A.R. et al, 2006); a l'ús de metodologies que variïn geogràficament o temporalment (Hartel, P.G. et al, 2002; Parveen, S. et al, 2006; Stoeckel, D.M. et al, 2004); al mètode estadístic utilitzat en l'anàlisi dels resultats i en la creació de models predictius (Blanch, A.R. et al, 2006); o a no poder optimitzar el límit de detecció de la tècnica i la capacitat de classificació de l'origen de la contaminació. És a dir, mètodes que a la vegada presentin una elevada capacitat per a discernir l'origen de la contaminació fecal (especificitat) i amb un bon límit de detecció (sensibilitat) (Guan, S. et al, 2002; Scott, T.M. et al, 2003).

Cap dels actuals indicadors descrits de MST per ell sol permet una caracterització perfecta dels diferents possibles orígens de contaminació a l'aigua (Blanch, A.R. et al, 2006; Gilpin, B. et al, 2003; Griffith, J.F. et al, 2003). Diversos estudis s'han dedicat a estudiar diferents combinacions d'indicadors per tal d'incrementar el percentatge de certesa a l'hora de determinar l'origen o ampliar el número d'orígens a poder detectar.

Un estudi dut a terme a nivell europeu, va portar a analitzar indicadors químics (esterols fecals), vírics (genotipat de fags F-específics d'ARN, fags de *Bacteroides*, colífags somàtics), microbians dependents de bases de dades (fenotipatge de coliforms i estreptococs fecals), microbians dependents de cultiu (coliforms fecals, enterococs fecals, clostridis, bifidobactèries totals i fermentadores de sorbitol), moleculars (PCR múltiple per a detectar *Bifidobacterium adolescentis* i *Bif. dentium*) i protozous (genotipat de *Giardia*) (Blanch, A.R. et al, 2004). Després d'analitzar aquests indicadors i veure que amb cap d'ells s'obtenia un 100% d'encert, es van identificar 38 variables directes i derivades d'aquestes i es va intentar obtenir un model que amb la combinació d'aquestes en resultés la màxima capacitat de discriminació entre contaminació animal i humana. Entre els diferents models predictius obtinguts, cal destacar aquell que es basa en la valoració de la densitat de fags somàtics i en la relació entre aquests i els fags que infecten *B. thetaiotaomicron* GA17. Aquest model facilitava un 100% d'encert en les condicions estudiades. Els mateixos resultats es van obtenir quan es va valorar la densitat de coliforms fecals juntament amb la relació de la densitat de coliforms fecals i de fags de *B. thetaiotaomicron* GA17 (Blanch, A.R. et al, 2006).

Als EUA es va dur a terme un estudi semblant per tal d'avaluar diferents mètodes (Griffith, J.F. et al, 2003). S'analitzà mètodes dependents de llibreria (ARA i CSU d'*E. coli* i enterococs, ribotipatge, PFGE i Box-PCR), mètodes d'estudis de comunitats (T-RFLP de Bacteroidetes i Eubacteria), mètodes moleculars (detecció per PCR de Bacteroidetes i de toxines d'*E. coli*) i vírics (fenotipat de fags F-específics d'ARN i per PCR d'enterovirus i adenovirus). Es va concloure que tots els mètodes tenien certes avantatges i certes limitacions que calia considerar en la seva utilització pràctica (Griffith, J.F. et al, 2003).

També s'han fet estudis d'aquest estil a Nova Zelanda estudiant dotze marcadors diferents i variables derivades (Gilpin, B. et al, 2003). I d'altres, que han utilitzat un menor número d'indicadors i diferents combinacions: fluorimetria, especiació d'*Enterococcus* i la detecció del gen *esp* d'*Ent. faecium* (McDonald, J.L. et al, 2006); detecció de Bacteroidetes específics d'humans i enterovirus entre d'altres (Boehm, A.B. et al, 2003).

Dels mètodes de MST descrits, la tècnica de PCR és un mètode acurat, ràpid, l'anàlisi es pot fer en unes poques hores, amb una elevada sensibilitat i fàcil de dur a terme en comparació amb altres mètodes de MST (Griffith, J.F. et al, 2003). Es basa en l'anàlisi de la mostra i en la detecció específica mitjançant l'amplificació per PCR de

marcadors propis d'un determinat hoste. Serà la presència o absència del marcador el que indicarà el possible origen de la contaminació fecal. Aquests mètodes són independents de base de dades i de cultiu, per tant prescindeixen de la complexitat i dificultat de crear una base de dades i de les limitacions que comporten el cultiu dels microorganismes. La seva utilització permet l'anàlisi d'un elevat número de mostres, de manera més o menys automàtica i es poden efectuar diferents anàlisis utilitzant el mateix extracte (Santo Domingo, J.W. et al, 2007).

La utilització d'una tècnica molecular que no precisa el cultiu dels microorganismes ha permès que es recuperessin o es descrivissin nous indicadors que eren difícils de ser mesurats per mètodes tradicionals de cultiu. *Rhodococcus coprophilus* fou proposat com a microorganisme marcador de contaminació fecal deguda a herbívors fa més de 20 anys (Rowbotham, T.J. et al, 1977). La seva utilitat decaigué, ja que es precisava d'un temps d'incubació major a 18 dies per a poder ser detectat (Oragui, J.I. et al, 1983). La utilització de la PCR per detectar *Rhodococcus coprophilus* ha permès escurçar el temps de detecció i ha permès revifar el seu interès (Savill, M.G. et al, 2001). La PCR també ha obert les portes als virus com a indicadors de MST (Ley, V. et al, 2002; Maluquer de, M.C. et al, 2004; Pina, S. et al, 1998; Tsai, Y.L. et al, 1993). La concentració de virus al medi ambient és molt baixa i la majoria són difícils o impossibles de detectar amb les tècniques de cultiu cel·lular. La PCR és una tècnica que presenta una elevada sensibilitat que permet l'amplificació de petites quantitats d'ADN presents a la mostra i així evitar les tècniques necessàries per al seu cultiu (Lemarchand, K. et al, 2004). L'ús de la PCR ha permès la utilització d'arqueobacteris com a microorganismes indicadors de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua. S'han dissenyat iniciadors que permeten la detecció específica d'una variant del gen *mcrA* de bacteris metanògens exclusius de porcs (Ufnar, J.A. et al, 2007a). Per tant, indicaria una contaminació fecal provocada per aquests animals. L'arqueobacteri *Methanobrevibacter ruminantium* és propi de remugants domesticats, l'amplificació del gen *nifH* d'aquest microorganisme permet la detecció de contaminació fecal provinent d'aquests animals (Ufnar, J.A. et al, 2007b).

La tècnica de la PCR, però, pot presentar algunes limitacions. En alguns casos pot haver-hi la detecció de falsos negatius deguts a la presència en la mostra, de substàncies inhibidores de la reacció. També pot haver-hi la presència de falsos positius, deguts a possibles contaminacions de la reacció o a interferències dels iniciadors amb la microbiota ambiental. Una amplificació esbiaixada de les poblacions que pot ser generada per la metodologia utilitzada en l'extracció dels àcids nucleics

que pot afavorir un determinat microorganisme en funció de l'estructura de la paret cel·lular; o a diferent eficiència d'amplificació segons la molècula d'ADN (Vaughan, E.E. et al, 2000; von Wintzingerode, F. et al, 1997). Això es pot deure a varis factors com poden ser:

- diferències en la temperatura de dissociació de la diversitat de molècules d'ADN que es troben a la mostra
- diferent eficiència d'amplificació segons la mida de l'amplificat
- conformacions que poden assolir les molècules d'ADN i que poden complicar-ne el procés
- la formació de quimeres entre diferents gens homòlegs
- diferències entre el número de còpies del mateix gen entre diferents microorganismes; com per exemple la variació del número de còpies del gen del 16S ARNr (7 còpies *Bacteroides vulgatus* i 5 còpies *B. thetaiotaomicron* (<http://ribosome.mmg.msu.edu/rndb/index.php>))

Fins al moment no s'ha realitzat un estudi compartiu de les tècniques moleculars basades en PCR i sense cultiu previ que s'han proposat en els darrers anys per als indicadors potencials de MST. Per això els objectius d'aquest estudi han estat:

1. la valoració diferents indicadors de MST basats en la tècnica de PCR per a poder ser utilitzats a l'àrea geogràfica que ens ocupa i que ens permetin detectar el principals possibles orígens de contaminació fecal a l'aigua: humana, de bestiar boví, porcí i aus.
2. poder establir a partir d'aquests paràmetres un model predictiu que permeti caracteritzar l'origen de la contaminació fecal amb el mínim de paràmetres a analitzar.

Per a complir aquests objectius es van escollir diferents marcadors proposats prèviament per MST que poguessin ser detectats per tècniques moleculars basades en la tècnica de PCR:

2.1.1 Detecció del grup *Bacteroidetes*

S'han descrit mètodes de detecció del grup *Bacteroidetes* com a indicador de la contaminació fecal utilitzant la PCR (Bernhard, A.E. et al, 2000b; Carson, C.A. et al, 2005). Al capítol 1 s'ha parlat àmpliament de la importància de *Bacteroides* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Apartat 1.3.2.2). *Bacteroides* spp. és el gènere majoritari al tracte intestinal humà amb una presència de 10^{10} - 10^{11} cèl·lules per gram de femta, el que representa fins un 30% de la microbiota fecal humana (Holdeman, L.V. et al, 1976). La seva presència també és rellevant en remugants i porcs (Leser, T.D. et al, 2002; Whitford, M.F. et al, 1998). S'ha observat que presenten especificitat d'hostes degut a que la seva naturalesa anaeròbica els dificulta la supervivència al medi ambient i que hi hagi traspàs entre espècies. Per contra, l'anaerobiosi dificulta la seva manipulació i cultiu al laboratori. La detecció mitjançant la PCR eludeix el problema que comporta el seu cultiu i redueix el temps necessari per a la seva detecció.

B. thetaiotaomicron ha estat suggerit com a indicador de la presència de contaminació fecal humana a l'aigua. S'han dissenyat iniciadors específics per a poder ser detectat de manera fàcil i ràpida prescindint del cultiu (Carson, C.A. et al, 2005). Uns altres iniciadors del grup *Bacteroidetes* han estat utilitzats extensament pel territori per a detectar contaminació fecal humana i de remugants a l'aigua (Ahmed, W. et al, 2008; Ahmed, W. et al, 2007; Bernhard, A.E. et al, 2000b; Boehm, A.B. et al, 2003; Noble, R.T. et al, 2003). Aquests iniciadors han estat dissenyats a partir de l'anàlisi de les comunitats de *Bacteroidetes* presents a l'aigua residual amb les tècniques de LH-PCR i T-RFLP (Apartat 1.2.2.3.b) (Bernhard, A.E. et al, 2000a). Posteriorment, s'han dissenyat, de la mateixa manera, iniciadors per a la detecció de contaminació fecal porcina i equina (Dick, L.K. et al, 2005). L'anàlisi del gen del 16S ARNr del grup *Bacteroidetes* en mostres ambientals amb aquestes tècniques, ha revelat la presència de marcadors específics d'hoste. Aquests marcadors van poder ser aïllats, clonats i seqüenciats. A partir de la seqüència es van dissenyar els iniciadors específics de *Bacteroidetes* humans HF134F, HF183F i de remugants CF128F i CF193F (Bernhard, A.E. et al, 2000b), i posteriorment el de porcs PF163F i de cavalls HoF597F (Dick, L.K. et al, 2005). Sembla que aquests marcadors estiguin distribuïts per una àmplia zona geogràfica, ja que s'han detectat a Amèrica del Nord, en algunes zones d'Europa (Stoeckel, D.M. et al, 2007) i a Austràlia i Nova Zelanda (Ahmed, W. et al, 2008; Gilpin, B. et al, 2003).

2.1.2 *Detecció d'espècies de Bifidobacterium*

Bifidobacterium s'ha considerat, també, com a marcador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Apartat 1.3.2.1). Presenta les mateixes característiques que *Bacteroides*: una elevada presència a les femtes, una fisiologia anaeròbia que li ha permès una coevolució amb l'hoste i a la vegada dificulta el seu cultiu al laboratori. *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium* han estat descrites principalment a l'aparell digestiu d'humans, i per tant ens indicarien la presència de contaminació fecal humana a l'aigua (Lynch, P.A. et al, 2002; Nebra, Y. et al, 2003). S'ha descrit una PCR múltiple per a poder detectar simultàniament *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium* (Bonjoch, X. et al, 2004). S'ha observat que aquests marcadors analitzats mitjançant la PCR múltiple presenten una àmplia distribució pel territori europeu: França, Regne Unit, Suècia, Xipre i Catalunya (Blanch, A.R. et al, 2006).

2.1.3 *Detecció del gen esp d'Enterococcus faecium*

També s'ha desenvolupat una PCR per a la detecció del gen *esp d'Ent. faecium* específic d'humans (Scott, T.M. et al, 2005). Aquest gen codifica per una proteïna de membrana que està relacionada amb factors de virulència, de colonització i formació de biofilms (Hammerum, A.M. et al, 2002). La presència d'aquest marcador a l'aigua residual és molt baixa. S'ha observat una incidència de l'1% entre els enterococs aïllats d'humans (Scott, T.M. et al, 2005). Aquest mètode, com la identificació de gens de les toxines STIb, STII i LTIIa d'*E. coli* enterotoxigènica (Khatib, L.A. et al, 2002; Khatib, L.A. et al, 2003; Oshrio, R.K. et al, 1997), necessita del cultiu del microorganisme per tal d'augmentar la seva concentració i poder ser detectat per PCR. Tot i ser un mètode de detecció molecular, caldrà temps per a que creixin els enterococs i per tant presentarà el desavantatge dels mètodes que precisen cultiu. A més a més, la necessitat d'un enriquiment previ limita la seva quantificació. Per tal d'utilitzar aquest marcador molecular amb les mateixes condicions que els altres, s'ha prescindit en aquest estudi del pas d'enriquiment previ.

2.1.4 *Detecció d'ADN mitocondrial*

L'anàlisi de l'ADN mitocondrial ha estat utilitzat àmpliament en anàlisis filogenètics, mèdics i forenses. Darrerament dos metodologies basades en la detecció per PCR (Martellini, A. et al, 2005) i per PCR-Q (Caldwell, J.M. et al, 2007) han introduït aquest marcador en estudis de MST. S'han definit quatre PCRs niuades per a

detectar la presència de contaminació fecal humana, de bestiar boví, porcí i d'oví (Martellini, A. et al, 2005). L'elevada quantitat d'ADN mitocondrial que tenen les cèl·lules que es desprenen juntament amb les femtes, el fa un mètode atractiu per a ser utilitzat en MST.

2.2 Materials i Mètodes

2.2.1 Mostres analitzades

S'han analitzat un total de 144 mostres d'aigua residual sense tractar de diferents indrets geogràfics i de quatre orígens diferents: mostres humanes procedents d'aigua d'entrada de diferents estacions depuradores d'aigua residual (EDAR), mostres bovines procedents d'aigua residual d'escorxadors i de femtes obtingudes de granges de bestiar boví, mostres porcines procedents d'aigua d'escorxadors i de purins de granges de bestiar porcí i mostres avícoles procedents d'aigua residual d'escorxadors d'aus (Taula 2.1).

Taula 2.1. Número i origen de les mostres analitzades en aquest estudi.

Origen de les mostres	Núm. mostres
Humà	50
Boví	25
Aus	31
Porcí	38
Total	144

Les mostres s'han recollit en recipients de plàstic estèrils i han estat transportades i conservades a 4°C fins al moment del seu anàlisi. En el cas de les mostres obtingudes en el territori català, el temps entre el mostreig i el seu anàlisi no ha excedit les 6 hores.

Algunes de les mostres han estat obtingudes a partir d'estacions depuradores d'aigua, de granges i d'escorxadors repartits pel territori de Catalunya (Figura 2.1). D'altres mostres procedents d'arreu d'Europa foren obtingudes a partir del projecte europeu EVK1-CT1 2000-00080 ("Tracking the origin of faecal pollution in surface water"). De manera que s'han analitzat 3 mostres de França (2 d'origen boví i 1 d'humà), 2 mostres de Suècia (1 d'origen boví i 1 d'humà), 2 de Regne Unit (1 de boví i 1 de porcí) i 5 de Xipre (2 humanes, 1 d'aus i 2 de porcs). Les característiques dels indrets analitzats a Catalunya es detallen a la Taula 2.2 i la Taula 2.3.

Figura 2.1 Distribució del lloc de recollida de mostres dins el principat de Catalunya (mostres d'origen humà de color blau; mostres d'origen porcí de color roig; mostres d'origen boví de color verd; mostres d'origen avícola de color taronja).



Taula 2.2 Característiques de les EDARs d'on s'obtingueren les mostres residuals urbanes.

Núm. mostres	Localització	Tractament	Habitants	Cabal disseny (m ³ /dia)
1	Amposta	Biològic	18.719	5.500
1	Blanes	Biològic amb eliminació de N i P i tractament terciari	109.985	23.500
5	Castell d'Aro	Biològic amb tractament terciari	175.000	35.000
2	Empuriabrava	Biològic amb tractament terciari	35.000*	8.750
24	Gavà/Viladecans	Biològic	195.000	72.000
4	Mataró	Biològic	165.000	57.000
2	Besòs	Biològic	2.010.613	525.000
6	Taradell	Biològic amb eliminació de N i P	11.667*	2.000
1	Tortosa	Biològic	40.937	10.296

*No es coneix el número d'habitants. En aquest cas es dona el número d'equivalents de disseny (cabal disseny (m³/dia) x DBO₅ mitja d'entrada de disseny (mg/l) /60) que correspondria a una estimació de la població. Dades obtingudes de l'agència catalana de l'aigua: <http://mediambient.gencat.net/aca/ca//actuacions/depuradores/servei.jsp>

Taula 2.3 Característiques dels escorxadors i de les granges d'on s'obtingueren les mostres animals.

Núm. mostres	Escorxador	Localització	Animals	Núm. aproximat d'animals sacrificats /setmana
1	Boví 1	Argentona	Boví i oví	600-700 vedells; 300-400 xais, 10 cavalls
1	Boví 2	Castellbisbal	Boví, oví i caprí	750 vedells; 3.500-5.000 ovelles; 1.000-2.000 cabres
8	Boví 3	Figueres	Boví i oví	250 vedells i 800 xais
1	Boví 4	Sabadell	Boví i oví	1.600 vedells i 1.400 xais
2	Boví 5	Vilafant	Boví	125 vedells
1	Boví 6	Barcelona	Boví	2.000 vedells
16	Aus 1	Amposta	Aus	60.000 aus
14	Aus 1	Roquetes	Aus	60.000 aus
9	Porcí 1	Figueres	Porcí	12.500 porcs
1	Porcí 2	Roda de Ter	Porcí	15.000 porcs
7	Porcí 3	St. Eugènia de Berga	Porcí	15.000 porcs
2	Porcí 4	Vilafant	Porcí	5.000 porcs

Núm. mostres	Granja	Localització	Animals	Núm. d'animals
3	Boví 7	Breda	Boví	50 vaques
4	Boví 8	Les Franqueses	Boví	200 vedells
16	Porcí 5	Arbeca	Porcí	12.000 porcs d'engreix i 2.000 reproductores

2.2.2 Soques, medis de creixement utilitzats i extracció d'ADN

2.2.2.1 Grup *Bacteroidetes*

Com a control de les reaccions de PCR per als marcadors del grup *Bacteroidetes* s'han analitzat les soques tipus de *Bacteroides*: *Parabacteroides distasonis* (DSM 20701^T) (antigament *B. distasonis* (Sakamoto, M. et al, 2006)), *B. eggerthi* (DSM 20697^T), *B. fragilis* (DSM 2151^T), *B. ovatus* (DSM 1896^T), *B. thetaiotaomicron* (DSM

2079^T), *B. uniformis* (DSM 6597^T) i *B. vulgatus* (DSM 1447^T), i les soques *B. thetaiotaomicron* GA-17 i *B. fragilis* RYC 2056 (ATCC 700786).

Aquestes soques s'han descongelat a partir d'alíquotes conservades a -80°C (Annex I) i s'han cultivat amb el brou *Bacteroides*-Phage Recovery Medium (BPRM) (Scharlau, Barcelona) suplementat amb clorur càlcic, hemina i carbonat sòdic (Annex I). S'han incubat entre 24 i 48 h a 37°C en tubs de vidre i en condicions d'anaerobiosis. L'extracció d'ADN s'ha realitzat a partir d'1 ml del cultiu (Annex II). El inòcul s'ha centrifugat a 14.000 rpm durant 5 min i les cèl·lules precipitades s'han rentat dos vegades amb tampó TE (Tris-EDTA, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) (Annex II). Posteriorment la suspensió de cèl·lules en TE s'ha bullit durant 10 min per trencar la paret cel·lular i així extreure'n l'ADN.

2.2.2.2 *Bifidobacterium adolescentis* i *Bif. dentium*

Les soques tipus *Bif. adolescentis* (DSM 20083^T) i *Bif. dentium* (DSM 20436^T) han estat utilitzades com a control positiu per la PCR múltiple ADO-DEN. Les soques s'han descongelat a partir d'inòculs conservats a -80°C i s'han incubat 48 h a 37°C en tubs de vidre plens amb brou Reinforced *Clostridium* Medium (RCM) (Annex I) (Oxoid, Hampshire, Regne Unit) per tal d'evitar la presència d'oxigen. Per a l'extracció d'ADN s'ha utilitzat el protocol descrit prèviament (Kellogg, D.E. et al, 1990) (Annex II). El inòcul s'ha centrifugat a 14.000 rpm durant 3 min. Les cèl·lules s'han rentat dues vegades amb aigua destil·lada estèril i resuspès en 0,2 ml de la Solució A (100 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3) i 0,2 ml de la Solució B (2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 1% Tween-20, 1% Nonidet P40, pH 8,3) (Annex II). S'ha afegit proteïnasa K (Merck, Darmstadt, Alemanya) fins a una concentració final de 120 µg/ml. La suspensió s'ha incubat a 55°C durant 1 h, per tal de permetre l'acció de l'enzim. Després d'aquest temps, s'ha afegit 0,2 ml de Matriu d'InstaGene (BioRad, Hercules, EUA) a cada suspensió i s'han incubat durant 15 min més a 55°C. Aplicant un xoc tèrmic a 100°C durant 8 min s'ha inactivat la Proteïnasa K. Finalment, s'ha precipitat la Matriu d'InstaGene juntament amb les restes cel·lulars centrifugant les extraccions a 14.000 rpm durant 3 min. El sobrenedant ja és apte per a poder ser utilitzat en la reacció de PCR.

2.2.2.3 *Enterococcus faecium*

La soca C68 d'*Ent. faecium* conté la proteïna *esp* i per tant, ha estat utilitzada com a control positiu de la PCR per detectar contaminació fecal humana a l'aigua a partir de la detecció d'aquest gen. Aquesta soca fou cedida amablement pel Dr. L. B. Rice (Medical Service 111(W), Louis Stokes Cleveland VA Medical Center in Cleveland, Ohio).

La soca C68 es inhibida per l'azida, i per tant no pot ser incubada amb els medis de cultiu habitual d'*Enterococcus*. Per al seu cultiu s'ha utilitzat el medi LB (Annex I) i per a l'extracció d'ADN el Kit d'extracció QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya).

El mètode de detecció la proteïna *esp* descrit per Scott i col·laboradors (2005) es basa en la filtració de la mostra (Clesceri, L.S., 1998) i la incubació del filtre en el medi *Enterococcus* agar (mEA) (Difco, Sparks, EUA) durant 48 h a 41°C per tal d'incrementar el número de cèl·lules que puguin tenir el gen. Posteriorment, cal un enriquiment dels microorganismes crescuts al filtre en 10 ml de medi TSB (Conda, Madrid) (Annex I) durant 3 h a 41°C. La solució enriquida de bacteris s'agita per separar les cèl·lules del filtre. L'extracció d'ADN s'ha fet utilitzant el QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya) a partir de 0,2 ml de la suspensió.

2.2.2.4 *ADN mitocondrial*

Per a obtenir els controls positius per detectar mitjançant PCR l'ADN mitocondrial de diferents hostes s'ha efectuat l'extracció de cèl·lules humanes, bovines i porcines. L'ADN mitocondrial de cèl·lules humanes s'ha obtingut a partir de la línia cel·lular humana CaCo-2 (Human, Caucasian, colon, adenocarcinoma), i l'ADN mitocondrial de cèl·lules bovines i porcines, a partir de l'extracció de fetge de vaca i de porc. Per a l'extracció de l'ADN s'ha utilitzat el Kit d'extracció QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya) seguint el protocol del fabricant per a l'extracció d'ADN de teixits.

Per a l'extracció d'ADN mitocondrial de porcí i boví, s'ha partit de 240 mg de fetge de porc i 270 mg de fetge de vaca en 1 ml de PBS. La disgregació del teixit s'ha fet amb l'ajut d'un Polytron PT 1200E.

2.2.3 Processament i anàlisi de les mostres

Per tal d'evitar possibles substàncies inhibidores de la PCR s'ha utilitzat el Kit d'extracció QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemanya) per a fer l'extracció d'ADN de les mostres (Bonjoch, X., 2004b). S'ha processat 200 µl de les mostres crues segons les instruccions del fabricant. L'extracte obtingut ha estat utilitzat per a ser amplificat mitjançant les PCRs descrites per a detectar els possibles marcadors de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua.

2.2.3.1 Detecció del grup *Bacteroidetes*

S'ha analitzat quatre marcadors diferents del grup *Bacteroidetes* dos descrits com específics de contaminació fecal humana: HF134 i HF183 i dos descrits com específics de contaminació fecal de remugants CF128 i CF193. L'amplificació mitjançant PCR s'ha realitzat utilitzant iniciadors específics pels quatre marcadors (Bernhard, A.E. et al, 2000b) i l'iniciador revers específic pel gènere *Bacteroides* Bac708R (Bernhard, A.E. et al, 2000a) (Taula 2.4).

Taula 2.4 Iniciadors per a la detecció dels marcadors de *Bacteroidetes*: HF134, HF183, CF128, CF193 i Bac708R.

Iniciador	Diana	Seqüència 5'-3'	Tm	Amplificat (pb)
HF134F	Marcador d'humans	GCCGTCTACTCTTGCC	63°C	574
HF183F	Marcador d'humans	ATCATGAGTTCACATGTCCG	63°C	525
CF128F	Marcador de remugants	CCAACYTTCCCGWTA	62°C	580
CF193F	Marcador de remugants	TATGAAAGCTCCGGCC	62°C	515
Bac708R	Grup de <i>Bacteroides-Prevotella</i>	CAATCGGAGTTCTTCGTG	54°C	¹

¹Iniciador revers
Y:C/T ; W:A/T

Els assaigs de PCR s'han dut a terme en un volum de reacció de 25 µl, els volums de reactius utilitzats es mostren a la taula 2.5 (comunicació personal de Field K. G.).

Un cop feta la barreja i afegit l'ADN de l'extracció de les mostres d'aigua residual s'ha efectuat la PCR en un termociclador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn).

El programa utilitzat per dur a terme la reacció de PCR s'especifica a la taula 2.6 (comunicació personal Field, K. G.).

Taula 2.5 Reactius i concentracions necessàries per a la reacció de PCR dels marcadors de Bacteroidetes.

Reactiu	Volum afegit	Concentració final
Tampó 10x ¹ (Eppendorf, Hamburg, Alemanya)	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM) (Eppendorf)	0,5 µl	500 µM
dNTPs (25mM) (Eppendorf)	0,2 µl	200 µM
Iniciadors (5µm)	1µl	0,2 µM
Taq (5U/µl) (Eppendorf)	0,125 µl	0,625 U
ADN	1 µl	
H ₂ O	18,675 µl	
Volum Total	25 µl	

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

Taula 2.6 Programa per a la reacció de PCR dels marcadors de Bacteroidetes.

	94° C	2 min
30 cycles	94° C	1 min
	62-63° C	1 min
	72° C	1,5 min
	72° C	7 min
	4°C	∞

La detecció del producte amplificat s'ha acomplert mitjançant l'electroforesi en un gel d'agarosa a una concentració del 2% en TBE 1x (Annex II). El gel s'ha tenyit en una solució de bromur d'etidi (Annex II). S'ha capturat la imatge amb un aparell ImageMaster (Pharmacia Biotech).

2.2.3.2 Detecció per PCR múltiple de *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium*

Per a la detecció de les espècies *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium* marcadors de contaminació fecal cal una primera amplificació utilitzant els iniciadors genèrics de *Bifidobacterium* spp. Im26 i Im3 (Kaufmann, P. et al, 1997) i una segona amb iniciadors específics de les espècies. Els iniciadors Im26 i Im3 s'uneixen a la posició 15-35 i

1412-1432 del gen del 16S ARNr (Taula 2.7). Els iniciadors Bi-ADO1, Bi-ADO2, Bi-DEN1 i Bi-DEN2 amplifiquen un fragment intern del fragment amplificat prèviament de 239 i 387 pb respectivament (Taula 2.7) (Bonjoch, X. et al, 2004). La diferència de mida d'ambdós fragments fa que les dues espècies puguin ser detectades simultàniament. Les barreges necessàries de reactius per a dur a terme la reacció es detallen a la Taula 2.8 i els programes de PCR a la Taula 2.9.

Taula 2.7 Iniciadors per a l'amplificació de *Bifidobacterium* spp. (Kaufmann, P. et al, 1997) i la detecció mitjançant PCR múltiple del de *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium* (Bonjoch, X. et al, 2004).

Iniciador	Diana	Seqüència 5'-3'	Amplificat (pb)
Lm26	<i>Bifidobacterium</i> spp.	GATHTGGCTCAGGATGAACG	1417
Lm3	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CGGGTGCTRCCCCTTTCATG	
Bi-ADO1	<i>Bif. adolescentis</i>	CTCCAGTTGGATGCATGTC	279
Bi-ADO2	<i>Bif. adolescentis</i>	CGAAGGCTTGCTCCCAGT	
Bi-DEN1	<i>Bif. dentium</i>	ATCCCGGGGTTTCGCCT	387
Bi-DEN2	<i>Bif. dentium</i>	GAAGGGCTTGCTCCCGA	

Taula 2.8 Reactius i concentracions necessàries per a les reaccions de la PCR genèrica per *Bifidobacterium* spp, (modificació de Kaufmann et al. (1997) i la PCR múltiple ADO-DEN (Bonjoch, X. et al, 2004).

Reactiu	Lm26-Lm3		PCR múltiple ADO-DEN	
	Volum afegit	Concentració final	Volum afegit	Concentració final
Tampó 10x ¹ (Eppendorf)	5 µl	1X	2,5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM) (Epp.)	1 µl	500 µM		
dNTPs (25mM) (Epp.)	0,4 µl	200 µM	0,2 µl	200 µM
Iniciadors Lm26/Lm3 (5mM)	3 µl	0,3 µM		
Iniciadors ADO (5µM)			1,5 µl	0,25 µM
Iniciadors DEN (5µM)			3 µl	0,5 µM
Taq (5U/ml) (Eppendorf)	0,4 µl	2 U	0,2 µl	1 U
ADN	2 µl		1,5 µl	
H ₂ O	35,2 µl		16,6 µl	
Volum Total	50 µl		30 µl	

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

Taula 2.9 Programes de PCR per a l'amplificació de *Bifidobacterium* spp. i per a la PCR múltiple ADO-DEN.

	Im 3/Im 26		ADO-DEN	
	94° C	2 min	94° C	5 min
35 cicles	94° C	1 min	94° C	20 s
	67° C	3 min	55° C	20 s
	72° C	4 min	72° C	30 s
	72° C	7 min	72° C	5 min
	4° C	∞	4° C	∞

La visualització dels fragments amplificats s'ha efectuat en gels d'agarosa amb una concentració del 0,8% en TBE 1X (Annex II) el primer fragment amplificat, i del 3% els amplificats resultants de la PCR múltiple. El gel s'ha tenyit amb una solució de bromur d'etidi (Annex II).

2.2.3.3 Detecció de la proteïna de superfície esp d'*Enterococcus faecium*

Les soques patògenes d'*Ent. faecium* que expressen la proteïna de superfície esp es troben en una baixa concentració a l'aigua residual. Això fa que el mètode descrit per a la seva detecció es basi en un cultiu i enriquiment previ a la detecció per PCR, per tal d'incrementar-ne la concentració. En aquest estudi s'avaluen mètodes moleculars independents de cultiu i per tant s'ha analitzat la presència del gen esp en l'aigua residual mitjançant la PCR sense el cultiu i enriquiment previ. En algunes mostres s'ha analitzat paral·lelament la detecció utilitzant l'enriquiment previ tal i com s'indica pels autors del mètode per tal de comprovar l'eficàcia de la detecció molecular (Scott, T.M. et al, 2005). La metodologia utilitzada per al cultiu i enriquiment s'ha comentat a l'Apartat 2.2.2.3.

Per a la detecció del gen de la proteïna de superfície esp d'*Ent. faecium* mitjançant PCR (Scott, T.M. et al, 2005) s'ha utilitzat un iniciador que reconeix específicament esp d'*Ent. faecium* d'humans (Scott, T.M. et al, 2005) i un iniciador per la proteïna esp present en altres espècies d'*Enterococcus* (Hammerum, A.M. et al, 2002). La seqüència dels iniciadors es mostra a la Taula 2.10. La barreja i la concentració de reactius utilitzats es detalla a la taula 2.11 i el programa per a la PCR de la taula 2.12.

Taula 2.10 Iniciadors per a la detecció del gen de la proteïna *esp* d'*Ent. faecium* específica d'humans.

Iniciador	Seqüència 5'-3'	Amplificat
Específic del gen <i>esp</i> de <i>Ent. faecium</i> d'humans	TATGAAAGCAACAGCACAAGTT	680 pb
Universal pel gen de proteïnes <i>esp</i> d' <i>Enterococcus</i>	ACGTCGAAAGTTCGATTTC	

Taula 2.11 Reactius i concentracions necessàries per a la reacció de PCR del marcador del gen *esp* d'*Ent. faecium*.

Reactiu	Volum afegit	Concentració final
Tampó 10x ¹ (Eppendorf, Hamburg, Alemanya)	5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM) (Eppendorf)	0,8 µl	400 µM
dNTPs (25mM) (Eppendorf)	0,4 µl	200 µM
Iniciadors (5µM)	3 µl	0.3 µM
Taq (5U/µl) (Eppendorf)	0,5 µl	2.5 U
ADN	5 µl	
H ₂ O	32,3 µl	
Volum Total	50 µl	

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

Taula 2.12 Programa per a la reacció de PCR del marcador del gen *esp* d'*Ent. faecium*.

	95° C	5 min
35 cicles	94° C	1 min
	58° C	1 min
	72° C	1 min
	72° C	7 min
	4° C	∞

Fruit de l'amplificació de gen de la proteïna *esp* s'obté un producte amplificat de 680 pb que s'ha visualitzat en un gel d'agarosa a l'1,5% en TBE 1x (Annex II) i tenyit en una solució de bromur d'etidi (Annex II).

2.2.3.4 Detecció d'ADN mitocondrial de cèl·lules humanes, bovines i porcines

S'ha descrit varies PCRs niuades per tal de detectar l'ADN mitocondrial d'humans, bovins i porcins (Martellini, A. et al, 2005). Els iniciadors són específics de gens codificats en l'ADN mitocondrial (Taula 2.13) i amplifiquen amb dues PCRs consecutives el possible marcador de contaminació fecal a l'aigua. La concentració de reactius de la barreja està detallada a la Taula 2.14 i és la mateixa en les sis PCRs descrites, així com el programa de PCR (Taula 2.15).

Taula 2.13 Iniciadors per a l'amplificació mitjançant PCRs niuades de l'ADN mitocondrial humà, boví i porcí.

Iniciador	Diana	Seqüència 5'-3'	Amplificat
Humito2-G		AGCCCTTCTAAACGCTAATCCAAGCCT	
Humito2-D	Gen de la NADH deshidrogenasa subunitat 5 d'humans	CTTGTCAGGGAGGTAGCGATGAGA	659
Humito11-G		CCACTACTAGGCCTCCTCCTA	
Humito11-D		TAGCGATGAGAGTAATAGATAGGG	612
Pomito3-G		GGCCACATTAGCACTACTCAACATC	
Pomito3-D	Gen de la citocrom c oxidasa subunitat II de porcins	AGATCCGATGATTACGTGCAAC	788
Pomito11-G		CTCTATACTCTTACTATCTCTAGGAC	
Pomito11-D		ATACGCCTAGTGCAATGGTGATGGA	400
Bomito1-G		ACATACCCTTGATTGGACTAGCAT	
Bomito1-D	Gen de la proteïna Nadlt5 de bovins	CTTGAAGGCGTTTGAGGGGTAGTGAT	934
Bomito11-G		GATTGGACTAGCATTAGCTGCAACC	
Bomito11-D		GTAAGCGTTTGATAGAGTTGATCAGA	733

Taula 2.14 Reactius i concentracions necessàries per a les reacció de les PCRs niuades de l'ADN mitocondrial.

Reactiu	Volum afegit	Concentració final
Tampó 10x ¹ (Eppendorf, Hamburg, Alemanya)	5 µl	1x
dNTPs (25mM) (Eppendorf)	0,4 µl	200 µM
Iniciadors (5µm)	2 µl	0.2 µM
Taq (5U/ml) (Eppendorf)	0,5 µl	2.5 U
ADN	2 µl	,
H ₂ O	38,1 µl	
Volum Total	50 µl	

¹500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,3, 15mM MgCl₂, 1% Tritó x10

Taula 2.15 Programa de PCR per a l'amplificació de l'ADN mitocondrial de diferents hostes.

	94° C	5 min
35 cicles	94° C	40 s
	55° C	1 min
	72° C	2 min
	72° C	10 min
	4° C	∞

Els productes de les PCRs s'han visualitzat en gels d'agarosa a una concentració de l'1,5% en TBE 1x (Annex II) i tenyits en una solució de bromur d'etidi (Annex II).

2.2.4 Anàlisi estadística i obtenció de models

L'eficàcia dels mètodes analitzats per a poder determinar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua s'ha calculat mesurant la seva sensibilitat i l'especificitat.

La *sensibilitat* és la capacitat del mètode per a detectar el marcador. Es calcula a partir de la relació del valors veritables positius i de totes les mostres que són i haurien de ser positives.

$$Sensibilitat = \frac{VP}{VP + FN}$$

VP: Veritables Positius
FN: Falsos Negatius

L'*especificitat* és la probabilitat de detectar correctament una mostra negativa. Es calcula a partir de la relació dels valors veritables negatius i de totes les mostres que són i haurien de ser negatives.

$$\text{Especificitat} = \frac{VN}{VN + FP}$$

VN: Veritables Negatius

FN: Falsos Positius

Com que pot haver-hi falsos positius deguts a interferències amb la microbiota ambiental, s'ha utilitzat el teorema Bayesià per estimar la probabilitat de que la detecció d'un determinat marcador sigui el resultat d'un veritable positiu (encert). Per exemple, si s'analitza un marcador humà, la probabilitat de que si el resultat és positiu hi hagi realment contaminació humana a la mostra.

$$P(H/T) = \frac{P(T/H)P(H)}{P(T/H)P(H) + P(T/H')P(H')}$$

P(T/H): probabilitat de que un resultat positiu sigui degut a un positiu real

P(T/H'): probabilitat de que un resultat positiu no sigui degut a un positiu real

P(H): probabilitat de detecció del marcador

P(H'): probabilitat de que el marcador estigui absent 1-P(H)

A partir dels resultats obtinguts de l'anàlisi molecular de les mostres, s'han desenvolupat models capaços de donar una aproximació a una predicció de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua. S'han avaluat diferents mètodes estadístics i numèrics:

- el mètode lineal LDA amb estimació de l'error per LOOCV
- el mètode quadràtic
- arbres de decisió
- arbres de decisió donant un valor (no quantitatiu) als valors perduts
- el mètode bayesià ingenu
- el mètode de veïns més propers (K=2 i K=3)

L'aplicació d'aquests mètodes han permès la definició de models de predicció de l'origen de la contaminació fecal que mostren el màxim encert possible amb el nombre menor d'indicadors. Dels models que ha estat possible, s'ha avaluat també l'estadístic kappa. El valor kappa és una mesura de la capacitat de que dos resultats (en aquest cas l'observat i l'esperat) coincideixen sigui real o que en contra del que s'espera, es degui a l'atzar. Els valors de kappa van des de +1 (valor que mostra un acord total entre els dos resultats) a -1 (valor que mostra un desacord total) passant pel valor 0

que suggereix que la coincidència de resultat es deu a l'atzar. L'estadístic kappa es calcula a partir de l'equació:

$$\kappa = \frac{P(a) - P(e)}{1 - P(e)}$$

$\kappa < 0$	no existeix acord entre els resultats observats i els esperats
$0 < \kappa < 0,2$	existeix un acord dèbil
$0,2 < \kappa < 0,4$	existeix un lleuger acord
$0,4 < \kappa < 0,6$	existeix un acord moderat
$0,6 < \kappa < 0,8$	existeix un bon acord
$0,9 < \kappa < 1$	existeix un acord casi perfecte entre els

On $P(a)$ és la probabilitat d'acord entre ambdós resultats (en aquest cas la probabilitat d'encert) i $P(e)$ la probabilitat de que els resultats coincideixen es degui a l'atzar.

2.3 Resultats

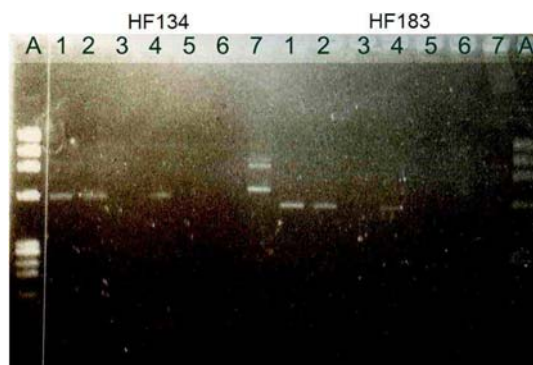
2.3.1 Detecció del grup *Bacteroidetes*

Prèviament a l'anàlisi de mostres ambientals es va avaluar els marcadors amb soques conegudes del gènere *Bacteroides*. Els iniciadors del grup *Bacteroidetes* han estat definits a partir de mostres ambientals i per tant no tenen perquè donar un resultat positiu a l'analitzar soques cultivades (comunicació personal de Field, K.G.). Utilitzant l'iniciador específic per humans HF134 s'ha detectat les espècies: *B. thetaiotaomicron* i *B. vulgatus*. L'anàlisi amb el marcador CF128 específic de remugants ha detectat dues soques: la soca tipus de *B. fragilis* i la seva soca RYC 2056. En canvi els marcadors HF183 i CF193 han donat negatiu per totes les soques cultivables analitzades.

S'ha analitzat 112 i 113 mostres utilitzant els iniciadors indicadors de contaminació fecal humana: HF183F/Bac708R i HF134F/Bac708R i 113 i 114 mostres amb els iniciadors de contaminació fecal bovina: CF193F/Bac708R i CF128F/Bac708R. Les anàlisis fetes a l'aigua residual urbana han donat 12 mostres positives de les 40 mostres analitzades utilitzant el marcador HF134 i 20 mostres positives de les 40 amb el marcador HF183 (Taula 2.16). Aquests resultats indiquen una sensibilitat molt baixa del 30 i del 50% respectivament en la zona analitzada (Taula 2.17). Hi ha un elevat percentatge de mostres d'aus positives per aquests marcadors: 12 mostres positives de 25 quan s'analitza el marcador HF134; i 15 de 26 quan s'analitza l'HF183 (Taula 2.16). La baixa sensibilitat dels marcadors i aquests resultats fan disminuir l'especificitat obtinguda que és de: 80,6% per HF134 i 71,2% per HF183 (Taula 2.17). A la figura 2.2 s'observa algunes mostres analitzades amb aquests iniciadors.

El marcador de remugants CF128 presenta una especificitat del 100% (Taula 2.17) però una baixa sensibilitat (26,32%) ja que només 5 de les 19 mostres analitzades d'aigua residual d'origen boví han donat un resultat positiu (Taula 2.16). El marcador de remugants CF193 s'ha detectat, solament, en una mostra d'aus. Cap mostra de remugants ha donat positiva per aquest marcador (Taula 2.16).

Figura 2.2 Mostres amplificades amb els iniciadors de Bacteroidetes específics d'humans. A: marcador *Phi X 174* DNA/Hae III; Carrils: 1-2: Mostres humanes; 3: Mostra porcina; 4-5 Mostres d'aus; 6: control negatiu; 7: *B. thetaiotaomicron*.



Taula 2.16 Número de mostres positives de diferents orígens pels marcadors del grup Bacteroidetes.

Origen	HF134	HF183	CF128	CF193
Humà	12/40	20/40	0/40	0/39
Boví	1/19	3/19	5/19	0/19
Aus	12/25	15/26	0/26	1/26
Porcí	1/28	3/28	0/29	0/29
Núm. mostres	112	113	114	113

2.3.2 Detecció de *Bifidobacterium adolescentis* i *Bif. dentium*

A la Taula 2.17 i 2.18 es mostren els resultats obtinguts de l'anàlisi de *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium* mitjançant la PCR múltiple de les diferents mostres d'aigua residual de diferents orígens analitzades. Fruit de l'amplificació amb PCR múltiple s'obté dues bandes d'ADN: una de 387 pb corresponent a *Bif. dentium* i l'altra de 279 pb corresponent a *Bif. adolescentis*. A la Figura 2.3 es mostra un seguit de mostres amplificades utilitzant la PCR ADO-DEN.

Bif. adolescentis presenta una sensibilitat del 95,6%. Tan sols dues de les mostres entre les 45 mostres d'aigua residual d'origen humà analitzades van tenir un resultat negatiu. *Bif. dentium* s'ha detectat en 29 de les 45 mostres d'origen humà analitzades, per tant mostra una sensibilitat més baixa: del 64,4%. L'especificitat és més alta en *Bif. dentium* essent de 91,8% i 74,3% en *Bif. adolescentis* (Taula 2.17).

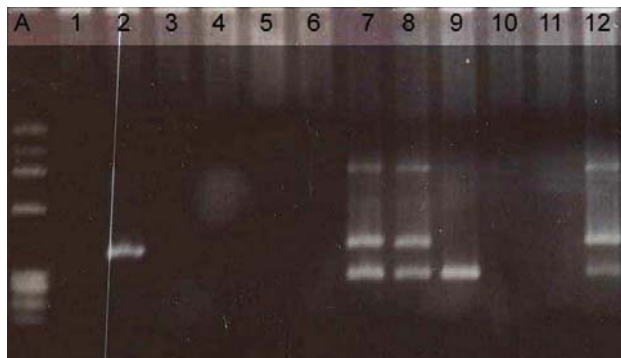
Taula 2.17 Sensibilitat, especificitat i probabilitat d'encert dels 11 marcadors analitzats.

Diana	Marcador	Veritables positius	Sensibilitat	Veritables negatius	Especificitat	Encert
Bacteroidetes humans	HF134	12/40	30%	58/72	80,6%	31,8%
	HF183	20/40	50%	52/73	71,2%	49,7%
Bacteroidetes Bovins	CF128	5/19	26,3%	95/95	100%	100%
	CF193	0/19	0%	93/94	98,9%	0%
<i>Bif. adolescentis</i>	ADO	43/45	95,6%	55/74	74,3%	79,8%
<i>Bif. dentium</i>	DEN	29/45	64,4%	67/73	91,8%	76,8%
Gen <i>esp</i> sense cultiu	Esp _{sc}	1/23	4,4%	76/77	98,7%	5,9%
Gen <i>esp</i> amb cultiu	Esp _c	10/13	76,9%	15/22	68,2%	69,5%
ADN mitocondrial humana	Humito	38/45	84,4%	30/73	41,1%	75,9%
ADN mitocondrial boví	Bomito	16/19	84,2%	80/92	87%	81%
ADN mitocondrial porcí	Pomito	29/33	87,9%	73/81	90,1%	70,4%

Taula 2.18 Resultats obtinguts de l'anàlisi dels marcadors *Bif. adolescentis* (ADO), *Bif. dentium* (DEN), de la proteïna *esp* amb cultiu (esp_c) i sense cultiu (esp_{sc}) d'*Ent. faecium* per les mostres de diferents orígens analitzades.

Origen	ADO	DEN	esp _{sc}	esp _c
Humà	43/45	29/45	1/23	10/13
Boví	6/17	1/17	0/16	1/5
Aus	4/22	3/21	0/17	0/7
Porcí	9/35	2/35	1/21	6/10
Núm. mostres	119	118	77	35

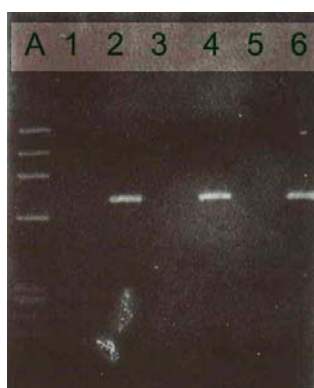
Figura 2.3 Mostres amplificades amb la PCR múltiple ADO-DEN. A: marcador *Phi X 174* DNA/Hae III; Carrils 1-4: Mostres porcines; 5-6: Mostres d'aus; 7-9: Mostres humanes; 10: aigua de pou; 11: control negatiu; 12: *Bif. dentium* (banda superior: 387 pb) i *Bif. adolescentis* (banda inferior: 279 pb).



2.3.3 Detecció de la proteïna esp d'*Enterococcus faecium*

A la taula 2.18 s'indiquen les mostres positives i negatives pel gen *esp* de l'aigua residual de cada origen. L'amplificació sense cultiu previ detecta 1 mostra de les 23 mostres d'aigua residual urbana analitzades. La sensibilitat de l'anàlisi sense cultiu és d'un 4,4% (Taula 2.17); en canvi, quan s'aplica la filtració, el cultiu i l'enriquiment previ de la mostra la sensibilitat incrementa fins un 76,9%. Per tant, en la majoria de casos caldrà filtrar, incubar i enriquir la mostra abans d'amplificar-la amb la tècnica de PCR (Figura 2.4).

Figura 2.4 Gen *esp* d'*Ent. faecium* de mostres humanes amb i sense cultiu previ. A: marcador *Phi X 174* DNA/Hae III. Carrils 1 i 3: mostres humanes sense cultiu previ; Carrils 2 i 4: mostres humanes amb cultiu previ. 5: control negatiu; 6: soca C68 d'*Ent. faecium*.



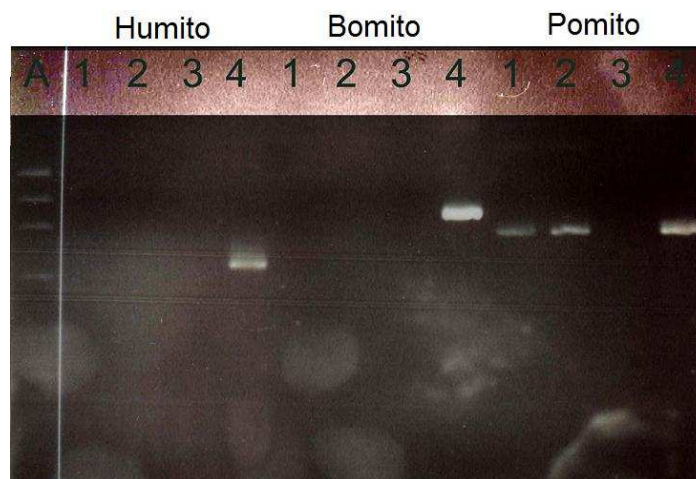
S'ha detectat el gen *esp* d'*Ent. faecium* en una de les mostres de porcs analitzada directament per PCR. Quan no hi ha un cultiu previ de la mostra l'especificitat serà de 98,7%, en canvi és del 68,2% quan s'ha realitzat el cultiu de la mostra (Taula 2.17). En aquest últim cas s'ha obtingut sis mostres porcines positives pel gen *esp* de les deu analitzades. Totes 6 mostres s'havien obtingut a la mateixa granja, Porcí 5. Les altres

quatre mostres analitzades i que han donat un resultat negatiu provenien de diferents escorxadors. En una de les 5 mostres bovines analitzades també s'ha detectat el gen *esp* d'*Ent faecium* (Taula 2.18).

2.3.4 Detecció de l'ADN mitocondrial de diferents hostes

La detecció dels diferents marcadors de l'ADN mitocondrial han mostrat una bona especificitat i sensibilitat. En la majoria de casos s'obté un bon resultat amb la primera amplificació. Quan s'utilitzen els iniciadors específics de porcí, s'obtenen millors resultats utilitzant els iniciadors de la primera amplificació que amb la segona. A la segona amplificació apareixen vàries bandes de diferents mides. A la Figura 2.5 es mostren els resultats per la primera amplificació de mostres porcines.

Figura 2.5 Amplificació de mostres porcines amb els iniciadors de la primera PCR d'ADN mitocondrial. Humito: iniciadors d'ADN mitocondrial humà (659 pb); Bomito: iniciadors d'ADN mitocondrial boví (934 pb); Pomito: iniciadors d'ADN mitocondrial porcí (788 pb). 1: Humà; 2: Boví; 3: porcí. A: marcador *Phi X 174* DNA/Hae III; Carrils 1 i 2: mostres porcines; 3: control negatiu; 4: control positiu.



La sensibilitat obtinguda amb els tres marcadors és relativament alta: 84,4% per al marcador d'ADN mitocondrial humà (Humito), 84,2% per al marcador boví (Bomito) i 87,9% per al marcador porcí (Pomito) (Taula 2.17). La detecció mitjançant els iniciadors humans té una baixa especificitat: 41,1% ja que detecta 9 mostres de les 19 mostres bovines analitzades, 12 de 19 mostres d'aus i 22 de 35 mostres porcines (Taula 2.19). La resta de marcadors: el boví i el porcí, tenen una especificitat del 87% i 90,1% respectivament (Taula 2.17).

Taula 2.19 Resultats obtinguts de l'anàlisi de les mostres amb els diferents marcadors d'ADN mitocondrial.

Origen	ADN mitocondrial		
	Humito	Bomito	Pomito
Humà	38/45	5/35	4/36
Boví	9/19	16/19	3/18
Aus	12/19	2/26	1/27
Porcí	22/35	5/31	29/33
Núm. mostres	118	111	114

2.3.5 Models predictius

Per a efectuar els models predictius de la contaminació fecal a l'aigua s'ha utilitzat un total de 136 de les 144 mostres analitzades per diferents marcadors. S'han eliminat aquelles mostres, que havien estat analitzades amb menys de 3 d'ells.

Un dels objectius d'aquest treball és la comparació de mètodes moleculars per a la detecció de la contaminació fecal. La detecció del gen de la proteïna *esp* d'*Ent. faecium* precisa d'un cultiu i enriquiment previ a l'extracció de l'ADN. L'anàlisi d'aquest marcador de la mostra crua per PCR no serveix per a la determinació de l'origen ja que només s'ha detectat en dues mostres: una humana i una porcina (Taula 2.18). Per tant s'han eliminat aquests dos anàlisis per a la realització dels models. El marcador CF193 tan sols ha detectat com a positiva una mostra d'aus. Per aquesta raó, també s'ha prescindit d'ell per a la realització dels models.

El models predictius s'han realitzat a partir de 136 mostres:

- 49 mostres humanes
- 21 mostres bovines
- 29 mostres d'aus
- 37 mostres porcines

i 8 marcadors:

- marcadors del grup Bacteroidetes: HF134, HF183 i CF128

→ *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium*: ADO i DEN

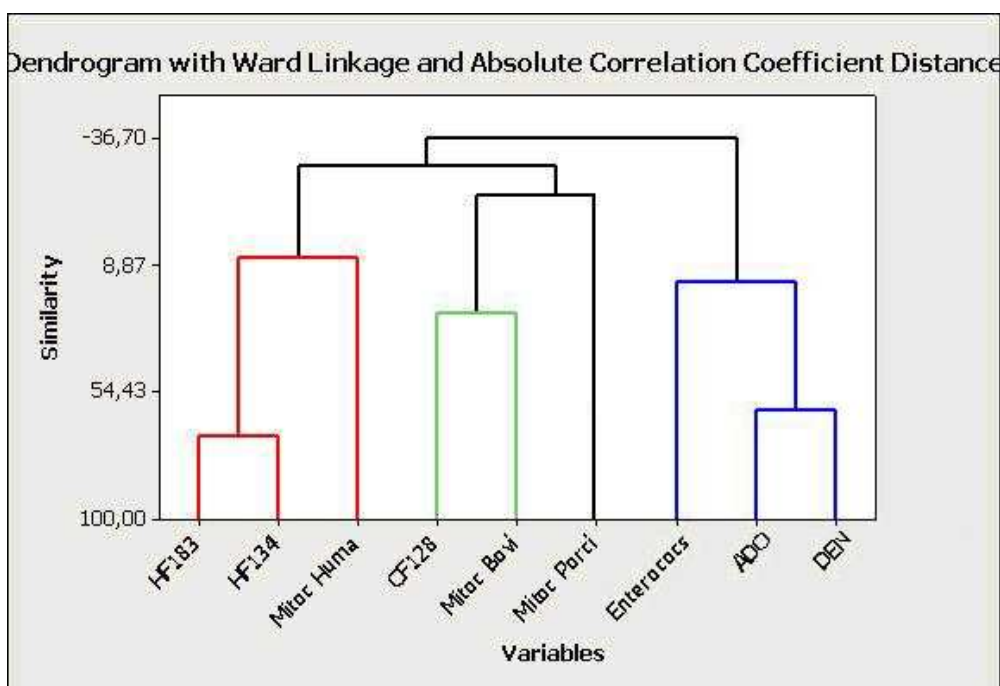
→ marcadors d'ADN mitocondrial d'humans, bovins i porcins: Humito, Bomito i Pomito

2.3.5.1 *Avaluació dels marcadors considerant 4 orígens de les mostres: humà, boví, porcí i avícola.*

S'ha anomenat els diferents orígens numèricament de manera que les mostres d'origen humà es classifiquen al grup **1**, les de bovins al grup **2**, les d'aus al grup **3** i les de porcins al grup **4**.

A la figura 2.6 es mostra les correlacions absolutes entre les variables estudiades. Existeix una bona correlació entre HF134 i HF183; entre ADO i DEN; i entre CF128 i Bomito. Pomito no correlaciona amb les altres variables.

Figura 2.6 Correlació per regressió lineal entre els diferents marcadors analitzats.



- Mètode lineal LDA: Per a l'aplicació d'aquest model s'ha utilitzat 78 de les 136 mostres analitzades. Ja que s'ha prescindit d'aquelles que no han estat analitzades pels 8 marcadors escollits en aquest model. Utilitzant aquest mètode s'obté un 78,2% d'encert. CF128 presenta un elevat número de mostres negatives repartides entre els diferents grups. Si s'elimina el marcador CF128 l'encert incrementa fins a un 79,5%. La matriu de confusió d'aquest darrer mètode és:

S'ha classificat al Grup	Grup veritable			
	1	2	3	4
1	26	0	1	2
2	1	10	1	3
3	1	0	10	3
4	1	3	0	16
N Total	29	13	12	24
N correctes	26	10	10	16
Proporció	0,897	0,769	0,833	0,667

N = 78 N classificats correctes= 62 Proporció Correcta= 0,795

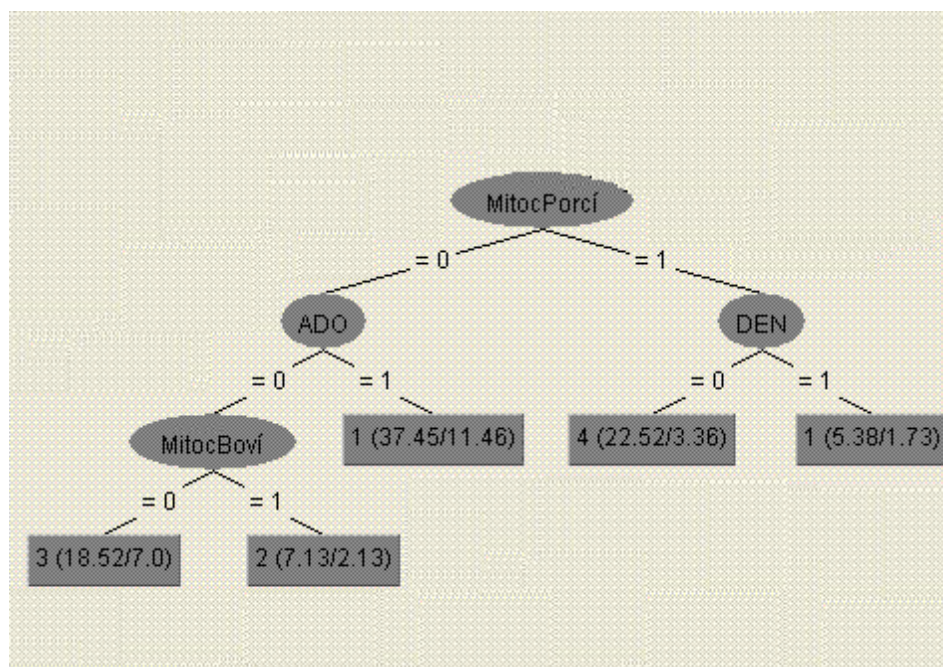
1= Humà; 2=Boví; 3= Avícola; 4= Porcí

En aquest model el grup 4 (porcí) és el que més penalitza ja que 8 mostres resten mal classificades.

- Arbre de decisió: S'ha realitzat diferents arbres de decisió. Aquell que ha mostrat un resultat més més òptim s'ha obtingut utilitzant quatre variables: Pomito, Bomito, ADO i DEN i ha mostrat un 70,6% d'encert. El Kappa estadístic obtingut és de 0,582. L'arbre de decisió obtingut s'observa a la figura 2.7.

Un altre arbre de decisió basat, també, en quatre variables (HF183, ADO, Bomito i Pomito) té un encert major, del 71%. Tot i així la diferència no sembla significativa.

Figura 2.7 Arbre de decisió obtingut utilitzant els marcadors: ADO, DEN, Pomito i Bomito per a determinar els diferents orígens de contaminació fecal. Detecció negativa =0; detecció positiva =1. Els valors 1, 2, 3 i 4 de l'interior dels globus corresponen als orígens humà, boví, avícola i porcí respectivament. La suma dels dos valors entre parèntesi representa el número de mostres que han donat aquest resultat. El primer valor són aquelles mostres que amb el resultat indicat s'han classificat correctament i el segon valor les que s'han classificat incorrectament.



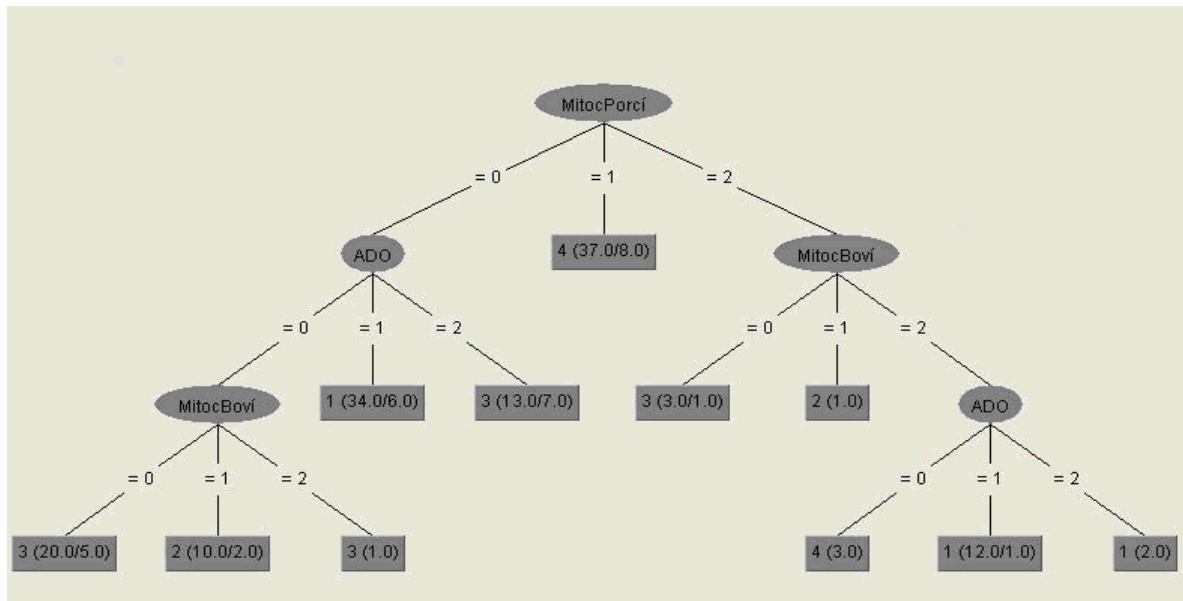
- Mètode bayesià ingenu: Per la utilització d'aquest mètode s'ha seleccionat les variables CF128, HF134, ADO i DEN i Humito, Pomito i Bomito i s'obté un encert del 78%. Les variables més rellevants són: ADO i els tres marcadors mitocondrials, seguits de CF128 i finalment DEN i HF183. No es pot eliminar cap variable sense disminuir el rendiment del model. La matriu de confusió amb un kappa estadístic de 0,688 és:

S'ha classificat al Grup	Grup veritable			
	1	2	3	4
1	47	6	9	3
2	0	11	1	0
3	2	1	18	4
4	0	3	1	30
Total N	49	21	29	37
N correctes	47	11	18	30
Proporció	0,897	0,769	0,833	0,667

N = 136 N classificats correctes= 106 Proporció Correcta= 0,78
1= Humà; 2=Boví; 3= Avícola; 4= Porcí

- Mètode de veïns més propers K=2: Utilitzant aquest mètode s'obté un 75% d'encert quan es seleccionen els marcadors: CF128, HF134, ADO, DEN, Bomito i Pomito. El Kappa estadístic és 0,649.
- Arbre de decisió donant un valor (no quantitatiu) als resultats perduts: Aquest arbre de decisió es diferencia dels altres perquè adjudica un valor numèric als valors perduts o no analitzats. El model tracta aquest valor com si fos un resultat més. De manera que hi haurà un resultat 0 (detecció negativa), un resultat 1 (detecció positiva) i un resultat 2 (valors perduts). Aquest arbre utilitza tres marcadors: ADO, Bomito i Pomito i s'obté un encert del 74,3% i una estadística Kappa de 0,6436, ambdós valors són majors que els obtinguts quan no es consideraven els casos perduts (Fig 2.8).

Figura 2.8 Arbre de decisió obtingut amb les variables: ADO, Pomito i Bomito donant un valor (2) a les observacions perdudes. Detecció negativa pel marcador =0; detecció positiva pel marcador =1; valor perdut =2. Els valors 1, 2, 3 i 4 de l'interior dels globus corresponen als orígens humà, boví, avícola i porcí respectivament. La suma dels dos valors entre parèntesi representa el número de mostres que han donat aquest resultat. El primer valor són aquelles mostres a les quals se'ls ha classificat correctament i el segon valor les classificades incorrectament.

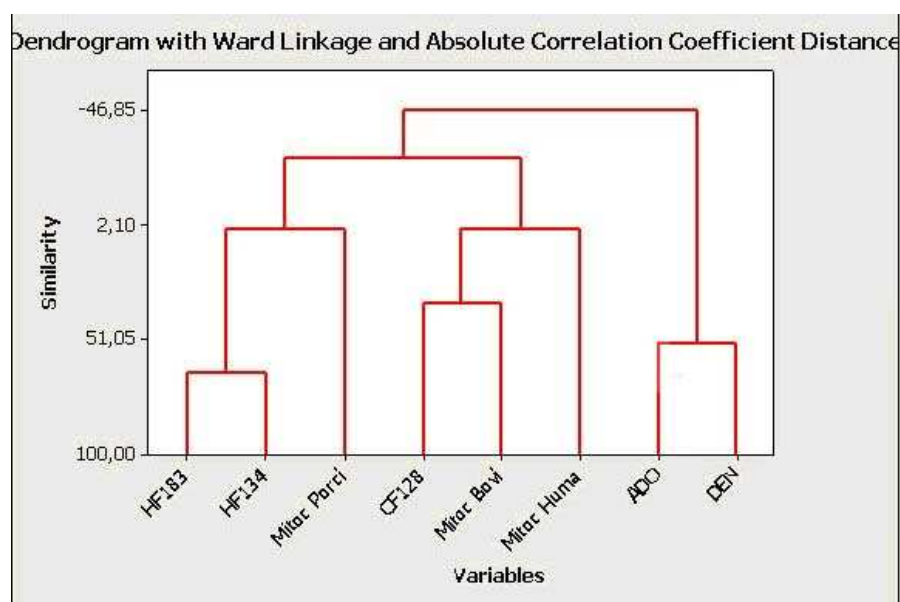


2.3.5.2 Avaluació dels marcadors considerant humà respecte no humà.

Per a dur a terme aquests anàlisis s'ha classificat en el grup **0** les mostres d'origen humà i en el grup **1** les mostres d'origen no humà.

Les correlacions significatives entre les variables estudiades mostren resultats similars als que s'han obtingut en l'avaluació dels 4 orígens diferents (Figura 2.9). Existeix una bona correlació entre HF134 i HF183; entre ADO i DEN; i entre CF128 i Bomito. L'ADN mitocondrial porcí no correlaciona amb les altres variables.

Figura 2.9 Correlació per regressió lineal entre els diferents marcadors analitzats.



- Mètodes lineal LDA i quadràtic QDA, estimació de l'error per LOOCV: El millor model lineal LDA s'ha obtingut quan s'ha eliminat la variable Humito. D'aquesta manera es passa de 78 a 81 mostres analitzades pels 7 marcadors que es tenen en compte en aquest model. Amb les variables HF134, ADO, DEN, Bomito i Pomito s'ha obtingut un encert de 88,9%. Amb el model quadràtic s'arriba al 90,1% d'encert. No s'ha obtingut cap combinació de menys de 5 marcadors que mostri un més bon rendiment. La matriu de confusió per al model quadràtic és:

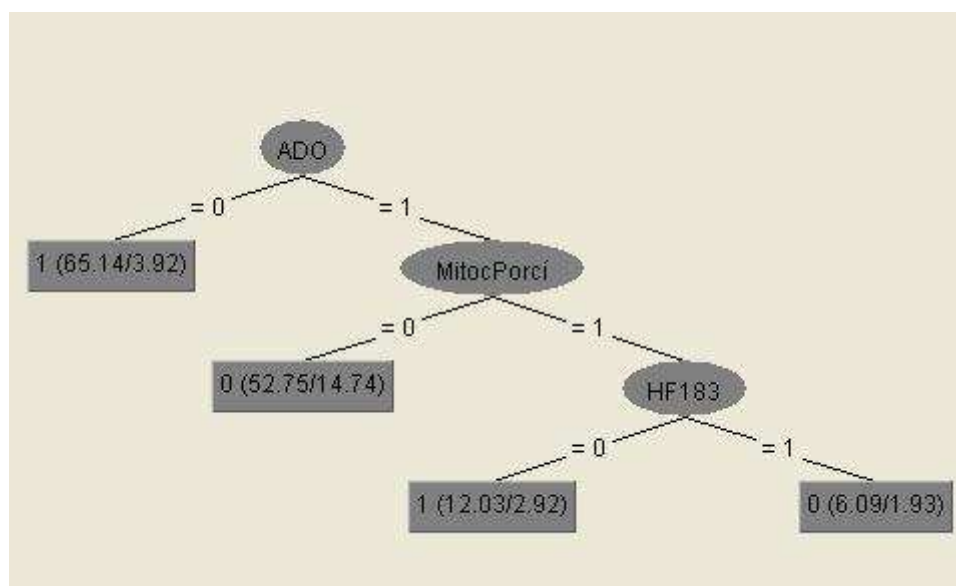
S'ha classificat al grup	Grup veritable	
	0	1
0	26	5
1	3	47
N total	29	52
N correcte	26	47
Proporció	0,897	0,904

N = 81 N classificats correctes = 73 Proporció Correcta = 0,901

0= Humà 1= No humà

- Arbre de decisió: En aquest cas s'ha utilitzat el total d'observacions (n=136). L'arbre òptim que s'ha obtingut avaluant els diferents marcadors és el que utilitza: ADO, HF183 i Pomito i s'observa a la figura 2.10. Aquesta altre, mostra un encert del 87,5% (Kappa estadístic=0,7324). Un altre arbre utilitzant 4 marcadors: ADO, DEN, Bomito i Pomito té un encert de 85,3%.

Figura 2.10 Arbre de decisió obtingut utilitzant els marcadors: ADO, HF183 i ADN mitocondrial de porcí per a detectar contaminació humana o no humana. Detecció negativa =0; detecció positiva =1. Els valors 0 i 1 a l'interior dels globus corresponen a un origen humà i no humà respectivament. La suma dels dos valors entre parèntesi representa el número de mostres que han donat aquest resultat. El primer valor són aquelles mostres que amb el resultat indicat s'han classificat correctament i el segon valor les que s'han classificat incorrectament.



- Mètode bayesià ingenu: Amb aquest mètodes s'ha obtingut utilitzant 4 variables (ADO, HF183, Bomito i Pomito) un encert del 86,2%. Utilitzant una variable més (ADO, DEN, Humito, Bomito i Pomito) s'encerta el 89% dels assajos.
- Mètode de veïns propers (k=3): En aquest cas també s'ha utilitzat les 136 mostres analitzades i s'ha obtingut un encert del 88,2% amb les variables ADO, HF183 Bomito i Pomito (estadístic Kappa =0,747). La matriu de confusió obtinguda és:

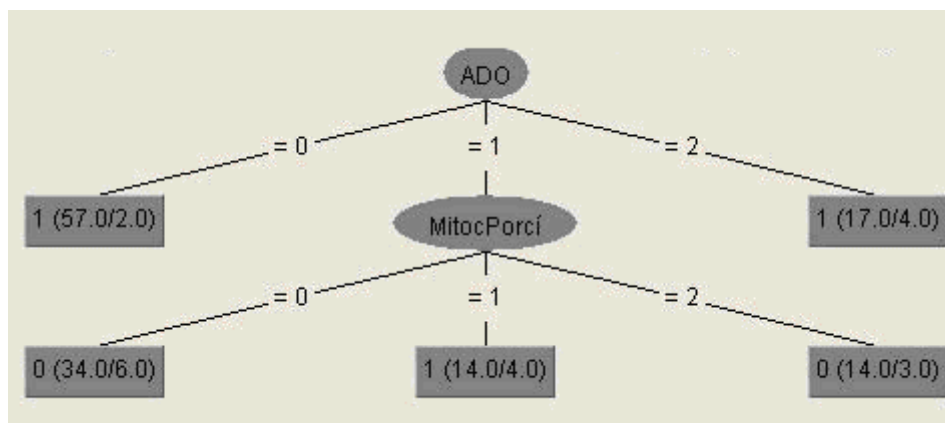
		Grup veritable	
S'ha classificat al grup		0	1
0		42	9
1		7	78
N total		49	87
N correcte		42	78
Proporció		0,857	0,898

N = 136 N classificats correctes = 120 Proporció Correcta = 0,882

0= Humà 1= No humà

- Arbre de decisió donant un valor (no quantitatiu) als resultat perduts (mètode PART): Un dels arbres obtinguts estableix 4 regles encadenades utilitzant les variables ADO, Bomito, Pomito i HF183 per aquest ordre, encerta el 89% dels casos. Un altre arbre utilitzant els marcadors ADO i Pomito classifica correctament el 85,3% de les mostres (Kappa estadístic de 0,681). L'arbre es mostra a la Figura 2.13.

Figura 2.13 Arbre de decisió obtingut utilitzant els marcadors: ADO i ADN mitocondrial de porcí per a detectar contaminació humana o no humana i donat un valor (2) als valors perduts. Detecció negativa =0; detecció positiva =1 valors perduts =2. Els valors 0 i 1 a l'interior dels globus corresponen a un origen humà i no humà respectivament. Tal com s'ha indicat, els valors entre parèntesi corresponen a mostres classificades correctament i incorrectament respectivament.



2.4 Discussió

Els marcadors HF134 i HF183 proposats com específics de contaminació fecal humana i CF128 i CF193 proposats com específics de remugants han estat definits a partir de marcadors moleculars que no havien estat prèviament cultivats (Bernhard, A.E. et al, 2000a; Bernhard, A.E. et al, 2000b). Per tant, poden tenir com a diana espècies de *Bacteroides* que no han estat cultivades ni identificades.

S'ha comprovat la similitud dels iniciadors amb les seqüències dipositades al Ribosomal Data Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). S'ha obtingut que HF134 identifica una única espècie cultivada: *Bacteroides dorei* aïllada de femtes humanes i a 834 espècies que no han estat cultivades. HF183 presenta la mateixa similitud amb *B. dorei* i amb 930 espècies no cultivades. CF128 també presenta una total similitud amb una sola espècie cultivada: *B. barnesiae* i 60 espècies no cultivades. En canvi, CF193 no presenta similitud amb cap seqüència dipositada a la base de dades.

Experimentalment, s'ha pogut detectar *B. thetaiotaomicron* i *B. vulgatus* amb el marcador HF134 i la soca tipus *B. fragilis* i la seva soca RYC 2056 amb el marcador CF128.

Els iniciadors de Bacteroidetes han estat àmpliament utilitzats en estudis de detecció de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Ahmed, W. et al, 2007; Boehm, A.B. et al, 2003; Bower, P.A. et al, 2005; Field, K.G. et al, 2003; Gawler, A.H. et al, 2007; Gilpin, B. et al, 2003; Griffith, J.F. et al, 2003; Noble, R.T. et al, 2006). La sensibilitat i l'especificitat obtinguda a l'analitzar diferents mostres en diferents àrees geogràfiques amb aquests marcadors es reflecteixen a la taula 2.20. En la majoria dels casos s'observa una elevada sensibilitat i especificitat, tot i que existeix una important variabilitat entre els estudis.

El resultat observats en aquest estudi difereixen significativament dels reportats en la majoria d'altres estudis (Taula 2.20). S'ha observat una molt més baixa sensibilitat en tots els marcadors de Bacteroidetes (Taula 2.17). Cal tenir en compte que en la majoria d'ells les mostres analitzades han estat femtes de diferents orígens i no aigua residual. La microbiota observada pot ser lleugerament diferent.

Taula 2.20 Sensibilitat i especificitat dels marcadors de Bacteroidetes en les diferents àrees geogràfiques estudiades.

Zona analitzada	Autor	Marcador	Mostres	Sensibilitat	Especificitat
Oregon (EUA)	Field et al. 2003	HF134	Riu contaminat	100%	100%
Nebraska (EUA)	Lamandella et al. 2006	HF134	Fosses sèptiques	40% (10)	93,2% (177)
Austràlia	Ahmed et al. 2008	HF134	Femtes	97,3% (52)	95,5% (155)
França	Gourmelon et al. 2007	HF134	Femtes	84% (44)	69% (86)
Catalunya	Aquest estudi	HF134	AR	30% (40)	80,56% (72)
Oregon (EUA)	Field et al. 2003	HF183	Riu contaminat	70%	100%
Oregon (EUA)	Bernhard et al. 2000b	HF183	Femtes	20-85%	85-100%
Oregon (EUA)	Bernhard et al. 2000b	HF183	AR	100%	100%
Nebraska (EUA)	Lamandella et al. 2007	HF183	Fosses sèptiques	40% (10)	99,4% (177)
Austràlia	Ahmed et al.2008	HF183	Femtes	100% (52)	100% (155)
Bèlgica	Seurinck et al. 2005	HF183	Femtes	86%	100%
França	Gawler et al. 2007	HF183	Femtes	100%	91,1%
Irlanda	Gawler et al. 2007	HF183	Femtes	88%	100%
Portugal	Gawler et al. 2007	HF183	Femtes	75,9%	95,6%
Regne Unit	Gawler et al. 2007	HF183	Femtes	80%	100%
Catalunya	Aquest estudi	HF183	AR	50% (40)	71,23% (73)
Oregon (EUA)	Field et al. 2003	CF128	Riu contaminat	100%	89%
Oregon (EUA)	Bernhard et al. 2000b	CF128	Femtes	100%	73%
Llac Michigan (EUA)	Bower et al. 2005	CF128	AR	100%	93%
Nebraska (EUA)	Lamandella et al. 2006	CF128	Femtes	96% (101)	90,2% (82)
França	Gawler et al. 2007	CF128	Femtes	100%	75,6
Irlanda	Gawler et al. 2007	CF128	Femtes	100%	95,6%
Portugal	Gawler et al. 2007	CF128	Femtes	100%	40,8%
Regne Unit	Gawler et al. 2007	CF128	Femtes	100%	80%
Catalunya	Aquest estudi	CF128	AR	26,3% (19)	100% (95)
Oregon (EUA)	Bernhard et al. 2000b	CF193	Femtes	100%	70%
Nebraska (EUA)	Lamandella et al. 2007	CF193	Femtes	90% (101)	91% (82)
França	Gourmelon et al. 2007	CF193	Femtes	95% (44)	100% (86)

Dins el marc del desenvolupament del projecte ICREW (Gawler, A.H. et al, 2007) (<http://www.icrew.info/>) es va analitzar els marcadors HF183 i CF128 a quatre països de la Unió Europea. La sensibilitat del marcador HF183 varia entre el 75,9% (Portugal) i el 100% (França) i l'especificitat està en tots els casos per sobre del 90% (Taula 2.20). A Catalunya s'ha observat una sensibilitat i una especificitat bastant més baixa del 50% i del 71,2% respectivament (Taula 2.17).

El marcador CF128 presenta una sensibilitat del 100% en totes les àrees geogràfiques analitzades. En aquest estudi s'ha detectat una sensibilitat bastant baixa: del 26,32%. L'especificitat d'aquest marcador és molt variable entre 95,6% (França) i 40,8% (Portugal), i en les mostres preses en aquest treball és del 100% (Taula 2.20).

Quan s'analitza el marcador HF134 s'obté, també, una menor sensibilitat per les mostres d'aquest estudi (30%) que en altres àrees estudiades per diferents autors (Taula 2.20).

La diversitat de la microbiota intestinal depèn de la dieta (Satokari, R.M. et al, 2002), de l'edat (Hopkins, M.J. et al, 2002; van Tongeren, S.P. et al, 2005), de la localització geogràfica (Lay, C. et al, 2005) i de l'estat de salut dels individus (Eckburg, P.B. et al, 2005). Uns iniciadors dissenyats a partir de mostres ambientals en una determinada àrea geogràfica poden presentar diferent eficiència quan s'apliquen en altres àrees geogràfiques. Una sensibilitat dels iniciadors molt més baixa a les mostres preses a Catalunya que a la resta dels territoris pot ser deguda a diferències entre la microbiota intestinal. Un únic estudi, dut a terme a Nebraska, presenta uns resultats similars pels indicadors humans amb una sensibilitat del 40% per ambdós marcadors (Lamandella, R. et al, 2007). En aquest cas s'analitzen mostres provinents de fosses sèptiques.

Les condicions utilitzades en l'amplificació d'aquests iniciadors van ser comunicades personalment per la Dr. Field K.G. Quan s'han analitzat les condicions utilitzades en altres estudis s'ha vist que en alguns casos es realitza una segona PCR per tal de millorar la detecció (Field, K.G. et al, 2003; Noble, R.T. et al, 2006) o s'ha modificat el programa de PCR (Gourmelon, M. et al, 2007). Aquestes variacions metodològiques podrien millorar la sensibilitat de detecció.

El marcador CF193 va ser descartat en un estudi per altres autors ja que s'obtenia una elevada variabilitat amb diverses bandes d'ADN de diferents mides (Bower, P.A. et al, 2005). Un altre estudi va utilitzar una variant de l'iniciador CF193 definit a la bibliografia (Bernhard, A.E. et al, 2000b), i per tant, diferent a l'analitzat en aquest

estudi (comunicació personal Field, K.G.) obtenint uns resultats similars als que havien obtingut utilitzant el marcador CF128 (Gourmelon, M. et al, 2007). Els resultats obtinguts en aquest estudi confirmen que l'iniciador CF193 original no presenta l'especificitat i sensibilitat adequades.

Les espècies *Bifidobacterium adolescentis* i *Bif. dentium* han estat identificades en la microbiota intestinal de forma global (Matsuki, T. et al, 2002; Satokari, R.M. et al, 2001a; Suau, A. et al, 1999) i han estat descrites com a indicadors de contaminació fecal humana a l'aigua. Es van descriure tècniques de detecció basades en una hibridació colonial per *Bif. adolescentis* (Lynch, P.A. et al, 2002) o hibridació sobre l'ADN amplificat per *Bif. dentium* (Nebra, Y. et al, 2003). La PCR múltiple ADO-DEN facilita la detecció d'aquestes espècies de manera simultània. Aquest mètode de MST ha estat aplicat a nivell europeu en 5 països Regne Unit, França, Suècia, Xipre i Catalunya. Es va obtenir una sensibilitat i una especificitat similars als obtinguts en aquest estudi (Taula 2.21).

Taula 2.21 Comparació dels resultats obtinguts de la PCR ADO-DEN.

	Sensibilitat		Especificitat	
	ADO	DEN	ADO	DEN
Bonjoch et al. (2004)	100% (22)	77,3% (22)	84,2% (19)	89,5% (19)
Blanch et al. (2006)	93,7% (114)	55% (114)	70,5% (116)	90,5% (116)
Aquest estudi	95,6% (45)	64,4% (45)	74,3% (74)	91,8% (74)

La detecció per PCR múltiple ADO-DEN dona una bona capacitat de discriminació de l'origen de la contaminació fecal entre humà i no humà a les àrees geogràfiques analitzades. Caldrà combinar-la amb altres marcadors per abastar més orígens diferents i incrementar el percentatge d'encert.

El gen *esp* d'*Ent. faecium* és un gen de soques d'*Enterococcus* que presenten certa patogeneïtat i que, per tant, presenten una baixa o moderada, però variable incidència a la població: del 0-78% (Whitman, R.L. et al, 2007). La incidència incrementa quan s'analitza aigua residual provinent d'una població humana més gran. Sense la concentració de la mostra, cultiu i enriquiment previ no hi ha suficient concentració del gen per a ser detectat amb la tècnica de PCR. L'anàlisi de la proteïna *esp* d'*Enterococcus faecium* mitjançant la reacció de PCR directament sobre l'aigua crua és inviable com a marcador molecular de MST. Una de les avantatges dels mètodes moleculars és la rapidesa de l'anàlisi prescindint del cultiu requerit en les

tècniques tradicionals i per tant, no pot ser utilitzat com a tal. Caldria desenvolupar una PCR-Q que fos suficientment sensible com per poder detectar els nivells baixos del gen en aigües residuals.

Quan es segueix la metodologia descrita amb enriquiment previ (Scott, T.M. et al, 2005) s'obté una sensibilitat del 76,9% i una especificitat del 68,18%. La sensibilitat descrita per l'autor era del 97% en aigua residual i un 100% d'especificitat (Scott, T.M. et al, 2005). Un altre estudi a la mateixa àrea revela un 93,1% de sensibilitat i interferències amb mostres de gossos i gavines (Whitman, R.L. et al, 2007). En aquest estudi s'ha detectat aquest marcador en totes les mostres de porcs obtingudes d'una mateixa granja i en una mostra de femtes de bestiar boví.

Els resultats positius descrits en porcs, podrien ser deguts a la inespecificitat del marcador en l'àrea geogràfica estudiada. La distribució geogràfica d'aquest marcador ha estat analitzada a partir d'estudis de diferents autors. S'ha analitzat a la zona dels grans llacs (EUA i Canadà) (Jenkins, M.J. et al, 2005) i s'ha aplicat a l'estat de Georgia (EUA) (McDonald, J.L. et al, 2006) i a Austràlia (Ahmed, W. et al, 2007) on s'ha obtingut resultats semblants als del marcador HF134.

Per una altra banda, a Dinamarca es va realitzar un estudi per avaluar la distribució de la proteïna *esp* en soques d'*Ent. faecium* i *Ent. faecalis* aïllades d'humans, de porcs i d'aus mitjançant PCR. L'iniciador revers que es va utilitzar, és el mateix que s'ha utilitzat en aquest estudi per a detectar la proteïna *esp* marcadora de contaminació fecal humana. Es va obtenir resultats positius en un 34,5% d'espècies d'*Ent. faecium* aïllades d'humans, en un 41,7% d'*Ent. faecalis* aïllats, també, d'humans i en un 8% d'*Ent. faecalis* de porcs (Hammerum, A.M. et al, 2002). Per tant, podria ser que la reacció de PCR no fos prou específica per a detectar, només, contaminació fecal humana i hi hagués interferències amb mostres d'origen porcí. Darrerament s'ha qüestionat l'especificitat d'aquest marcador basat en el gen *esp*, ja que també s'ha detectat en gossos i gavines tot i que en més baixa proporció que en humans (Whitman, R.L. et al, 2007). S'ha observat que els serveis dels treballadors de la granja de porcs, anaven a parar al tanc final d'on s'han agafat tres de les mostres positives pel marcador del gen *esp*. Per tant, la seva detecció es podria deure a aportacions fecals humanes al tanc on es recollien les mostres.

Els marcadors d'ADN mitocondrial es presenten com una bona alternativa als indicadors de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua. Les cèl·lules intestinals tenen un recanvi molt elevat i per tant se n'elimina una elevada quantitat al medi juntament

amb les femtes. Es calcula que hi ha al voltant d' $1,1 \times 10^7$ còpies d'ADN mitocondrial per gram de femta (Caldwell, J.M. et al, 2007). La definició d'una PCR niuada incrementa encara més la sensibilitat del mètode. No es coneix, però, la distribució geogràfica d'aquest marcador.

En el cas de la PCR niuada utilitzant els iniciadors específics d'ADN mitocondrial de porcí, s'obté millors resultats en la primera amplificació que no pas amb la segona. Fruit de la segona amplificació apareixen bandes de diferents mides que no corresponen al control positiu de l'amplificació. L'elevada sensibilitat de la tècnica, fa que hi hagi suficient material amplificat amb la primera PCR per a detectar el marcador en les aigües residuals analitzades.

En aquest estudi s'ha obtingut una sensibilitat molt elevada pels tres hostes analitzats: 84,4% pel marcador d'humans, 84,2% pel de bovins i 87,9% pel de porcins. A més a més, els marcadors de bovins i porcins presenten una bona especificitat: 86,9% i 90,1% respectivament; s'assenyalen, per tant, com a bons indicadors de MST. La detecció d'ADN mitocondrial humà presenta una baixa especificitat del 41,1%. Pot ésser deguda a la inespecificitat dels marcadors a la zona analitzada o que l'elevada sensibilitat de la tècnica (menys d'un genoma per reacció, 10-100 cèl·lules per L), (Martellini, A. et al, 2005) pugui detectar qualsevol aportació de cèl·lules humanes per contaminació de la mostra.

Els mateixos autors han definit una PCR múltiple per a detectar simultàniament 4 orígens diferents: humà, boví, porcí i oví. Aquesta PCR presentava, però, una menor sensibilitat i especificitat i la possible amplificació d'artefactes deguts a la formació de dímers (Martellini, A. et al, 2005). També s'ha definit una PCR-Q múltiple que permet quantificar a la vegada, contaminació fecal humana, bovina i porcina amb una sensibilitat del 83% i una especificitat del 100% (Caldwell, J.M. et al, 2007). Aquesta tècnica però, presenta una sensibilitat tant gran que es va detectar entre $2-30 \times 10^4$ còpies d'ADN mitocondrial de boví per gr de femta en individus que havien ingerit carn de boví 24 hores abans de fer l'anàlisi (Caldwell, J.M. et al, 2007). Per tant, una sensibilitat tant gran pot donar falsos positius tot i que la quantitat va ser molt menor que l'ADN mitocondrial humà.

Els marcadors moleculars analitzats en aquest estudi en l'àrea geogràfica de Catalunya ordenats de manera decreixent segons la sensibilitat i l'especificitat són:

Sensibilitat	Especificitat
• <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	• CF128
• ADN mitocondrial de porcí	• CF193
• ADN mitocondrial d'humà	• Proteïna esp d' <i>Ent. faecium</i> ¹
• ADN mitocondrial de boví	• <i>Bifidobacterium dentium</i>
• <i>Bifidobacterium dentium</i>	• ADN mitocondrial de porcí
• HF134	• ADN mitocondrial de boví
• HF183	• HF183
• CF128	• <i>Bifidobacterium adolescentis</i>
• Proteïna esp d' <i>E. faecium</i> ¹	• HF134
• CF193	• ADN mitocondrial d'humà

¹Detecció de la proteïna esp d'*Ent. faecium* únicament amb mètodes moleculars, ometent el cultiu previ de la mostra.

Un assaig òptim de MST no hauria de tenir reaccions creuades. Ara bé, no es pot esperar que cap assaig tingui un 100% de sensibilitat i d'especificitat (Santo Domingo, J.W. et al, 2007). Seria important establir el número mínim de casos que cal analitzar per tal d'establir uns nivells correctes de classificació.

Tot i que alguns dels marcadors moleculars analitzats presenten una elevada sensibilitat i especificitat, cap d'ells assegura un 100% d'encert. Això va fer que es valorés la possibilitat de desenvolupar models predictius amb combinacions d'ells. S'ha analitzat diferents models predictius utilitzant el mínim número de marcadors possibles per incrementar al màxim la possibilitat d'encert. Els resultats obtinguts mostren, que els mètodes numèrics utilitzats també són un factor determinant en la fiabilitat del model. A la taula 2.22 i 2.23, segons si es consideren els quatre orígens de les mostres o humà i no humà, es facilita una relació dels possibles models predictius amb les variables que utilitzen i el percentatge d'encert.

Els mètodes numèrics descarten per ells mateixos les variables de més incertesa com són la detecció del gen esp d'*Ent. faecium* específic d'humans i el marcador de Bacteroidetes CF193.

Amb cap combinació d'aquests mètodes no podem classificar al 100% l'origen de la contaminació fecal a l'aigua. Els models predictius amb els quals s'obté un major percentatge d'encert són els que utilitzen tots els marcadors utilitzats. Mitjançant el

Taula 2.22 Models predictius per l'avaluació dels marcadors considerant tots els orígens fecals analitzats: humà, boví, d'aus i porcí.

Mètode estadístic	Núm. marcadors	Marcadors utilitzats	% d'encert	Valor Kappa
LDA	7	HF134, HF183, ADO, DEN, Humito, Bomito i Pomito	79,5%	
Arbre de decisió	4	ADO, DEN, Bomito i Pomito	70,6%	0,582
Arbre de decisió	4	ADO, HF183, Bomito i Pomito	71%	
Bayesià ingenu	7	HF134, CF128, ADO, DEN, Humito, Bomito i Pomito	78%	0,688
Mètode de veïns més proper	6	HF183, CF128, ADO, DEN, Humito, Bomito i Pomito	75%	0,649
Arbre de decisió considerant casos perduts	3	ADO, Bomito i Pomito	74,3%	0,6436

mètode lineal LDA s'obté un 79,5% d'encert però cal mesurar 7 marcadors moleculars: ADO, DEN, Bomito, Pomito, Humito, HF134 i HF183. Si disminueix el número de marcadors moleculars utilitzats disminueix el percentatge d'encerts. L'arbre de decisió que considera com a resultats també els casos perduts utilitza només 3 marcadors (ADO, Bomito i Pomito) i s'obté un 74,3%. L'estadístic kappa mostra un acord moderat en l'arbre de decisió que utilitza les variables ADO, DEN Bomito i Pomito. Mentre que

Taula 2.23 Models predictius per l'avaluació dels marcadors considerant origen humà i no humà.

Mètode estadístic	Núm marcadors	Marcadors utilitzats	% d'encert	Kappa estadístic
LDA	5	HF134, ADO, DEN, Bomito i Pomito	88,9%	
QDA	5	HF134, ADO, DEN, Bomito i Pomito	90,1%	
Arbre de decisió	3	ADO, HF183 i Pomito	87,5%	0,7324
Bayesià ingenu	4	HF183, ADO, Bomito i Pomito	86,2%	
Bayesià ingenu	3	ADO, DEN i Bomito	89%	
Veïns més propers	4	HF183, ADO, Bomito i Pomito	88,2%	0,747
Arbre de decisió considerant casos perduts	4	ADO, HF183, Bomito i Pomito	89%	
Arbre de decisió considerant casos perduts	2	ADO i Pomito	85,3%	0,681

en els altres models realitzats en que ha pogut ser calculada mostres un acord dels resultats entre moderat i bo.

Quan simplement es vol discriminar entre origen humà i no humà, s'aconsegueix un major percentatge d'encert assolint el 90,1% d'encert quan s'utilitzen 5 marcadors i s'analitzen amb el model quadràtic (Taula 2.23). Avaluant els 3 marcadors: ADO, DEN i Bomito es pot obtenir un 89% d'encert quan s'utilitza el mètode Bayesià ingenu. El major encert amb el mínim número de marcadors s'obté quan s'utilitza l'arbre de decisió que considera els casos perduts com a resultats, i que detecta els marcadors *Bif. adolescentis* i Pomito amb un 85,3% d'encert. Els estadístics kappa obtinguts també són majors mostrant en tots els casos un acord moderat-bo entre els resultats observats i esperats.

Capítol 3

Diversitat del gènere
Bifidobacterium en aigües
residuals d'origen humà i
animal

3.1 Introducció

A la Introducció general (Apartat 1.3) s'exposa extensament la importància del gènere *Bifidobacterium* com a part de la microbiota autòctona de l'intestí humà i altres animals de sang calenta (Chevalier, P. et al, 1991) i de la seva possible rellevància com a indicador de MST. Algunes característiques fisiològiques d'aquests gènere com l'anaerobiosi estricta i la demanda d'un nombre elevat de requeriments nutricionals han dificultat la universalitat de les seves espècies, el que s'ha manifestat amb una especiació als intestins dels diferents hostes. *Bif. adolescentis*, *Bif. bifidum*, *Bif. breve*, *Bif. catenulatum*, *Bif. angulatum* i *Bif. dentium* són espècies que han estat associades habitualment a l'aparell digestiu d'humans. D'altres s'han relacionat amb la microbiota intestinal d'animals com per exemple *Bif. pullorum* i *Bif. gallinarum* que han estat descrites en pollastres; *Bif. merycicum* i *Bif. ruminantium* en el rumen boví i *Bif. choerinum* en porcs (Biavati, B. et al, 2006). A la taula 1.4 es mostra una relació de les diferents espècies del gènere *Bifidobacterium* i els diferents orígens on han estat detectades. Aquest fet ha justificat la utilització d'aquest gènere com a possible traçador dels orígens de la contaminació fecal a l'aigua (Mara, D.D. et al, 1983; Nebra, Y. et al, 2003; Resnick, I.G. et al, 1981).

Tot i que existeixen inconvenients deguts a les dificultats del gènere, darrerament hi ha un aprofundiment en l'ecologia i la identificació de *Bifidobacterium* spp. pel gran impuls que han suposat les tècniques moleculars tal i com ja s'ha exposat al capítol 1. No obstant, encara hi ha una manca de coneixement sobre les condicions necessàries per a cultivar la majoria de microorganismes del medi ambient (Muyzer, G. et al, 1998). Moltes espècies poden no créixer en els medis descrits, i pot haver-hi desviacions en funció de la facilitat en créixer amb determinats requeriments (Charteris, W.P. et al, 1997). Per tant, els recomptes en medis selectius i diferencials no tenen perquè reflectir la diversitat ni la composició de la microbiota d'un determinat ambient.

L'anàlisi de les poblacions mitjançant tècniques moleculars, també mostra algunes limitacions, com la presència de falsos negatius i una possible amplificació esbiaixada de les poblacions; però pot reflectir de manera més exacta la diversitat real del medi. Aquestes tècniques contrasten amb els mètodes tradicionals d'identificació d'espècies, basats majoritàriament en la identificació de característiques fenotípiques com són els tests bioquímics, microscòpics i el creixement en medis selectius. Aquests mètodes són habitualment llargs i laboriosos i poden presentar una baixa reproductibilitat (Youn, S.Y. et al, 2008).

El major coneixement del gènere *Bifidobacterium* ha mostrat els beneficis que aporta al seu hoste, com la producció de vitamines, certa activitat anticancerígena o l'estimulació del sistema immune i ha impulsat el seu ús com a probiòtic (Biavati, B. et al, 2006). Això ha estimulat l'estudi de mètodes més específics i més reproduïbles que les tècniques tradicionals per a la detecció i identificació del gènere i de les diferents espècies que el conformen (Suau, A. et al, 1999; Ventura, M. et al, 2004). S'ha dissenyat iniciadors específics i sondes d'ADN per tal de poder identificar el gènere *Bifidobacterium*, mitjançant: PCR (Delcenserie, V. et al, 2005; Kaufmann, P. et al, 1997; Mangin, I. et al, 1995), PCR-Q (Vitali, B. et al, 2003) i hibridació colonial (Kaneko, T. et al, 1997; Kaufmann, P. et al, 1997).

Altres estudis s'han beneficiat de les tècniques moleculars per a poder identificar i detectar a nivell d'espècie, i fins hi tot de soca. S'han dissenyat iniciadors específics de diferents espècies i així s'ha pogut estudiar la distribució d'aquestes en les femtes d'adults (Matsuki, T. et al, 1999) i d'infants (Sakata, S. et al, 2005) i la composició d'aliments probiòtics (Ventura, M. et al, 2001). També s'ha utilitzat per aquest propòsit, la identificació d'espècies amb sondes específiques mitjançant la tècnica FISH (Takada, T. et al, 2004). Aquestes tècniques però, precisen del coneixement de les seqüències per a poder dissenyar els iniciadors i les sondes, i encara no es coneix, ni es té accés a les seqüències gèniques de totes les espècies. Últimament s'ha qüestionat l'eficàcia i l'especificitat d'algunes de les PCRs descrites per a identificar diferents espècies de *Bifidobacterium*. Un estudi recent ha avaluat 37 jocs d'iniciadors descrits per identificar espècies del gènere i només 10 d'ells han mostrat l'especificitat esperada (Youn, S.Y. et al, 2008). Altres autors han analitzat tant mostres humanes com animals utilitzant tres jocs diferents d'iniciadors específics del gènere *Bifidobacterium*. La capacitat de detecció del gènere ha estat diferent segons els iniciadors usats, és a dir no s'ha obtingut els mateixos resultats a l'analitzar una mateixa mostra (Lamendella et al. 2008).

S'han definit altres tècniques per a poder identificar espècies de *Bifidobacterium* com són els perfils d'ADN obtinguts per rep-PCR (BOX, ERIC, (GTG)₅ i REP) (Masco, L. et al, 2003; Ventura, M. et al, 2003) o l'anàlisi de fragments amplificats de restricció d'ADN ribosomal (ARDRA) (Ventura, M. et al, 2001). Un altre estudi va analitzar mitjançant perfils de PFGE la diversitat de soques aïllades del lumen i de l'epiteli del cec de porcs (Simpson, P.J. et al, 2003). Aquestes tècniques permeten identificar espècies, però és necessari l'aïllament previ de les soques i per tant hauran de poder ser cultivades.

Per altra banda, existeixen les tècniques d'anàlisi de comunitats microbianes. Aquestes tècniques aporten un perfil genètic característic de la població d'una mostra ambiental, i per tant, permeten poder avaluar la seva diversitat i complexitat.

En el capítol 1 s'ha introduït les principals tècniques d'anàlisi de comunitats microbianes: LH-PCR i T-RFLP, i DGGE i TGGE que permeten, a partir d'un producte amplificat, separar els diferents gèneres o espècies que la conformen.

La T-RFLP i la LH-PCR són tècniques fàcilment automatitzables ja que el producte digerit amb enzims de restricció d'una PCR és analitzat mitjançant un seqüenciador automàtic d'ADN. D'aquesta manera es va separant els diferents fragments obtinguts segons la mida. Finalment, s'obté un perfil que mostra les molècules d'ADN característiques de cada mostra en funció de la seva longitud. Aquesta tècnica permet la caracterització genètica d'una població, però no permet la identificació de les espècies que la conformen. Per això, cal la creació d'una biblioteca de clons a partir de l'extracció de l'ADN que caldrà analitzar amb la mateixa tècnica, per tal de poder associar el perfil de cada clon al de la mostra. La tècnica de T-RFLP ha estat utilitzada per a caracteritzar les poblacions microbianes de *Bifidobacterium* spp. que es troben a les femtes d'infants (Sakata, S. et al, 2005). Per tal de poder caracteritzar les bifidobactèries presents a les femtes, es va realitzar paral·lelament a l'anàlisi amb T-RFLP la detecció per PCR de diferents espècies amb iniciadors específics. Es va relacionar la detecció positiva o negativa d'aquestes espècies amb els perfils obtinguts (Sakata, S. et al, 2005), però això no significava que un determinat pic representés aquella espècie.

Altres tècniques utilitzades per a la caracterització de les comunitats, són l'anàlisi d'amplificats d'ADN amb gels de gradient desnaturalitzant fets o amb substàncies químiques (DGGE) o amb temperatura (TGGE). Aquestes tècniques han estat àmpliament utilitzades en ecologia microbiana, de manera que s'han utilitzat per a conèixer les comunitats tan diferents com les que conformen ambients molt diversos com són l'aparell bucal (Fujimoto, C. et al, 2003), la microbiota simbiota en esponges marines (Li, Z. et al, 2007) o consorcis microbians degradadors de fuel (Viñas, M. et al, 2005).

L'estudi de les comunitats mitjançant la detecció en gels de gradient desnaturalitzant ha estat una de les tècniques que ha anat evolucionant paral·lelament a la creixent introducció dels aliments probiòtics a la dieta diària. El que ha permès poder caracteritzar-ne la composició. S'ha dissenyat diferents iniciadors per a identificar espècies de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* presents en aliments probiòtics i

s'han assajat diferents condicions per a detectar-les mitjançant DGGE (Fasoli, S. et al, 2003; Temmerman, R. et al, 2003; Theunissen, J. et al, 2005; Walter, J. et al, 2001).

També s'ha utilitzat aquestes tècniques, per a poder caracteritzar i observar els canvis de la microbiota en general de l'aparell digestiu d'humans (Donskey, C.J. et al, 2003; Walter, J. et al, 2001; Zoetendal, E.G. et al, 2004) o més específicament analitzant el gènere *Bifidobacterium* (Favier, C.F. et al, 2003; Nielsen, D.S. et al, 2003; Satokari, R.M. et al, 2001a; Satokari, R.M. et al, 2001b; Vaughan, E.E. et al, 2000; Zoetendal, E.G. et al, 1998). En altres casos s'ha aplicat aquesta tècnica per a l'estudi de la microbiota d'alguns animals com porcs (Simpson, J.M. et al, 1999), remugants (Kocherginskaya, S.A. et al, 2001) i pollastres (van der Wielen, P.W. et al, 2002).

L'anàlisi mitjançant l'electroforesi amb gels de gradient desnaturalitzant d'amplificats de la reacció de PCR, és un mètode ràpid de separació física de seqüències d'ADN que difereixen en petits canvis com són substitucions, delecions o insercions de nucleòtids. Permet la detecció de fragments d'ADN de la mateixa mida però amb diferent seqüència.

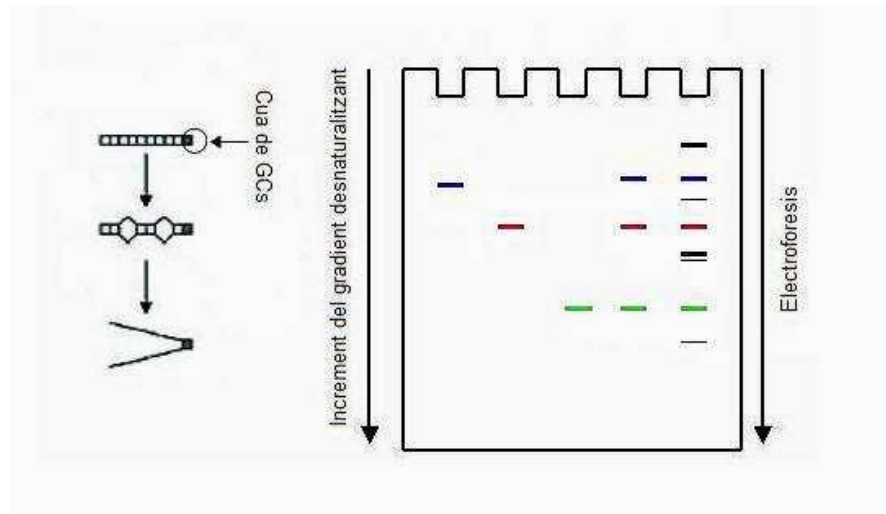
Aquesta tècnica consisteix en una separació per electroforesi dels amplificats d'ADN utilitzant gels de poliacrilamida que incorporen un gradient, creixent, de substàncies desnaturalitzants, com són la urea i la formamida (DGGE) o incrementant la temperatura a mesura que avança l'electroforesi (TGGE). Mentre la molècula va avançant pel gel, van incrementant les condicions d'astringència de manera que quan un domini de desnaturalització assoleix una determinada posició en el gel de gradient es produeix un canvi d'estat de la molècula. El domini perd l'estructura de doble hèlix i passa a una seqüència parcialment desnaturalitzada (Fig. 3.1). Aquest canvi de conformació produeix una disminució de la mobilitat electroforètica de la molècula (Muyzer, G. et al, 1996; Myers, R.M. et al, 1987). Les seqüències amb diferents dominis de desnaturalització es desnaturalitzen a diferent posició del gel, i per tant mostraran un diferent patró de migració.

La localització de les bandes està lligada a la formació d'aquests dominis. La posició final dependrà de la naturalesa de la molècula, de l'escala del gradient desnaturalitzant i de la duració del camp electroforètic.

La urea i la formamida són l'equivalent a l'efecte de desnaturalització produït per un increment de la temperatura. Així, quan un domini presenta un elevat contingut en adenines i timines, precisarà una més baixa temperatura o concentració d'urea i formamida per desnaturalitzar-se que amb un major contingut de guanines i citosines

(G+C). La velocitat de migració disminuirà abans i per tant assolirà una posició més pròxima a la part superior del gel.

Figura 3.1 Esquema de la tècnica d'electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant.



Finalment s'obté un perfil de bandes indicatiu de la diversitat microbiana que constitueix la mostra (Fig 3.1). Es pot aconseguir una visió completa de la població extraient les bandes aïllades, reamplificant-les i seqüenciant-les. També es pot estudiar un gel complet usant sondes específiques per a identificar les bandes d'interès (Muyzer, G. et al, 1993) o fer un estudi estadístic de l'estructura de la comunitat estudiada segons la posició i intensitat de les bandes.

La DGGE permet, per ella sola, detectar un 50% de les possibles modificacions de les seqüències d'ADN de 500 pb de la comunitat. Aquest percentatge es pot incrementar fins a pràcticament un 100% quan s'afegeix a les molècules una seqüència rica en guanines i citosines (Myers, R.M. et al, 1985b; Myers, R.M. et al, 1985a). Aquest fragment és de difícil desnaturalització i evita que les dos cadenes d'ADN es separin totalment. Per tant es pot afegir una seqüència amb unes 30-50 GCs a l'extrem 5' d'un dels dos iniciadors que serà coamplificada i per tant introduïda a la molècula d'ADN.

Així que, la DGGE és una tècnica que permet l'estudi de la complexitat espacial i temporal d'una comunitat microbiana present en una mostra fins al nivell d'espècie, tant de cèl·lules cultivables com no. I a la vegada, permet la seva identificació mitjançant una seqüenciació o una hibridació. És una tècnica ràpida i fàcil, tot i que laboriosa, que permet l'anàlisi simultani de varies mostres. El fet de que la separació sigui a partir de la composició de la seqüència i no de la mida d'aquesta, fa que tingui més capacitat de discriminació que no pas la T-RFLP.

La utilització d'aquesta tècnica presenta certes limitacions, tant associades a l'ús de tècniques moleculars com d'altres intrínseques a la pròpia tècnica.

Les limitacions associades a la utilització de tècniques moleculars s'han comentat breument en el capítol 2. Algunes estan associades als mètodes d'extracció d'ADN com: l'extracció diferencial del material genètic de les espècies presents a la mostra per diferent resistència als tractaments de lisi segons el microorganisme o la incapacitat d'extreure substàncies que poden inhibir la posterior reacció de PCR, com són substàncies húmiques o exopolisacàrids bacterians (Muyzer, G. et al, 1998). D'altres estan associades a la reacció de PCR, com l'existència d'amplificacions esbiaixades per una major preferència dels iniciadors per determinades seqüències. Aquesta desviació es pot deure a una menor amplificació de seqüències amb un elevat contingut de GCs, a una mala separació durant el procés de desnaturalització, a una variació de la mida i el número de còpies del gen en diferents espècies o a la possible formació de quimeres (Reysenbach, A.L. et al, 1992; Suzuki, M.T. et al, 1996; Wang, G.C. et al, 1997). També s'ha detectat que pot influir-hi les condicions de PCR, com són el número de cicles d'amplificació i la temperatura d'hibridació (Sipos, R. et al, 2007). Amplificacions esbiaixades de la població, repercutiran en els diferents perfils de la DGGE que poden reflectir petites desviacions de la composició real de la mostra.

La possible formació d'heteroduplex pot influir amb una sobreestimació de la diversitat present a la mostra. Aquestes molècules es poden formar per la re-hibridació de productes de PCR desnaturalitzats (Suzuki, M.T. et al, 1996). D'aquesta manera es pot obtenir 4 bandes (dos homodúplex i dos heterodúplex) enlloc de les dues que correspondrien a les dues seqüències (Muyzer, G. et al, 1998).

Existeixen també, certes limitacions intrínseques de la tècnica (Muyzer, G. et al, 1998), com que:

→ La DGGE permet la detecció de fragments d'ADN de 500 pb (Myers, R.M. et al, 1985b), això limita la informació del gen que pot ser analitzada.

→ Teòricament, amplificats d'ADN amb diferent composició nucleica, es col·locaran en diferents posicions del gel, però, o degut a que no s'ha optimitzat prou bé el gradient o perquè simplement, diferents seqüències presentin els mateixos dominis de desnaturalització, es pot obtenir bandes úniques que representin diferents organismes.

→ A la vegada, quan s'analitza un gen que presenta varies còpies en un mateix organisme, com és el cas del 16S ARNr, es pot obtenir diferents bandes per una mateixa espècie. Així per exemple el número de còpies de l'operó

ribosòmic varia entre 1 i 15 segons l'espècie, el gènere o la família. En el gènere *Bifidobacterium* el nombre de còpies oscil·la entre 2 i 5 còpies (Candela, M. et al, 2004), per tant, si hi ha alguna diferència entre els diferents operons, es pot obtenir diferents bandes per la mateixa espècie.

→La tècnica de la DGGE, no permet detectar tots els microorganismes presents a la mostra. Generalment aquesta tècnica detecta les espècies predominants en una comunitat. En un estudi es va veure que mitjançant la DGGE es podia detectar del 90 al 99% de les diferents molècules d'ADN amplificades (Zoetendal, E.G. et al, 1998). És a dir que un amplificat que tingui una presència menor al 1-10% del total de la mostra, pot no ser detectat amb aquesta tècnica.

Tot i les limitacions que pot tenir aquesta tècnica reflecteix de manera més aproximada la composició de la microbiota d'una comunitat, que no pas les tècniques que precisen del cultiu. En un estudi es va analitzar paral·lelament, productes probiòtics que contenien bifidobacteris mitjançant tècniques dependents de cultiu (diferents medis selectius i identificació de les colònies amb BOX-PCR) i independents de cultiu (DGGE). Les tècniques dependents de cultiu van detectar *Bifidobacterium* en un 70,7% de les mostres, en canvi, amb la DGGE es va detectar al 96,5% de les mostres analitzades (Masco, L. et al, 2005).

La diferent distribució de les espècies del gènere *Bifidobacterium* entre hostes, la capacitat de discriminació a nivell d'espècie de les tècniques d'anàlisi de comunitats aplicades en l'anàlisi de probiòtics i de l'aparell digestiu, han fet pensar en la possible utilització d'aquestes tècniques per a poder detectar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua.

Les comunitats del grup *Bacteroides-Prevotella* i de *Bifidobacterium* spp. de l'aigua residual han estat analitzades mitjançant les tècniques de LH-PCR i T-RFLP i es va observar que hi havia diferències entre aigua residual de diferents orígens (Bernhard, A.E. et al, 2000b). Es va detectar que efectivament, els perfils obtinguts en l'anàlisi de femtes humanes i de vaques eren diferents, i per tant es podia utilitzar com a tècnica per al MST. Com ja s'ha comentat, un dels principals problemes d'aquesta tècnica, és la dificultat de poder identificar les espècies que formen un determinat perfil, cosa més fàcilment realitzable amb la DGGE.

La DGGE també ha estat utilitzada per a detectar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua, en aquest cas, però, detectant diferències genètiques en *E. coli* associades als diferents hostes (D'Elia, T.V et al, 2007).

En aquest estudi s'ha volgut aplicar l'anàlisi mitjançant DGGE d'amplificats específics de *Bifidobacterium* per a detectar l'origen de la contaminació fecal. Ja que el gènere *Bifidobacterium* es mostra com a un bon traçador de MST i que aquesta tècnica, a més de poder caracteritzar les mostres, permet la identificació dels microorganismes que constitueixen el perfil.

Atenent a aquests precedents, els objectius plantejats en aquest treball han estat:

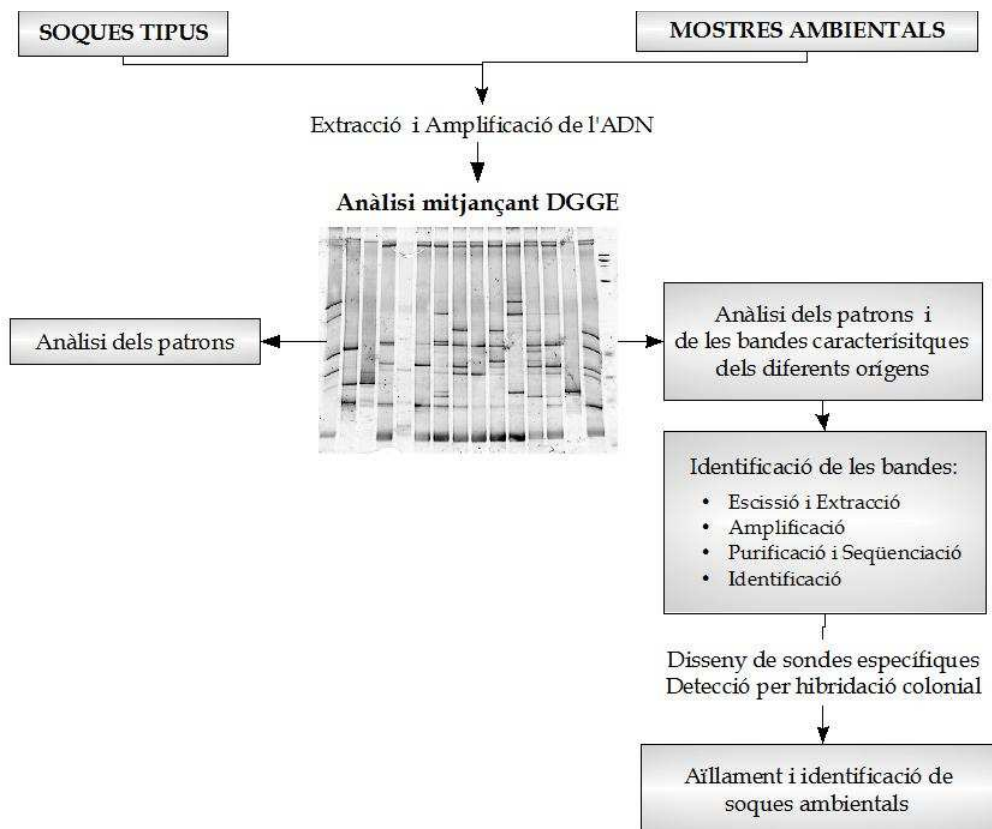
1. Definir un anàlisi de DGGE específic del gènere de *Bifidobacterium* que permeti fer una valoració qualitativa de les poblacions de *Bifidobacterium* spp. presents a l'aigua residual de diferents orígens.
2. Obtenir patrons genètics que permetin distingir l'origen de la contaminació fecal a l'aigua residual d'humans i d'altres orígens com porcí, avícola o boví.
3. Caracteritzar i identificar les soques corresponents a les bandes majoritàries obtingudes dels diferents perfils. Associar unes determinades soques a un determinat origen.
4. Recuperació de les espècies relacionades amb les bandes majoritàries en mostres d'aigua residual de diferents orígens.

3.2 Materials i Mètodes

3.2.1 Disseny experimental

A la figura 3.2 es mostra un esquema de l'anàlisi experimental dut a terme en aquestes estudi. S'ha utilitzat la tècnica de la DGGE per avaluar la diversitat de *Bifidobacterium* spp. present en l'aigua residual de diferents orígens: humà, boví, porcí i avícola. Aquesta tècnica ens permet tan l'avaluació de patrons diferencials que permeten discernir l'origen com l'anàlisi de la microbiota dels diferents hosts. L'existència de patrons diferents entre orígens, i homogenis entre mostres d'igual procedència, permetrien l'aplicació de la tècnica en si per al MST. A la vegada, la identificació de les bandes corresponents a les diferents espècies, permeten tenir un major coneixement del gènere. Una vegada identificades les espècies majoritàries i exclusives d'un determinat origen s'ha valorat la seva recuperació a partir del medi. Per això, coneguda la seva seqüència, s'han dissenyat sondes específiques per tal de poder-les aïllar mitjançant la tècnica d'hibridació colonial.

Figura 3.2 Disseny de l'experiment realitzat per a l'estudi de les comunitats de *Bifidobacterium* a l'aigua residual de diferents orígens.



3.2.2 Soques de referència, medis de cultiu i condicions de creixement

S'ha utilitzat les soques tipus obtingudes de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM) com a controls i espècies de referència (Taula 3.1):

Taula 3.1 Soques del gènere *Bifidobacterium* utilitzades en aquest estudi.

Espècie	Soca	Espècie	Soca
<i>Bif. adolescentis</i>	DSM 20083 ^T	<i>Bif. indicum</i>	DSM 20214 ^T
<i>Bif. angulatum</i>	DSM 20098 ^T	<i>Bif. longum</i> ssp. <i>infantis</i>	DSM 20088 ^T
<i>Bif. animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	DSM 20104 ^T	<i>Bif. longum</i> ssp. <i>longum</i>	DSM 20219 ^T
<i>Bif. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	DSM 20223	<i>Bif. magnum</i>	DSM 20222 ^T
<i>Bif. asteroides</i>	DSM 20089 ^T	<i>Bif. merycicum</i>	DSM 6492 ^T
<i>Bif. bifidum</i>	DSM 20456 ^T	<i>Bif. minimum</i>	DSM 20102 ^T
<i>Bif. boum</i>	DSM 20432 ^T	<i>Bif. pseudocatenulatum</i>	DSM 20438 ^T
<i>Bif. breve</i>	DSM 20213 ^T	<i>Bif. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	DSM 20092 ^T
<i>Bif. catenulatum</i>	DSM 6992 ^T	<i>Bif. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i>	DSM 20099 ^T
<i>Bif. choerinum</i>	DSM 20434 ^T	<i>Bif. pullorum</i>	DSM 20433 ^T
<i>Bif. coryneforme</i>	DSM 20216 ^T	<i>Bif. ruminantium</i>	DSM 6489 ^T
<i>Bif. cuniculi</i>	DSM 20435 ^T	<i>Bif. saeculare</i>	DSM 6531 ^T
<i>Bif. dentium</i>	DSM 20084 ^T	<i>Bif. scardovii</i>	DSM 13734 ^T
<i>Bif. gallicum</i>	DSM 20093 ^T	<i>Bif. subtile</i>	DSM 20096 ^T
<i>Bif. gallinarum</i>	DSM 20670 ^T	<i>Bif. thermophilum</i>	DSM 20210 ^T

Aquestes soques, han estat mantingudes en alíquotes congelades a -80°C fins al moment del seu ús. Per a la seva recuperació s'han descongelat i s'han cultivat en el brou Reinforced Clostridium Mediu (RCM) (Annex I) (Oxoid, Hampshire, Anglaterra) en una temperatura d'incubació de 37°C, en tubs de vidre de 20 ml i en condicions d'anaerobiosis durant 48 h.

El medi RCM ha estat utilitzat tant per a recuperar soques tipus congelades com per obtenir un cultiu líquid de soques tipus i ambientals per a la posterior extracció del material genètic.

Per al cultiu en placa de *Bifidobacterium* spp., tant de les soques tipus, com pel recompte i l'aïllament de soques de les mostres ambientals s'han utilitzat els medis següents:

→El medi Columbia Blood Agar (CBA) (Difco, Le Pont de Claix, França) és un medi ric que permet el creixement de la majoria de bacteris anaerobis cultivables. El medi s'ha suplementat amb: glucosa (Panreac, Espanya) com a font de carboni i cisteïna (Merck, Darmstadt, Alemanya) com a font de nitrogen essencial. La cisteïna, a més a més, actua reduint el potencial redox del medi evitant la formació de productes tòxics intermediaris de la reducció de l'oxigen (Annex I).

→El medi Beerens Agar és selectiu per les espècies del gènere *Bifidobacterium*. Representa una modificació del medi CBA suplementat al que s'ha afegit àcid propiònic (Sigma, St. Louis, EUA). Finalment cal ajustar el pH del medi a 5 (Annex I). L'àcid propiònic i una disminució del pH, incrementa la selectivitat del medi inhibint el creixement d'enterobactèries i altres bacteris Gram positius com *Enterococcus*, *Staphylococcus* i *Micrococcus* (Beerens, H., 1991).

→El medi Human *Bifidobacterium* Sorbitol Agar (HBSA) és un medi selectiu pel gènere *Bifidobacterium* i diferencial pels fermentadors de sorbitol (Mara, D.D. et al, 1983). S'ha postulat que les espècies fermentadores de sorbitol són específiques d'humans, concretament *Bif. adolescentis* i *Bif. breve* (Mara, D.D. et al, 1983) pel que es va definir aquest medi per tal de poder distingir entre mostres d'origen humà i no humà. S'utilitza Tryptone Soy Agar (TSA) com a base del medi a la que se li afegix sorbitol (Sigma, St. Louis, EUA) com a font de carboni. Com a fonts de nitrogen i d'aminoàcids, s'afegix polipeptona (BD, France), casaminoàcids (Difco, Le Pont de Claix, França), extracte de llevat i cisteïna (Merck, Darmstadt, Alemanya). Aquesta última, com s'ha esmentat, també col·labora en la reducció del potencial redox del medi. Els antibiòtics polimixina B, àcid nalidíxic (Sigma, St. Louis, EUA) i sulfat de kanamicina (Sigma, St. Louis, EUA) s'utilitzen com a agents selectius (Annex I). El medi, conté bromocresol porpra (Merck, Darmstadt, Alemanya) que actua com a indicador de pH, virant a groc quan les colònies fermentadores del sorbitol acidifiquen el medi, permetent la seva diferenciació. Les colònies que no el fermenten presenten una coloració blanca o transparent.

El gènere *Bifidobacterium* és anaerobi, i per tant el creixement d'aquestes soques s'ha efectuat en un sistema GasPak (BBL, Hampshire, Anglaterra) amb Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemanya) per tal de crear una atmosfera reductora adequada. Les condicions d'incubació pels tres agars han estat a 37°C durant 48 h.

3.2.3 Mostres analitzades

Per a l'obtenció dels perfils de DGGE s'ha analitzat un total de 64 mostres d'aigua residual de diferents orígens. D'aquestes:

→ 21 mostres corresponen a aigua d'*origen humà* obtingudes a partir d'aigua d'entrada a 11 estacions depuradores d'aigua residual (EDARs); 19 mostres obtingudes dins el territori català i 2 obtingudes fora de Catalunya (a França i Xipre)

→ 19 mostres d'*origen avícola* provinents d'aigua residual de dos escorxadors d'aus

→ 24 mostres d'*origen porcí*: 6 d'elles provinents d'aigua residual de dos escorxadors on es sacrifica únicament bestiar porcí i 18 de la bassa d'acumulació dels purins de tres granges de porcs (dues situades dins l'àmbit català i una tercera de Xipre)

→ 13 mostres tenen *origen boví*: 7 d'elles obtingudes a partir de l'aigua residual de 5 escorxadors on principalment es sacrificava bestiar boví i 6 mostres de femtes de tres granges de boví

Les mostres foren recollides en recipients de plàstic estèril, transportades a 4°C i processades en menys de 6 hores des de la seva obtenció. A excepció de les mostres de fora de l'àmbit català que s'ha realitzat l'extracció d'ADN un cop arribades al laboratori i s'han mantingut congelades fins al moment del seu ús.

3.2.4 Extracció del material genètic

L'extracció d'ADN de les soques tipus i de les soques aïllades a partir de mostres ambientals s'ha efectuat a partir d'un protocol descrit prèviament (Kellogg, D.E. et al, 1990). Per a cada soca tipus de la taula 3.1 i per les soques ambientals aïllades posteriorment, s'ha realitzat l'extracció a partir d'1 ml de cultiu en brou RCM crescut entre 24 i 72 h a 37°C en condicions d'anaerobiosis. S'han precipitat les cèl·lules mitjançant una centrifugació a 14000 rpm durant 3 min. Per tal d'eliminar les restes del

cultiu s'han rentat dues vegades en aigua destil·lada estèril. Les cèl·lules, s'han resuspès en 0,2 ml de solució A (100 mM KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 10 mM Tris-HCl i un pH de 8,3) (Annex II) i 0,2 ml de la solució B (2,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, 1% de Tween-20, 1% de Nonidet P40 i un pH de 8,3) (Annex II). S'ha afegit una concentració de 120 mg/ml de proteïnasa K (Merck, Darmstadt, Alemanya) a la barreja. Per tal de permetre l'actuació de l'enzim s'ha incubat a 55°C durant 1 h. Posteriorment s'ha afegit 0,2 ml de Matriu d'InstaGene (Bio-Rad, Hercules, EUA), que adsorbeix els productes de la lisi cel·lular deixant lliure el material genètic, i s'ha mantingut 15 min més a 55°C. Finalment s'ha inactivat la proteïnasa mitjançant un xoc tèrmic a 100°C durant 8 min. Per a separar la matriu InstaGene s'ha centrifugat la mostra 3 min a 14000 rpm. Quan les extraccions havien de ser utilitzades en les 48 h següents s'han mantingut a 4°C si no, s'han conservat a -20°C fins al moment del seu ús. L'últim pas de centrifugació, s'ha realitzat prèviament a l'amplificació per PCR de la mostra per tal de precipitar les restes cel·lulars.

Per a l'extracció d'ADN de les mostres ambientals s'ha utilitzat el kit d'extracció QIAampR DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya) segons les instruccions del fabricant. Aquest kit permet l'extracció de substàncies inhibidores de la reacció de PCR que poden estar presents a la mostra.

3.2.5 *Amplificació mitjançant la reacció de PCR*

En aquest estudi s'ha efectuat l'anàlisi de les espècies de *Bifidobacterium* de l'aigua residual amb DGGE mitjançant l'anàlisi d'un fragment del gen del 16S ARN ribosòmic. Degut a la importància de la seva funció, aquest gen no ha acumulat un elevat nombre de mutacions al llarg del temps. Per tant, presenta una seqüència força conservada entre espècies cosa que permet la seva comparació, però a la vegada conté regions variables característiques de cada espècie que permet la seva diferenciació. En aquest estudi s'ha realitzat diferents reaccions de PCR: a) dues amplificacions consecutives específiques del gènere *Bifidobacterium* per a la detecció amb gels de DGGE; b) amplificació de les bandes extrems del gel; c) amplificació específica de les soques aïllades del medi per a la seva identificació.

3.2.5.1 *Amplificació per a la detecció mitjançant gels de DGGE*

Per tal d'analitzar les mostres mitjançant la tècnica de la DGGE, s'ha amplificat l'ADN utilitzant uns iniciadors que hibriden amb la majoria d'espècies del gènere. El fragment amplificat, però, conté una seqüència amb prou diferències per a ser

discriminades en un gel de gradient desnaturalitzant. S'ha realitzat dos amplificacions consecutives: una primera utilitzant els iniciadors Lm26 i Lm3 (Kaufmann, P. et al, 1997) i una segona amb els iniciadors Bif164-f i Bif662-GC-r (Satokari et al, 2001; Langendik et al, 1995), la seqüència dels quals es mostra a la taula 3.2. Aquest últim iniciador conté una seqüència de 40 guanines i citosines per tal d'introduir al fragment d'ADN un domini amb una elevada temperatura de desnaturalització.

Taula 3.2 Conjunt d'iniciadors utilitzats en aquest estudi per a l'amplificació específica del gen del 16S ARNr.

Iniciador	Seqüència	Diana	Posició
Lm26	5'-GATTCTGGCTCAGGATGAACG-3'	<i>Bifidobacterium</i> spp.	15-35
Lm3	5'-CGGGTGCTI ^a CCCACCTTCATG-3'		1412-1432
27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	universals	8-27
1492r	5'-TACGGTTACCTTGTACGAC-3'		1492-1510
Bif164-f	5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3'	<i>Bifidobacterium</i> spp.	164-181
Bif662-GC-r	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGCGG GGGCACGGGGGCCACCGTTACACCGGGAA-3'		662-679
Bif662-r	5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3'		662-679

^aLa Inosina reconeix A, C, G i T

Fruit de la primera PCR, s'obté un fragment de 1420 pb que és amplificat en la segona PCR obtenint un producte final d'unes 550 pb. Les condicions i els programes d'amplificació, descrits en estudis previs, es mostren a les taules 3.3 i 3.4.

Taula 3.3 Reactius i concentracions necessàries per a les reaccions de PCR utilitzades al llarg d'aquest estudi.

Reactiu	Lm26/Lm3		27f/1492r		Bif164-f/Bif662-GC-r	
	Volum afegit	Concentració final	Volum afegit	Concentració final	Volum afegit	Concentració final
Tampó 10x ¹ (Epp.)	5 µl	1X	5 µl	1x	5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM) (Epp.)	1 µl	0,5 mM			3 µl	1,5 mM
dNTPs (25mM) (Epp.)	0,4 µl	200 µM	0,4 µl	200 µM	0,4 µl	200 µM
Iniciadors (5mM)	3 µl	0,3 µM	4 µl	0,4 µM	2 µl	0,2 µM
Taq polimerasa (5U/ml) (Epp.)	0,4 µl	2 U	0,5 µl	2,5 U	0,3 µl	1,5 U
ADN	2 µl		2 µl		1 µl	
H ₂ O	35,2 µl		34,1 µl		36,3 µl	
Volum Total	50 µl		50 µl		50 µl	

¹500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,3 (25°C), 15mM MgCl₂, 1% Tritó x10.

Taula 3.4 Programes per a l'amplificació mitjançant PCR per a cada parella d'iniciadors

	Lm 26/Lm 3		27f/1492r
	94° C 2 min		94° C 5 min
35 cicles	94° C 1 min	35 cicles	94° C 1 min
	67° C 3 min		55° C 1 min
	72° C 4 min		72° C 1 min 30s
	72° C 7 min		72 7 min
	Bif164-f/Bif662-GC-r		Bif164-f/Bif662-r
	94° C 2 min		94° C 5 min
35 cicles	94° C 1 min	35 cicles	94° C 30 s
	66° C 40 s		62° C 20 s
	72° C 1 min		68° C 40s
	72° C 5 min		68° C 7 min
	4° C ∞		4° C ∞

Els productes d'ambdós reaccions d'amplificació s'han visualitzat en un gel d'agarosa al 0,8 % en TBE 1X (Annex II) en la primera PCR i al 2% en la segona.

3.2.5.2 Amplificació de les bandes de DGGE

Per a poder identificar les bandes obtingudes dels gels de DGGE, una vegada escindida la banda i extret l'ADN; abans de dur a terme la reacció de seqüenciació, s'ha realitzat una amplificació amb els mateixos iniciadors: Bif164-f i Bif662-r (Taula 3.2). En aquest cas s'ha prescindit de la cua de GCs en l'iniciador revers. S'ha afegit la mateixa concentració de reactius que s'havia addicionat per tal d'efectuar la reacció d'amplificació amb els iniciadors per a l'anàlisi amb la DGGE (iniciadors Bif164-f i Bif662-GC-r) (Taula 3.3). El programa d'amplificació utilitzat és diferent i es mostra a la taula 3.4.

3.2.5.3 Amplificació de soques ambientals

Per tal de verificar la identitat de les soques aïllades de mostres ambientals i que han resultat positives per la hibridació colonial amb les sondes dissenyades a partir de la banda de DGGE, s'ha recorregut a la tècnica de seqüenciació. Prèviament a la seqüenciació s'ha amplificat l'ADN extret de les soques mitjançant els iniciadors Lm26/Lm3 o 27f/1492r. Aquest últim parell d'iniciadors són universals de manera que hibriden amb la majoria d'eubacteris (Weisburg, W.G. et al, 1991; Langendijk, P.S. et

al, 1995); per tant s'han utilitzat per tal d'identificar espècies que no han pogut ser amplificades amb el joc d'iniciadors del gènere *Bifidobacterium* (Taula 3.2). Les concentracions i els programes d'amplificació es detallen a les taules 3.3 i 3.4.

3.2.6 *Electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant*

El producte de la reacció de PCR amb els iniciadors Bif164-f i Bif662-GC-r s'ha analitzat en gels de gradient desnaturalitzant per tal d'obtenir el perfil genètic d'un fragment del gen del 16S ARNr de la població de *Bifidobacterium* present a l'aigua residual.

3.2.6.1 *Preparació del gel de gradient desnaturalitzant*

Els gels de gradient desnaturalitzant s'han realitzat amb poliàcrilamida al 8% (p/v) i amb un gradient desnaturalitzant d'urea i formamida optimitzat a una concentració del 45% a la part superior i 55% a la part inferior del gel. El 100% de formamida-urea s'ha calibrat i definit a una concentració 7 M d'urea i 40% de formamida deionitzada.

Per a realitzar el gel de gradient s'ha partit de dos solucions estoc la solució 1 i la solució 2 (Annex II). La solució 1 incorpora una concentració d'acrilamida al 8% (p/v) (30% Acrilamida/Bis Solution 37'5:1 (2,6% C) (Bio-Rad, Hercules, EUA) amb tampó TAE 1X (Annex II). La solució 2 presenta igual concentració d'acrilamida que la solució 1 a la que s'ha afegit una concentració 7 M d'urea (Fluka, Steinhem, Alemanya) i del 40% (p/v) de formamida deionitzada (Fluka, Steinhem, Alemanya). Per tant, la solució 1 conté un 0% d'agents desnaturalitzants, mentre que la solució 2 en conté un 80%. Aquestes solucions s'han mantingut a 4°C i apartades de la llum fins a la seva utilització.

Per a la construcció del gel s'ha utilitzat el suport vertical de l'equip de Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, EUA), una cubeta formadora de gradients lineals (CBS Scientific Company, EUA) i una bomba peristàltica (Amersham Pharmacia Biotech). A partir de les solucions estoc s'ha realitzat dues solucions: la solució A amb una concentració del 55% d'agents desnaturalitzants i la solució B amb una concentració del 45% (Taula 3.5). Els agents polimeritzants de l'acrilamida TEMED (N,N,N';N'-tetrametiletilenediamina) (Fluka, Steinhem, Alemanya) i persulfat amònic (APS) 10% (Bio-Rad, Hercules, EUA) (Annex II) s'han afegit en ambdós solucions. A la solució amb una major concentració de substàncies desnaturalitzants (solució A) s'ha afegit 100 µl de tampó de càrrega (Annex II) que

permet verificar visualment la correcta formació del gradient del gel, mitjançant un gradient de color.

Taula 3.5 Composició i concentració de les solucions d'acrilamida utilitzades en la DGGE.

	Solució A (55%)	Solució B (45%)	0%
Solució estoc 1 (0% desnaturalitzant)	4,38 ml	6,12 ml	5 ml
Solució estoc 2 (80% desnaturalitzant)	9,62 ml	7,88 ml	0 ml
TEMED	14 µl	14 µl	5 µl
APS	140 µl	140 µl	50 µl
Tampó de càrrega	100 µl		

La cubeta formadora de gradient consta de dos tubs: al tub A s'introdueix la solució d'acrilamida amb una major concentració d'agents desnaturalitzant (solució A) i al tub B la més diluïda (solució B) (Figura 3.3). Pròxim al tub A es situa l'orifici per on surt l'acrilamida i circula per un tub amb l'ajut d'una bomba peristàltica fins als vidres del suport vertical on es construeix el gel. Una vegada s'han introduït les solucions a la cubeta, s'obre una primera vàlvula que uneix els dos tubs i una segona que permet la sortida de l'acrilamida. Mitjançant vasos comunicants, a mesura que surt la solució més concentrada (tub A), la solució menys concentrada (tub B) passa al tub A i va diluint la solució més concentrada. Un agitador magnètic facilita la barreja d'ambdós solucions. De manera que es va creant un gel amb un gradient de substàncies desnaturalitzants que va d'una concentració del 55% a la part inferior, al 45% a la part superior. El tampó de càrrega que s'ha afegit a la solució A mostra un gradient de color que, igual que la concentració urea-formamida és més concentrat a la part inferior del gel.

Per tal de facilitar la formació dels pouets on es carrega l'ADN al gel, s'ha afegit, a la part superior, una capa d'acrilamida al 8% (p/v) sense agents desnaturalitzants (acrilamida 0%) (Taula 3.5).

Una vegada preparat el gel es deixa polimeritzar durant 2 hores a temperatura ambient.

Els fragments d'ADN d'aproximadament 550 pb obtinguts de la PCR amb els iniciadors Bif164-f i Bif662-GC-r, s'han separat mitjançant electroforesi. Les condicions utilitzades han estat un voltatge constant de 85 V a una temperatura de 60°C durant 16 h (Satokari, R.M. et al, 2001a).

Figura 3.3 Cubeta formadora de gradients amb els tubs A i B on s'hi afegeix les solucions corresponents; bomba peristàltica; i equip vertical de l'equip de Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad).



3.2.6.2 Visualització i anàlisi dels perfils genètics

Els gels s'han tenyit amb una solució de 20 ml de tampó TNE 1x (Annex II) amb 4 µl de SybrGold (Invitrogene, Eugene, EUA) per tal de visualitzar els patrons de bandes. Després d'una incubació de 45 min a temperatura ambient i en condicions de foscor, s'ha eliminat l'excés de SybrGold banyant el gel en 500 ml de TNE 1X (Annex II). Els perfils de les comunitats microbianes s'han visualitzat mitjançant un transil·luminador amb llum ultraviolada (UV) i s'han fotografiat amb un equip ImageMaster (Amersham Pharmacia Biotech). A la vegada s'ha digitalitzat la imatge del gel mitjançant un scanner i el programa Quantity One 1-D analysis Software (Bio-Rad, Hercules, EUA). La imatge digitalitzada s'ha analitzat amb el programa Fingerprinting II (Bio-Rad, Hercules, EUA) al Centre de Recerca en Seguretat Animal (CReSA) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.2.7 Extracció de les bandes de DGGE

Un cop visualitzats i catalogats els perfils obtinguts de les poblacions analitzades, s'ha procedit a l'anàlisi i identificació de les bandes que conformen els perfils. Per això s'han escindit les bandes del gel i després de la seva amplificació i purificació han estat seqüenciades. D'aquesta manera s'ha pogut identificar els bifidobacteris més abundants que constitueixen les poblacions de l'aigua residual dels diferents orígens estudiats.

Per a poder identificar les bandes s'ha il·luminat el gel amb la llum UV emesa per un transil·luminador. Aquesta radiació provoca lesions a l'ADN, així que per evitar possibles danys de les bandes s'ha utilitzat una placa Light-converter (UV products). Aquesta placa transforma la radiació UV emesa pel transil·luminador en fluorescència blava molt intensa. Per a poder observar les bandes s'ha utilitzat unes ulleres protectores amb filtre específic que elimina l'excés de fluorescència i permet observar la llum emesa pel SybrGold. D'aquesta manera s'han pogut veure les bandes que s'han escindit amb l'ajut d'un bisturí.

L'extracció de l'ADN de les bandes del gel d'acrilamida s'ha realitzat utilitzant dos protocols diferents:

- Els fragments d'acrilamida que contenen les bandes de DGGE s'han incubat durant 16 h a 4°C en 50 µl d'aigua bidestil·lada estèril. Una vegada centrifugades les mostres per tal de precipitar els residus d'acrilamida s'ha utilitzat el sobrenedant com a motlle d'ADN per reamplificar-lo amb els iniciadors Bif164-r/Bif662-f (Apartat 3.2.5.2).
- S'ha utilitzat el kit QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant, d'aquesta manera s'assegurava l'eliminació de l'acrilamida. S'ha obtingut un producte eluït en 20 µl de Tris-HCl 10 mM i pH 8.5 del que posteriorment s'ha utilitzat 2 µl per a la reacció de PCR (Apartat 3.2.5.2).

3.2.8 *Reacció de seqüenciació*

Prèviament a la reacció de seqüenciació, l'ADN extret de les bandes de DGGE i amplificat amb els iniciadors Bif164-r/Bif662-f tal com s'ha detallat a l'apartat 3.2.5 ha estat purificat. D'aquesta manera s'han eliminat els productes que pogués interferir en la reacció de seqüenciació. Amb aquesta finalitat s'ha utilitzat el kit QIAquick PCR purification (QIAGEN, Hilden, Alemanya) segons les instruccions del fabricant. Una vegada comprovada la intensitat de les bandes mitjançant un gel d'agarosa 2% en TBE 1X (Annex II) s'ha realitzat la reacció de seqüenciació.

S'ha obtingut la seqüència d'ambdós cadenes de les bandes d'ADN del gel de DGGE mitjançant el mètode Sanger (Sanger, F. et al, 1977). Per això, s'ha utilitzat la barreja Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) que conté els nucleòtids marcats i la Taq polimerasa en el tampó adequat. Per a cada reacció s'ha afegit 1 µl de la barreja, 1,6 µl dels iniciadors Bif164-f

o Bif662-r (1 μ M) i 1 μ l de l'ADN purificat. La reacció s'ha enrasat a 10 μ l amb aigua destil·lada estèril. El programa d'amplificació es mostra a la taula 3.6.

Taula 3.6 Programa per a la reacció de seqüenciació de les bandes extretes de la DGGE i posteriorment de les soques ambientals aïllades.

35 cicles	96°C	10 s
	55°C	5 s
	60°C	4 min
	4°C	∞

Un cop amplificades, les seqüències han estat analitzades al Servei Científico-Tècnic, de la Universitat de Barcelona mitjançant un seqüenciador automàtic d'electroforèsi capil·lar ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Les soques ambientals positives per la hibridació colonial de les diferents sondes, també han estat identificades mitjançant aquesta reacció de seqüenciació. S'ha utilitzat el mateix protocol que per a la identificació de les bandes de DGGE amb la diferència que s'ha afegit 1,5 μ l de Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, ja que els fragments analitzats són d'aproximadament 1500 pb.

3.2.9 Anàlisi de les seqüències d'ADN

Les seqüències obtingudes han estat analitzades fent ús del programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor versió 7.0.5.3) (Hall, T.A., 1999). Aquest programa permet l'alineament de les seqüències, així com la comparació de cadenes inversament complementàries.

S'ha estudiat la similitud de les seqüències obtingudes amb aquelles seqüències dipositades al banc de dades GenBank utilitzant el programa BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Wisconsin Package Version 10.2, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, EUA) (Altschul, S.F. et al, 1994) i la base de dades del Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Wang, Q. et al, 2007). D'aquesta manera s'han pogut identificar fins al nivell d'espècie les seqüències obtingudes de les bandes de DGGE.

Per a efectuar arbres filogenètics s'ha utilitzat el programa informàtic MEGA 4 (Center for Evolutionary Functional Genomics, Tempe, USA) (Tamura, K. et al, 2007). L'arbre filogenètic s'ha construït aplicant una matriu de distàncies obtinguda amb

l'algoritme de Jukes Cantor. La matriu de distàncies s'ha analitzat mitjançant el mètode de veïnatge ("neighbor-joining") amb un "bootstrap" de 1.000 repeticions.

3.2.10 *Disseny de sondes específiques i recuperació de soques ambientals mitjançant hibridació colonial*

Un cop identificades les espècies del gènere *Bifidobacterium* característiques i majoritàries dels diferents perfils de DGGE obtinguts, s'ha procedit a la recuperació d'aquestes espècies de les mostres ambientals. Per això, s'ha dissenyat sondes específiques de les espècies característiques dels diferents orígens. De les seqüències d'ADN obtingudes de les bandes de DGGE s'ha escollit com a representatives aquelles bandes majoritàries, comunes a totes les mostres d'un mateix origen fecal i exclusives de cada un dels diferents orígens estudiats. És a dir, aquelles bandes que només es detecten en un determinat origen. Amb aquesta finalitat, s'ha realitzat dos aproximacions diferents: a) Marcatge de les bandes de DGGE mitjançant UTP-digoxigenina i b) Disseny de noves sondes a partir de les seqüències obtingudes.

3.2.10.1 *Marcatge de les bandes de DGGE característiques dels diferents orígens mitjançant UTP-digoxigenina*

S'han amplificat per PCR amb els iniciadors Bif164-f i Bif662-r tal com s'ha comentat en l'apartat 3.2.5 algunes de les bandes escindides dels gels i identificades mitjançant seqüenciació. Per a la reacció s'ha utilitzat la concentració de reactius detallada a la taula 3.3 amb l'excepció de la barreja de nucleòtids. En aquest cas, s'ha afegit 1 µl d'una barreja que conté una concentració de 10 mM dels nucleòtids: dATP, dCTP i dGTP i 7 mM de dTTP, a més a més, s'ha afegit 3,5 µl del nucleòtid UTP marcat amb digoxigenina (UTP-Dig) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya). S'ha afegit 1 µl de l'extracció d'ADN del gel. D'aquesta manera s'ha aconseguit el fragment d'ADN d'unes 500 pb que incorpora, en alguns llocs, UTP-Dig enlloc de dTTP i per tant pot ser detectat utilitzant un anticòs antidigoxigenina.

3.2.10.2 *Disseny de noves sondes a partir de les seqüències obtingudes*

Mitjançant un alineament amb el programa BioEdit (Biological Sequence Alignment Editor versió 7.0.5.3) (Hall, T.A., 1999) de les seqüències obtingudes al identificar les bandes de DGGE, s'ha detectat una regió variable amb nucleòtids diferents per les seqüències escollides. En aquesta zona s'ha dissenyat les sondes

específiques per a poder distingir entre les diferents espècies. El programa informàtic *on line* Primer3 (v.0.4.0) (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) s'ha utilitzat per a analitzar la presència de possibles bucles i hibridacions internes de les sondes definides. Les sondes han estat sintetitzades per la casa comercial Sigma (St. Louis, EUA).

Les sondes obtingudes marcades amb digoxigenina s'han utilitzat per a detectar les soques característiques dels diferents orígens mitjançant una hibridació colonial de mostres ambientals o de soques aïllades a partir de mostres ambientals.

3.2.11 *Recuperació de soques ambientals del gènere Bifidobacterium característiques dels diferents orígens estudiats*

Per a l'anàlisi de mostres ambientals s'ha obtingut colònies de *Bifidobacterium* spp. crescudes en els medis selectius i diferencials: HBSA i Beerens (Apartat 3.2.2). La hibridació colonial s'ha realitzat sobre una membrana de niló Hybond N⁺ carregada positivament (Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Regne Unit) a la que s'han transferit les colònies crescudes en els medis esmentats mitjançant un contacte de membrana. O bé, s'han resembrat les colònies crescudes en aquest medis en petites estries sobre el medi ric CBA (Apartat 3.2.2) i el contacte de membrana s'ha realitzat sobre les soques crescudes en aquest medi. A continuació, s'ha seguit amb el procés d'hibridació descrit en estudis previs (Nebra, Y. et al, 2002):

→ *Lisis cel·lular*

- a. La membrana de niló sobre la qual han estat transferides les colònies s'ha col·locat sobre paper Whatman 3 MM saturat amb solució de lisi (Tris-HCl 10 mM, sacarosa 250 mM, pH 7,5) a la que s'ha afegit lisozima (Merck, Darmstadt, Alemanya) en una concentració 5 mg/ml (100.000 U/gr) (Annex II). S'ha incubat durant 1 h a 37°C per a permetre l'actuació de l'enzim sobre la paret de peptidoglicà dels bifidobacteris.
- b. S'ha transferit la membrana sobre un nou paper Whatman 3 MM saturat amb una solució desnaturalitzant (0,1 M NaOH) (Annex II) i s'ha incubat durant 10 min a temperatura ambient.

- c. S'ha neutralitzat la membrana amarrant un nou paper Whatman 3 MM amb solució neutralitzant (acetat sòdic 0,1 M, pH 6) (Annex II). S'ha incubat 2 h a temperatura ambient.
- d. Finalment s'ha rentat les restes cel·lulars amb solució 2x SSC amb 0,1% SDS (Annex II) incubant a temperatura ambient durant 4 min.
- e. S'ha assecat la membrana en un forn a 80°C durant 10 min.
- f. L'ADN ha estat fixat mitjançant una làmpada de llum ultraviolada (UV) durant 4 min per la cara de les cèl·lules i 2 min per la cara reversa.

Un cop fixat l'ADN o s'ha seguit amb el procés d'hibridació o s'ha guardat la membrana a 4°C embolcallada amb film transparent fins al moment de fer-ho.

→ *Hibridació*

- g. Per a eliminar les restes cel·lulars s'ha fet dos rentats a 68°C durant 45 min en una solució 3x SSC amb un 0,1% de SDS (Annex II). Seguidament s'ha posat la membrana entre dos fulls de paper Whatman 3 MM i s'ha fet pressió per tal de que les restes cel·lulars s'unissin al paper.
- h. S'ha prehibridat la membrana amb solució d'hibridació (Annex II). La prehibridació s'ha realitzat en un forn d'hibridació en agitació (Robbins Scientific Model 1000, Sunnyvale, EUA) durant 2-3 h a 60°C.
- i. Posteriorment, s'ha substituït la solució de prehibridació per 10 ml de solució d'hibridació que conté 25 ng/ml de la sonda marcada amb digoxigenina. S'ha realitzat al forn d'hibridació en agitació durant tota la nit a una temperatura adequada segons la temperatura d'hibridació de la sonda.

La banda de DGGE que incorpora UTP-Dig és un fragment d'unes 500 pb de doble cadena i per tant, s'ha realitzat un pas de desnaturalització previ a la hibridació. S'ha bullit la sonda durant 10 min i posteriorment s'ha mantingut 10 min més en gel. Un cop desnaturalitzada ja pot ser utilitzada per a la hibridació.

→ *Detecció de la sonda marcada*

- j. Per a eliminar l'excés de sonda, s'ha efectuat dos rentats un primer de 15 min i un segon de 30 min amb solució 5x SSC amb SDS 0,1% a la mateixa temperatura en que s'ha dut a terme la hibridació. A continuació s'ha fet dos nous rentats, un de 15 min seguit d'un segon de 30 min amb 2x SSC

amb SDS 0,1% a temperatura ambient en un agitador horitzontal (Certomat, B. Braun, Melsungen, Alemanya).

Per a la detecció de la digoxigenina s'ha utilitzat el Kit de detecció de digoxigenina amb el substrat colorimètric de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya) tal com s'indica a les instruccions del fabricant:

- k. S'ha realitzat un rentat de la membrana durant 5 min amb solució de rentat (Annex II) a temperatura ambient i en agitació.
- l. Per tal d'equilibrar la membrana s'ha incubat durant 30 min en tampó 2 (Annex II), també a temperatura ambient i en agitació. El tampó 2 conté agent bloquejant (Roche Diagnostics) per tal de bloquejar la membrana i evitar unions inespecífiques quan s'incubi amb l'anticòs.
- m. Seguidament s'ha incubat durant 30 min en les mateixes condicions i amb tampó 2 al que s'ha afegit una concentració 1:10.000 d'anticòs antidigoxigenina conjugat amb la fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya).
- n. Per a eliminar l'excés d'anticòs s'ha realitzat dos rentats de 15 min en solució de rentat (Annex II) a temperatura ambient i agitació.
- o. S'ha equilibrat la membrana durant 5 min en tampó 3 (Annex II) en agitació a temperatura ambient.
- p. Finalment s'ha incubat la membrana en una dilució 1:50 del substrat colorimètric de la fosfatasa alcalina, NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya), en tampó 3 a temperatura ambient i en condicions d'obscuritat un mínim de 30 min. S'ha aturat la reacció afegint aigua sobre la membrana.

3.2.12 *Confirmació de les soques ambientals "característiques" dels diferents orígens*

Les soques que han hibridat amb les sondes dissenyades s'han aïllat en el medi ric CBA. Mitjançant una estria en escocès s'ha verificat el cultiu pur i s'ha obtingut creixement en el medi brou RCM per tal de dur a terme l'extracció d'ADN. L'extracció dels àcids nucleics s'ha realitzant seguint el protocol descrit a l'Apartat 3.2.4. Com s'ha comentat en l'apartat 3.2.5.3, s'ha amplificat el gen del 16S ARNr d'aquestes soques mitjançant els iniciadors Lm26/Lm3 específics del gènere *Bifidobacterium* o amb els

iniciadors universals d'Eubacteria: 27f i 1492r (Taula 3.2) amb les condicions descrites prèviament (Taula 3.3 i 3.4). El fragment amplificat s'ha purificat i s'ha seqüenciat utilitzant els mateixos iniciadors amb que havien estat amplificats prèviament (Lm26/Lm3 o 27f/1492r) talment com es detalla a l'apartat 3.2.8.

Finalment s'ha estudiat la seva similitud amb les seqüències dipositades al GenBank i al Ribosomal Database Project II (apartat 3.2.9).

3.3 Resultats

3.3.1 Anàlisi de les soques tipus amb gels de gradient desnaturalitzant

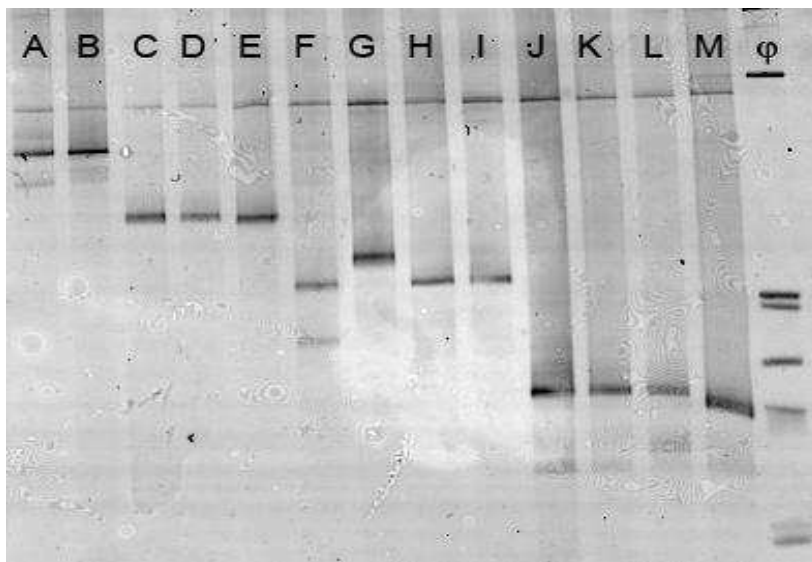
Prèviament a l'anàlisi dels perfils de les comunitats presents a les aigües residuals s'ha estudiat el comportament en gels de gradient desnaturalitzant de les soques tipus de *Bifidobacterium* spp. D'aquesta manera s'ha avaluat si el fragment del gen del 16S ARNr estudiat, presenta suficients diferències entre espècies per a ser observades mitjançant la tècnica de la DGGE, i si les condicions del gel i de l'electroforesi són idònies per a la seva separació.

Mitjançant les dues PCRs consecutives utilitzades s'han amplificat totes les espècies del gènere excepte: *Bif. animalis* ssp. *animalis* DSM 20104^T, *Bif. cuniculi* DSM 20435^T, *Bif. gallicum* DSM 20093^T, *Bif. gallinarum* DSM 20670^T i *Bif. magnum* DSM 20222^T. Les soques *Bif. animalis* ssp. *lactis* DSM 20223 i *Bif. coryneforme* DSM 20216^T presenten una diferència d'un nucleòtid amb l'iniciador Bif164-f, però tot així, han estat amplificades amb les condicions utilitzades i visualitzades amb la tècnica de DGGE (carrils D i Q Figura 3.4 A i B).

Els perfils de DGGE obtinguts a partir de l'anàlisi de les soques tipus es mostren a la figura 3.4. Algunes de les espècies del gènere *Bifidobacterium* com *Bif. subtile*, *Bif. breve* i *Bif. pseudocatenulatum* presenten una banda que assoleix una posició en el gel exclusiva d'aquestes, de manera que poden diferenciar-se clarament de la resta. D'altres, però, aconseguen la mateixa posició tot i tenir diferent seqüència d'ADN. Aquestes seqüències, o bé presenten els mateixos dominis de desnaturalització, o bé caldria disminuir el rang de concentració de substàncies desnaturalitzants per obtenir una major separació i poder-les diferenciar.

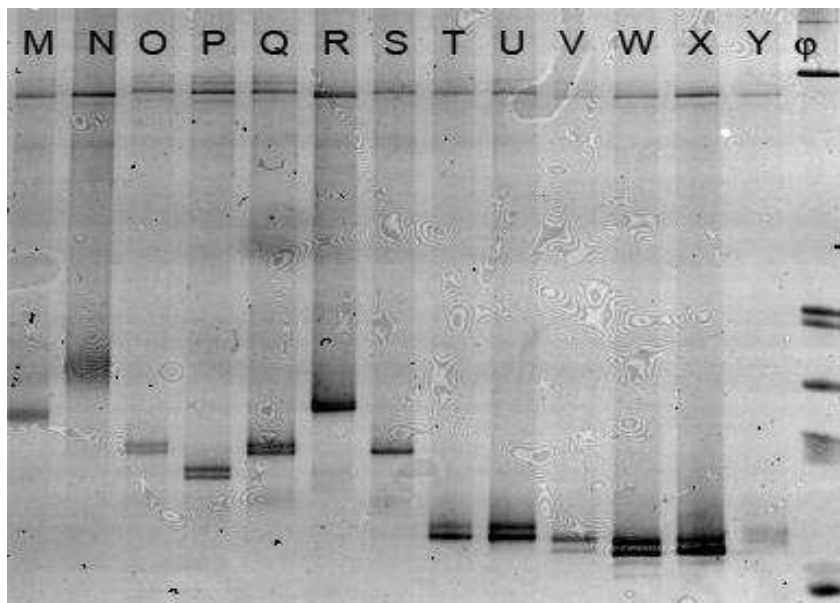
Figura 3.4. Anàlisi de les soques tipus de *Bifidobacterium* mitjançant un gel de gradient desnaturalitzant amb un rang de concentració del 45-55%.

Gel A. A: *Bif. adolescentis*; B: *Bif. ruminantium*; C: *Bif. catenulatum*; D: *Bif. animalis* ssp. *lactis*; E: *Bif. minimum*; F: *Bif. merycicum*; G: *Bif. subtile*; H: *Bif. longum*; I: *Bif. longum* ssp. *infantis*; J: *Bif. saeculare*; K: *Bif. pullorum*; L: *Bif. pseudolongum* ssp. *pseudolongum*; M: *Bif. scardovii*. ϕ : marcador de pes molecular PhiX 174 (HaeIII fragments).



A.

Gel B. M, *Bif. scardovii*; N, *Bif. breve*; O, *Bif. bifidum*; P, *Bif. pseudocatenulatum*; Q, *Bif. coryneforme*; R, *Bif. dentium*; S, *Bif. globosum*; T, *Bif. choerinum*; U, *Bif. angulatum*; V, *Bif. indicum*; W, *Bif. boum*; X, *Bif. thermophilum*; Y, *Bif. asteroides*. ϕ : marcador de pes molecular PhiX 174 (HaeIII fragments).

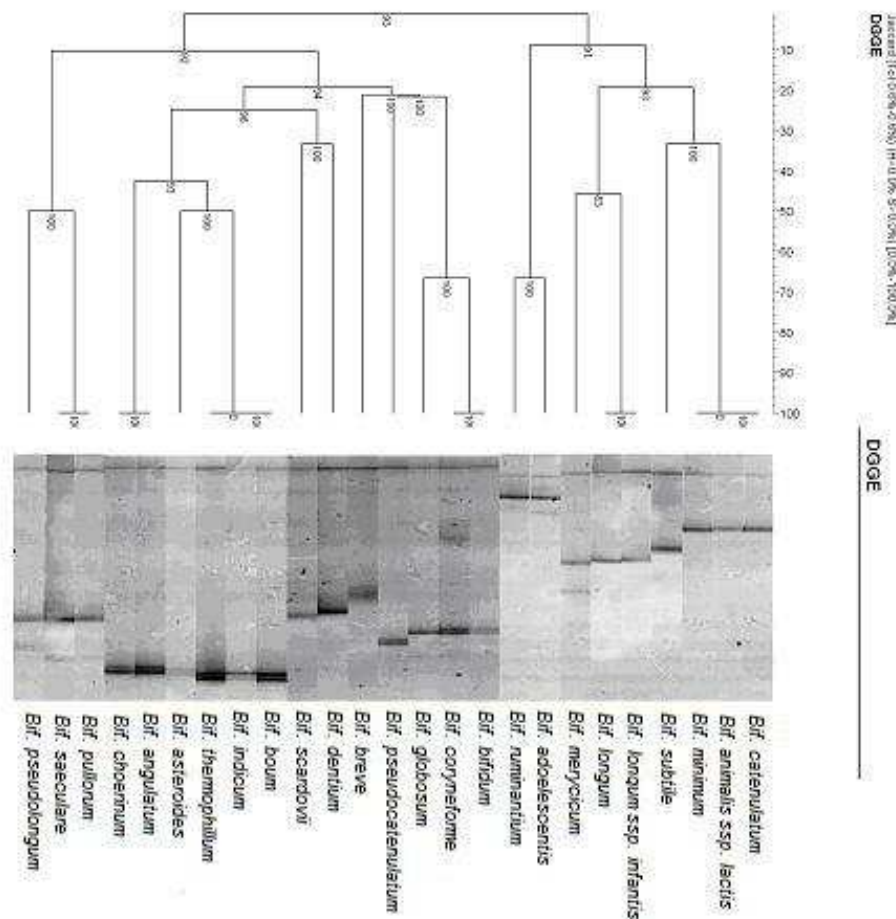


B.

Mitjançant el programa Fingerprinting II s'han agrupat les diferents espècies en funció de la localització de les bandes (Fig. 3.5). *Bif. boum*, *Bif. thermophilum* i *Bif. indicum* assoleixen la mateixa posició a la part més inferior del gel, on la concentració de substàncies desnaturalitzants és més elevada. *Bif. angulatum*, *Bif. choerinum* i *Bif. asteroides* formen un mateix grup amb una banda que es posiciona una mica més amunt que les tres anteriors. Les espècies *Bif. pseudolongum* ssp. *globosum*, *Bif.*

coryneforme i *Bif. bifidum* també aconseguen la mateixa posició. *Bif. dentium*, *Bif. scardovii*, *Bif. pseudolongum*, *Bif. pullorum* i *Bif. saeculare*, es col·locarien dins un mateix grup; *Bif. dentium*, sembla assolir una posició lleugerament superior a la resta que és difícil poder discernir si es degut a la naturalesa de la seqüència o a la formació del gel. Quasi bé a la part superior s'hi troba el grup format per *Bif. minimum*, *Bif. animalis* ssp. *lactis* i *Bif. catenulatum*. Finalment les dos subespècies de *Bif. longum*: ssp. *longum* i ssp. *infantis* assoleixen igual posició, juntament amb la primera de les dues bandes de *Bif. merycicum*. El mateix s'observa per *Bif. ruminantium* que assoleix la mateixa posició que la primera banda de *Bif. adolescentis*. Les espècies *Bif. adolescentis* i *Bif. merycicum* presenten dues bandes el que indica la presència de dues còpies del gen del 16S ARNr amb diferent seqüència nucleotídica.

Figura 3.5 Agrupació de les diferents espècies tipus de *Bifidobacterium* en funció de la localització de les bandes de DGGE.



Un dels problemes dels gels de DGGE és que no existeix un marcador molecular d'ús corrent que permeti situar les bandes obtingudes, en aquest cas s'ha afegit el marcador PhiX 174 (Promega, Madison, EUA) per tal de tenir una referència per a poder comparar entre els diferents gels realitzats.

3.3.2 *Anàlisi de mostres d'aigua residual de diferents orígens amb gels de gradient desnaturalitzant*

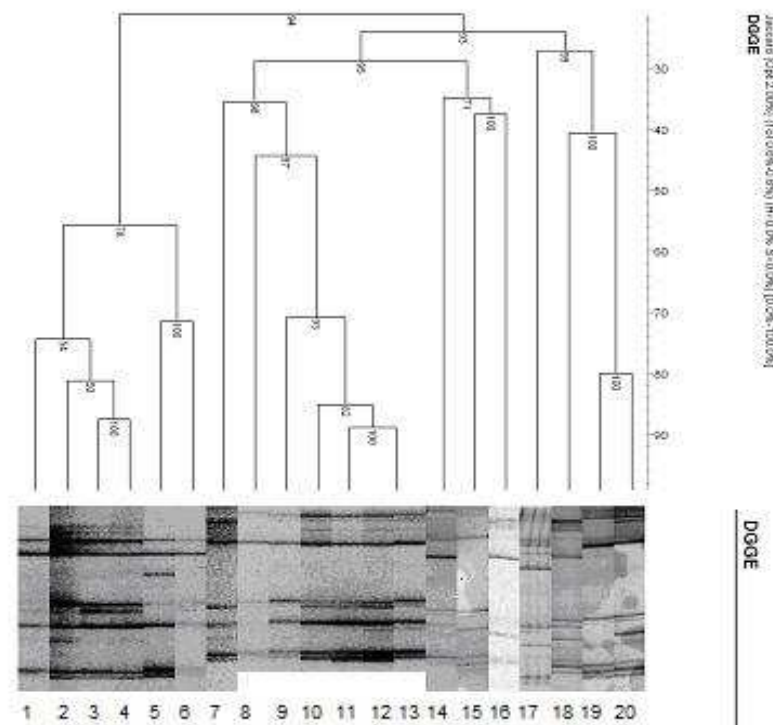
L'anàlisi mitjançant el mètode de DGGE amb un rang de substàncies desnaturalitzants entre 45-55% ha mostrat ser un mètode suficientment apte per a la separació de les diferents espècies que constitueixen el gènere *Bifidobacterium*. Per tant s'ha procedit a l'anàlisi de les comunitats de bifidobacteris presents a l'aigua residual de diferents orígens.

3.3.2.1 *Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen humà*

A diferència de les soques tipus, les mostres ambientals presenten un perfil format per varies bandes que representen les espècies més abundants que conformen la mostra. S'ha constatat la presència d'un perfil de bandes majoritàries bastant homogeni que es repeteix en pràcticament les 21 mostres analitzades d'aigua d'entrada a EDARs, i per tant d'origen humà. El programa Fingerprinting II ha permès l'aliniament dels perfils obtinguts en diferents gels de DGGE. A la figura 3.6 es comparen 20 dels 21 perfils obtinguts de l'anàlisi de mostres humanes, de manera que s'observa una semblança entre els diferents patrons obtinguts. Els perfils obtinguts estan compostos per un màxim de 9 bandes. La variabilitat entre perfils sembla més, deguda a variacions en la formació del gradient de cada gel que no pas a la diversitat de la mostra (de les mostres 14 a la 20, principalment). Aquestes variacions no s'han pogut normalitzar amb el programa informàtic Fingerprinting II.

La mostra 1 i la mostra 5 han estat obtingudes fora de Catalunya, a Xipre i França respectivament. En la mostra 1 s'observa un menor nombre de bandes, en canvi a la mostra 5 s'observa una nova banda; tot i així apareixen la majoria de bandes majoritàries. La manca d'alguna de les bandes majoritàries en certes mostres (per exemple en la 1, 5, 6, 8, 9 i 16) es pot associar a una menor diversitat de les espècies o més probablement a la menor quantitat d'ADN que es veu reflectida per una menor intensitat de la resta de les bandes.

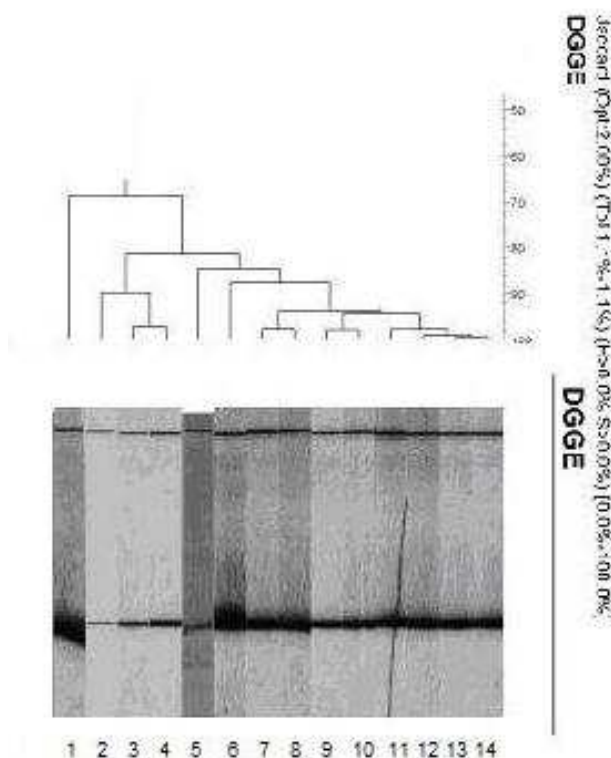
Figura 3.6 Perfils obtinguts de l'anàlisi de 20 de les 21 mostres d'aigua residual d'EDARs analitzades. Els diferents perfils han estat alineats mitjançant el programa Fingerprinting II.



3.3.2.2 Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen avícola

S'ha analitzat un total de 19 mostres analitzades obtingudes d'aigua residual d'escorxador d'aus. S'ha observat a totes elles un mateix perfil de DGGE representat per una sola banda. Això indica una baixa diversitat del gènere *Bifidobacterium* en l'aigua residual provinent d'escorxador d'aus, que estaria representada per una sola espècie (Fig 3.7). La banda obtinguda assoleix la mateixa posició que el grup format per les soques tipus: *Bif. pullorum*, *Bif. saeculare*, *Bif. pseudolongum*, *Bif. scardovii* i *Bif. dentium*.

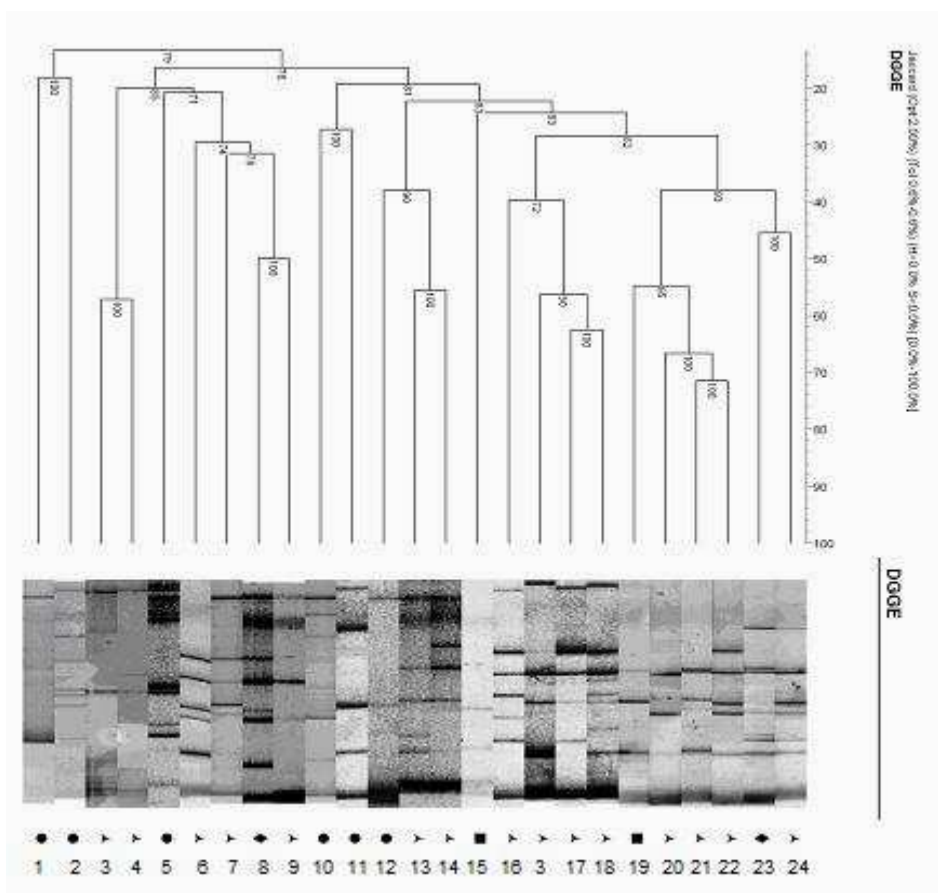
Figura 3.7 Perfils obtinguts en l'anàlisi de 14 de les 19 mostres d'aigua residual d'escorxadors d'aus analitzades. Els perfils han estat alineats mitjançant el programa Fingerprinting II.



3.3.2.3 Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen porcí

S'ha analitzat un total de 24 mostres d'origen porcí, entre les quals s'hi inclouen mostres de purí i mostres d'aigua residual d'escorxadors. Tal com s'observa a la figura 3.8, les mostres de purí (marcades amb els símbols: ▲ (granja A), ◆ (granja B) i ■ (granja C de Xipre)) presenten, en general, una elevada diversitat. Els perfils obtinguts presenten un elevat nombre de bandes que dificulta la definició d'un patró més o menys homogeni entre mostres tal com s'ha realitzat a l'analitzar les mostres d'aigua residual d'origen humà i d'aus. L'anàlisi d'aigua residual d'escorxadors on es sacrifica bestiar porcí (marcat amb ●) mostra una menor diversitat que l'obtinguda a l'analitzar les mostres de purí. L'alineament dels diferents gels en les condicions utilitzades amb el programa Fingerprinting II, no permet avaluar si la diferència entre bandes pròximes es deguda a diferències de la formació del gradient entre gels o variacions en la diversitat de la mostra. Es pot observar, però, algunes bandes comunes en la majoria de mostres analitzades.

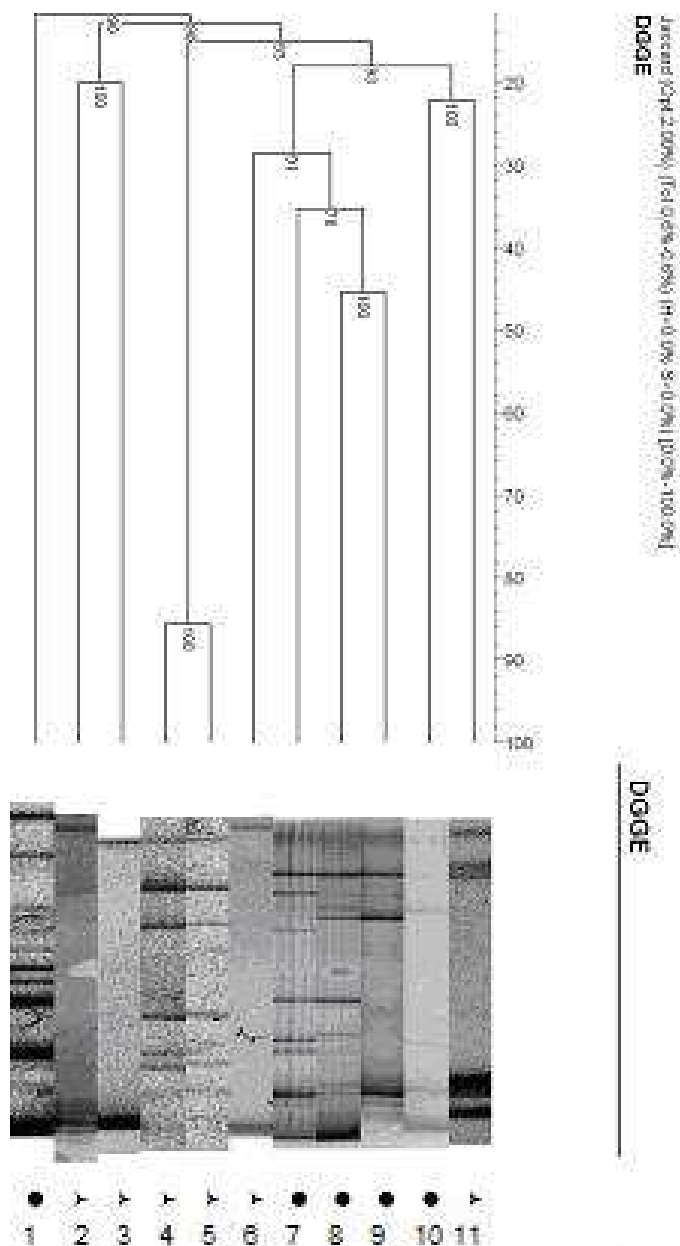
Figura 3.8 Perfils obtinguts en l'anàlisi de les 24 mostres d'origen porcí analitzades i alineades mitjançant el programa Fingerprinting II.



3.3.2.4 Anàlisi de mostres d'aigua residual d'origen boví

En el cas de les mostres d'origen boví, també s'ha analitzat mostres de diferent naturalesa: 7 mostres obtingudes d'aigua residual d'escorxador on es sacrifica bestiar boví i 6 mostres de femtes. L'anàlisi dels perfils obtinguts assenyalen una elevada heterogeneïtat entre mostres que no es veu associada al lloc d'obtenció. A la figura 3.9, existeixen mostres de femtes (marcades amb el símbol ▲) amb una baixa diversitat de bifidobacteris mentre que és molt més alta en altres (mostres 7 i 11 *versus* 3 i 4). Les mostres obtingudes d'aigua residual d'escorxador (marcades amb el símbol ●) també mostren aquesta heterogeneïtat (mostra 2 *versus* mostra 6). Tot i així, es poden observar algunes de les bandes que són compartides en varies de les mostres analitzades.

Figura 3.9 Perfils obtinguts en l'anàlisi d'11 de les 13 mostres d'origen boví analitzades. S'han alineat mitjançant el programa Fingerprinting II.

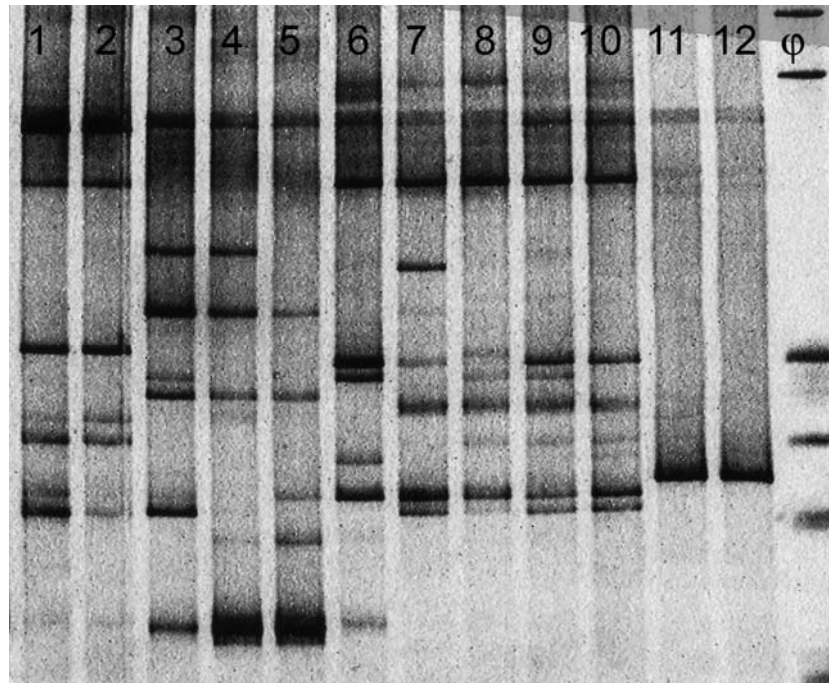


3.3.2.5 Anàlisi de mostres d'aigua residual de diferents orígens

Quan es compara mostres d'aigua residual de diferents orígens analitzades en el mateix gel, es a dir, sotmeses a igual condicions de gradient, es detecten diferències entre els perfils. A la figura 3.10 es mostra l'anàlisi d'un gel i en els carrils 1 i 2 s'observa la diversitat de bifidobacteris presents en aigua residual obtinguda d'una granja de bestiar boví. Els perfils que es mostren dels carrils 3 al 6 corresponen a mostres del tanc d'acumulació de purins de dos granges de porcs (carrils 3-5 de la

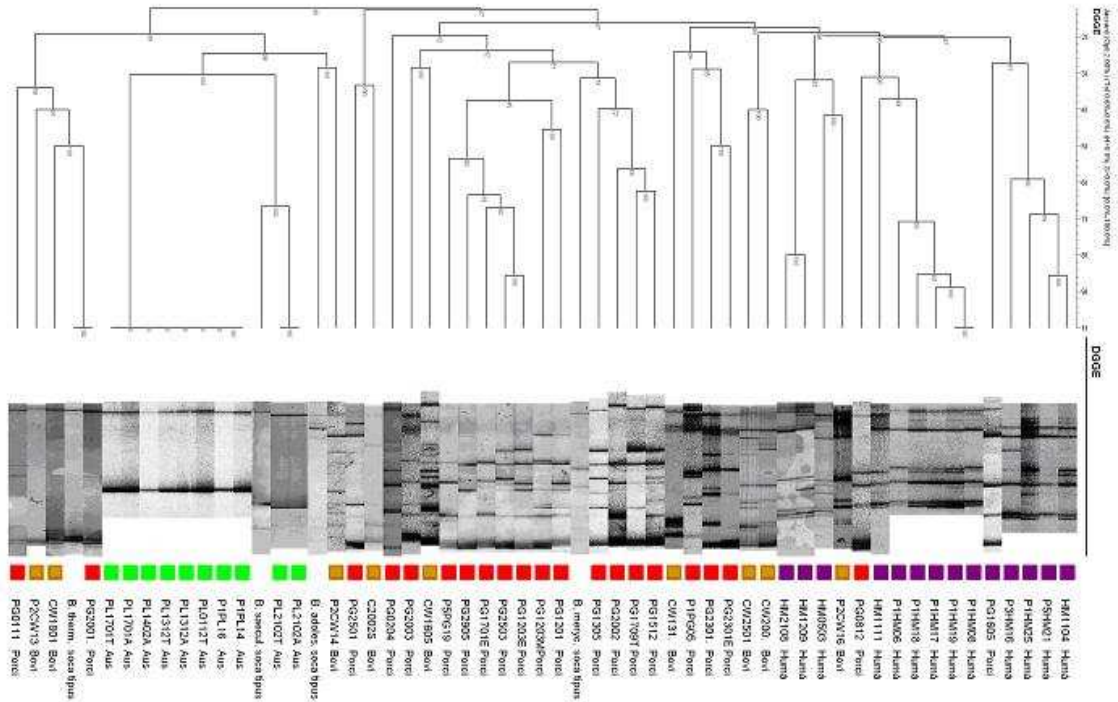
granja A i 6 de la granja B). Dels carrils 7 al 10 els constitueixen mostres d'aigua residual d'origen urbà. Finalment als carrils 11 i 12 s'observa l'anàlisi de mostres d'aigua residual d'escorxador d'aus. Per tant, mostres de diferents orígens presenten diferents perfils de DGGE entre les quals es pot distingir bandes exclusives de cada origen.

Figura 3.10 Anàlisi de diferents mostres d'aigua residual de diferents orígens. Carrils 1-2: mostres d'origen boví. Carrils 3-6: mostres d'origen porcí. Carrils 7-10: mostres d'origen humà. Carrils 11-12: mostres d'origen avícola.



És difícil reproduir exactament les mateixes condicions de gradient entre gels (Nakatsu, C.H., 2007). Això dificulta la comparació dels perfils obtinguts entre les mostres de diferents orígens en gels diferents, ja que petites variacions entre gradients dels gels, poden derivar a alteracions de les distàncies entre bandes. L'anàlisi dels perfils obtinguts mitjançant el programa Fingerprinting II mostra en un arbre fil·logenètic UPGMA amb índex de Jaccard, la separació d'alguns dels grups atenen a l'origen de la mostra (Fig 3.11). Tant les mostres humanes com d'aus formen grups ben diferenciats (les mostres humanes estan senyalades mitjançant el color lila i les d'aus amb verd). En canvi les diferències són més difuses quan es parla de mostres d'origen boví i porcí (representades pel color groc i vermell respectivament), l'elevada diversitat d'espècies d'algunes mostres, la heterogeneïtat d'aquestes i diferències entre gradients de gels dificulta la resolució dels perfils.

Figura 3.11 Perfils obtinguts de l'anàlisi de mostres de diferents orígens alineats i classificats en un arbre fil·logenètic UPGMA utilitzant el programa Fingerprinting II (color lila: mostres d'origen humà; verd: mostres d'origen avícola; vermell: mostres d'origen porcí; groc: mostres d'origen boví).



3.3.3 Identificació de les bandes de DGGE de les mostres d'aigua residual de diferents orígens

Per tal de poder identificar les bandes de DGGE, s'ha utilitzat dos protocols diferents per extreure l'ADN del gel d'acrilamida:

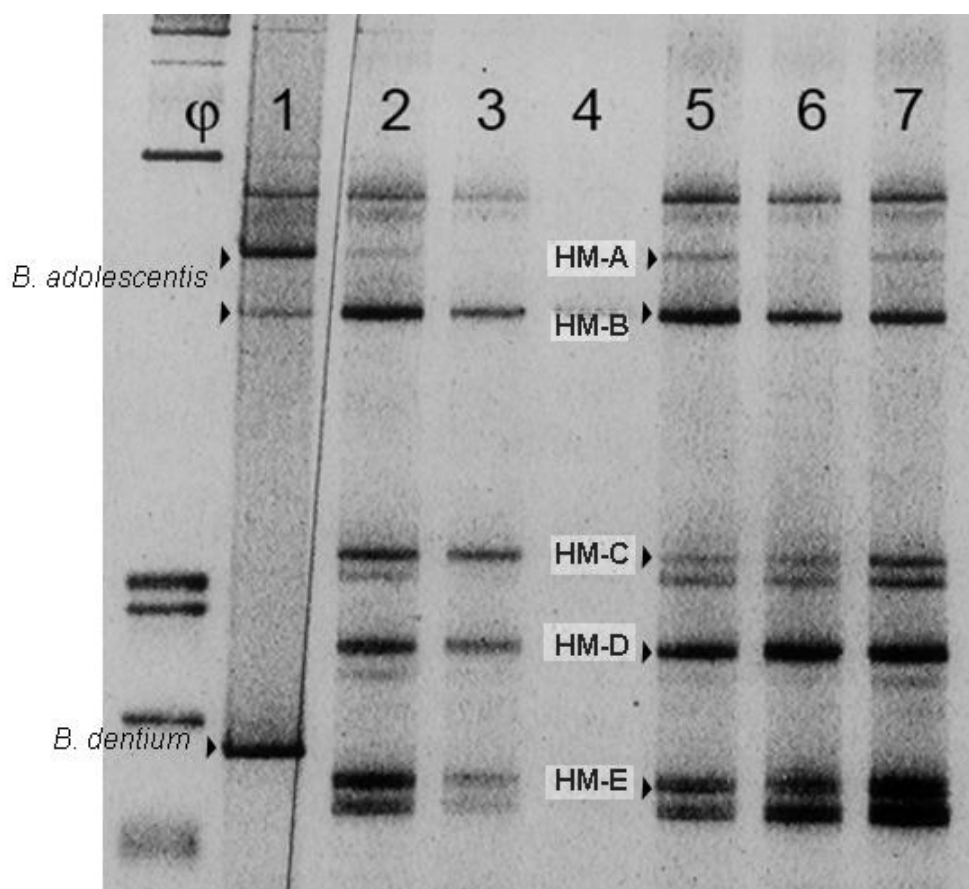
→ El primer mètode ha consistit, simplement en tallar i incubar les bandes en aigua a 4°C durant tota una nit. Aquest protocol és fàcil i econòmic, però no han pogut ser amplificades totes les bandes que han estat extretes utilitzant aquest mètode. Aquest fet es deu, probablement, a una inhibició de la reacció de PCR posterior a l'extracció de l'ADN, per la presència d'acrilamida residual a l'extracte.

→ Per tal de pal·liar aquest inconvenient s'ha utilitzat el Kit d'extracció QIAEX II. Aquest kit, ha permès una correcta extracció i una posterior amplificació de totes les bandes obtingudes del gel de DGGE.

3.3.3.1 Identificació de les bandes de mostres d'origen humà

S'ha realitzat l'extracció d'algunes de les 9 bandes del perfil típic obtingut en les mostres d'origen humà. S'ha observat que la banda que es localitza a la part superior dels 6 perfils que es mostren a la figura 3.12, també apareix en la resta de mostres humanes i animals i en les soques tipus analitzades. S'ha postulat que algunes molècules, degut a determinades condicions, poden aconseguir conformacions anòmales o formar molècules heterodúplex. Aquestes estructures són més inestables i per tant es desnaturalitzen amb facilitat afectant l'avanç pels porus d'acrilamida, d'aquesta manera s'acumulen a la part superior del gel (Satokari, R.M. et al, 2001a). Quan s'ha obtingut la seqüència d'aquesta banda, s'ha observat, la presència d'un elevat número de nucleòtids que no han pogut ser identificats, fet que indicaria una barreja de seqüències que només poden ser identificats amb una clonació prèvia per tal de separar-les.

Figura 3.12 Perfils típics de DGGE obtinguts a partir de mostres d'aigua residual d'origen humà. Es marquen les bandes que han estat identificades. Carril 1: soques tipus: *Bif. adolescentis* i *Bif. dentium*. Carrils 2-7: mostres d'aigua residual d'origen humà.



Les bandes HM-A i HM-B coincideixen a la mateixa posició que les dues bandes observades per a la soca tipus *Bif. adolescentis* (Fig 3.12 carril 1). L'anàlisi d'ambdós

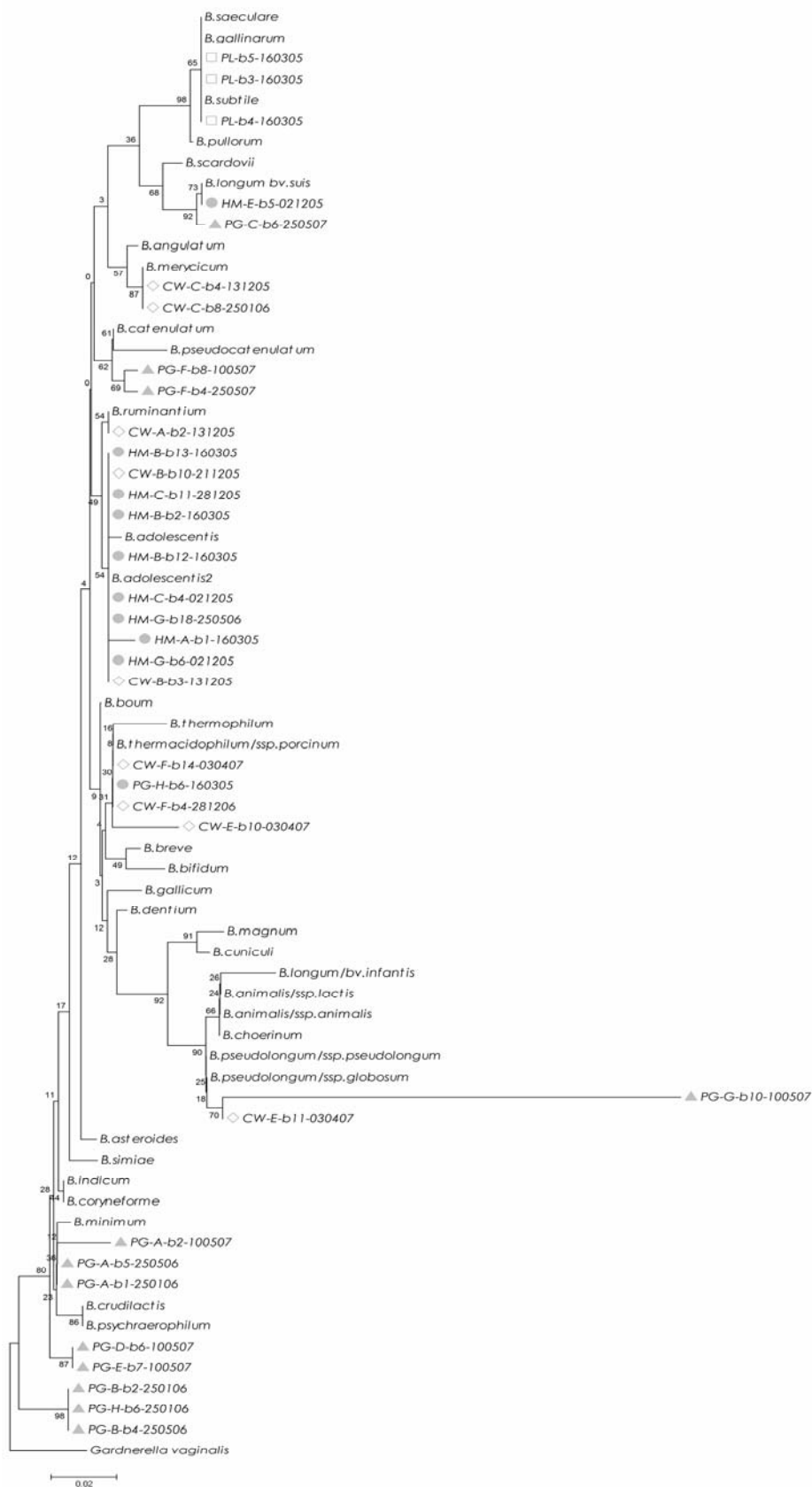
seqüències mostra que existeix un 100% de similitud amb la seqüència de diferents soques de *Bif. adolescentis* dipositades al GenBank i al RDP. A la figura 3.13 es mostra la distribució de les bandes de DGGE identificades a partir dels diferents perfils dels diferents orígens en relació a les diferents espècies de *Bifidobacterium* dipositades a la base de dades RDP. La banda HM-B es troba en totes les mostres analitzades i presenta una major intensitat que la banda HM-C, aquesta, en canvi, només s'ha detectat en 15 de les 21 mostres analitzades. La seva absència està més associada a una baixa concentració de material genètic de la mostra que no pas a la inexistència de la banda, ja que la resta del perfil es visualitza a una més baixa intensitat.

A la resta de bandes detectades en els perfils humans s'observa la presència de bandes molt pròximes entre elles. Aquest doble bandeig s'ha descrit en altres estudis i s'ha associat a un avortament de l'elongació durant la reacció de PCR causat al produir-se un bucle en la cua de GCs, resultant-ne dues molècules amb una petita diferència en el comportament de migració (Nubel, U. et al, 1996; Satokari, R.M. et al, 2001a). L'anàlisi de la banda HM-C revela un 100% de similitud amb seqüències de bacteris no cultivables dipositades a les dues bases de dades analitzades. La soca tipus més propera és *Bif. adolescentis* amb un 98% de similitud (Fig. 3.13). HM-C s'observa a tots els perfils obtinguts, mentre que la banda inferior associada a ella, en 16 dels 21.

S'ha observat que la banda HM-D presenta una seqüència d'ADN amb un 99% de similitud amb l'espècie *Bif. longum* (Fig 3.13) tot i que no assoleix la mateixa posició (Fig. 3.4.B). La primera banda s'ha detectat en 18 de les 21 mostres analitzades i el doble bandeig només en 6 d'elles.

La seqüència obtinguda de l'extracció de la banda HM-E, presenta un 98% de similitud amb una soca no cultivada i l'espècie coneguda més pròxima és *Bif. adolescentis*, també amb un 98% de similitud (Fig 3.13). Aquesta banda es fa pal·lesa a les 21 mostres i només en una no s'observa el doble bandeig.

Figura 3.13 Arbre filogenètic classificant les bandes de DGGE seleccionades i les seqüències de diferents *Bifidobacterium* spp dipositades a la base de dades RDP. Realitzat a partir d'una matriu de distàncies obtinguda amb l'algoritme de Jukes Cantor analitzada mitjançant el mètode de veïnatge ("neighbor-joining") amb un "bootstrap" de 1.000 repeticions.



3.3.3.2 Identificació de les bandes de mostres d'origen avícola

La única banda observada en aigua residual d'origen avícola (PL) arriba a la mateixa posició on ho fan les soques tipus *Bif. saeculare*, *Bif. pullorum*, *Bif. pseudolongum*, *Bif. dentium* i *Bif. scardovii*. La seqüència de la banda mostra una similitud del 100% amb la seqüència de *Bif. saeculare* i 99% amb *Bif. gallinarum* i *Bif. pullorum* dipositades al GenBank i al RDP (Fig. 3.13). En alguns casos s'ha detectat una doble banda tal com s'ha descrit en el perfil d'origen humà, en aquest cas ha estat analitzada i presenta la mateixa seqüència que l'anterior, fet que confirmaria la possibilitat que es pugui produir una doble banda per una mateixa seqüència.

La banda que apareix a la part superior del gel, presenta la mateixa seqüència que la única banda descrita en aus. Això, reforça que pugui estar formada per conformacions anòmales de la única molècula detectada i que s'acumulen a la part superior del gel.

3.3.3.3 Identificació de les bandes de mostres d'origen porcí

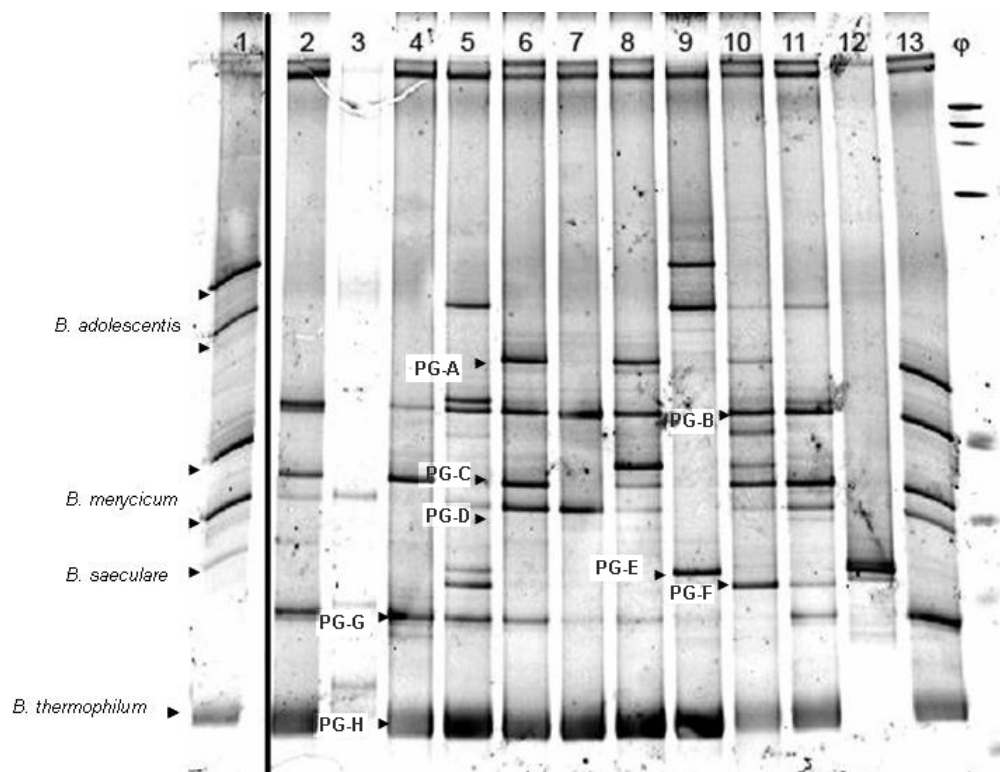
S'ha identificat algunes de les bandes majoritàries i més comunes observades en mostres obtingudes de porcs. A la figura 3.14 s'observa els perfils obtinguts per algunes mostres i les bandes que han estat identificades. La banda PG-A ha estat detectada en 9 de les 24 mostres analitzades i assoleix la mateixa posició que *Bif. minimum*, *Bif. infantis* ssp. *lactis* i *Bif. catenulatum*. S'ha extret l'ADN i identificat la seqüència de la banda, que ha mostrat un 99% de similitud amb la seqüència de *Bif. minimum* dipositada al GenBank (Fig. 3.13).

La banda PG-B s'ha observat en un total de 18 de les 24 mostres analitzades. La comparació de la seqüència amb les bases de dades gèniques no ha permès identificar la banda, la similitud màxima obtinguda ha estat d'un 94% amb l'espècie *Bif. simiae* (Fig. 3.13).

Degut a la proximitat de les bandes PG-C i PG-D, és difícil poder determinar la seva freqüència al comparar els perfils alineats mitjançant el programa Fingerprinting II, així com en el cas de les bandes PG-E, F i G. La banda PG-C assoleix la mateixa posició que *Bif. longum* i la banda superior de *Bif. merycicum*. L'anàlisi de la seqüència ha mostrat que comparteix una similitud del 98% amb *Bif. longum* (Fig. 3.13). La banda PG-D presenta una baixa similitud amb les seqüències de les bases de dades, les espècies més pròximes són *Bif. crudilacis*, *Bif. psychroaerophilum* i *Bif. minimum* amb una similitud del 94%. Una situació similar s'ha observat per la banda PG-E (Fig. 3.13).

PG-F es posiciona com la soca tipus *Bif. pseudocatenulatum* (Fig. 3.13) i la comparació de la seva seqüència amb les bases de dades mostra, amb ella, un 99% de similitud. L'anàlisi de la seqüència PG-G mostra un elevat contingut de nucleòtids sense identificar, el que probablement indica una barreja de seqüències. Tot i així l'anàlisi de fragments identificables han mostrat similitud amb *Bif. pseudolongum*, amb qui es relaciona quan es realitza l'arbre filogenètic mostrat a la figura 3.13. Finalment la banda PG-H es troba en pràcticament totes les mostres analitzades (22 de 24) i es posiciona com *Bif. asteroides*, *Bif. boum* i *Bif. thermophilum*. L'anàlisi de la seva seqüència ha mostrat un 100% de similitud amb les espècies *Bif. thermophilum* i *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum* (Fig. 3.13).

Figura 3.14 Gel de gradient desnaturalitzant on s'analitzen mostres d'origen porcí. Les bandes marcades han estat identificades. Carril 1: Soques tipus: *Bif. adolescentis*, *Bif. merycicum*, *Bif. saeculare* i *Bif. thermophilum*. Carrils 2,6,7 i 8 i 13: mostres de purí de la granja de porcs A; Carrils 3 i 4: mostres de purí de la granja de porcs B; Carrils 5, 10 i 11: mostres de purí de la granja de porcs C. Carrils 9 i 12: mostres d'aigua residual d'escorxador de porcs.

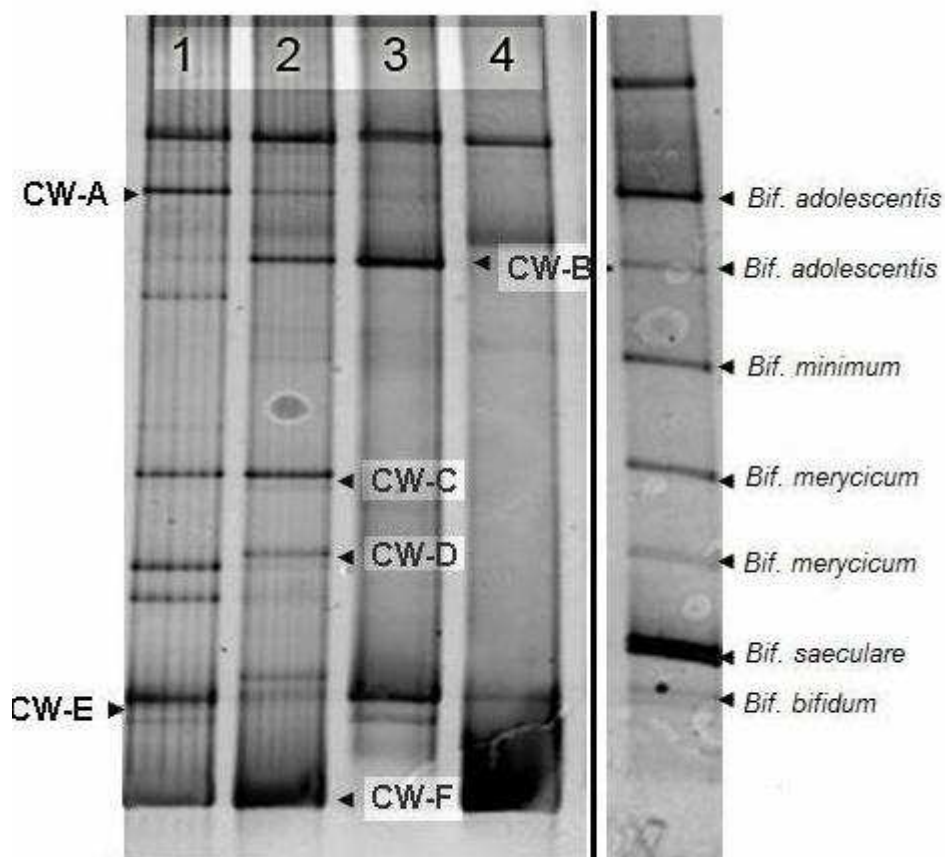


3.3.3.4 Identificació de les bandes de mostres d'origen boví

Talment com s'ha realitzat amb les mostres d'altres orígens s'ha analitzat i identificat algunes de les bandes majoritàries dels perfils obtinguts per les mostres d'origen boví. A la figura 3.15 es mostra el perfil de 4 mostres representatives analitzades, on s'ha marcat les bandes que han estat identificades. La banda anomenada com CW-A, definida a 8 de les 13 mostres analitzades, assoleix la mateixa

posició que la banda superior de *Bif. adolescentis* i *Bif. ruminantium*. Un cop coneguda la seqüència d'ADN s'ha observat que presenta un 99% de similitud amb aquesta última (Fig. 3.13). La banda CW-B s'ha trobat a 5 de les 13 mostres analitzades i es posiciona i presenta un 100% de similitud amb *Bif. adolescentis*. CW-C i CW-D arriben a la mateixa situació que ho fan les dues bandes de *Bif. merycicum*. S'ha detectat aquestes dues bandes, a 5 de les 13 mostres analitzades. La banda CW-D no ha estat identificada però CW-C mostra un 100% de similitud amb *Bif. merycicum* (Fig. 3.13). La banda CW-E es posiciona com *Bif. pseudolongum* ssp. *globosum* i s'ha descrit en 10 de les 13 mostres analitzades. L'anàlisi de la seqüència mostra un 100% de similitud amb les subespècies de *Bif. pseudolongum*: *pseudolongum* i *globosum* (Fig. 3.13). La última de les bandes analitzades: CW-F s'ha detectat en 9 de les 13 mostres i assoleix el mateix lloc que les soques tipus: *Bif. asteroides*, *Bif. boum* i *Bif. thermophilum* i la banda descrita en porcs PG-H. Aquesta banda ha mostrat, que com PG-H, presenta un 100% de similitud amb *Bif. thermophilum* i *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum* (Fig. 3.13).

Figura 3.15 Gel de DGGE mostrant el perfil de 4 mostres representatives d'origen boví i les seves bandes característiques.



3.3.4 Recuperació d'espècies majoritàries i exclusives d'aigües residuals de diferents orígens

Una vegada identificades les bandes majoritàries dels perfils dels diferents orígens, s'ha procedit a la selecció d'aquelles bandes més estretament associades a un origen fecal. Sobre aquestes seqüències s'ha definit sondes d'ADN de manera que permetin la detecció de soques exclusives de cada origen en mostres ambientals.

Per aquest objectiu s'han realitzat dues aproximacions:

- s'ha marcat, directament, la banda de DGGE amb UTP-digoxigenina mitjançant una PCR.
- s'ha dissenyat sondes específiques a partir de la seqüència obtinguda de l'anàlisi de les bandes.

3.3.4.1 Marcatge de les bandes de DGGE

Les bandes seleccionades per marcar com a sondes han estat:

- HM-B: Banda obtinguda del perfil humà present a totes les mostres analitzades. Presenta un 100% de similitud amb les seqüències corresponents de *Bif. adolescentis* dipositades a les bases de dades GenBank i RDP.
- PL: Única banda present a totes les mostres d'origen avícola. Presenta un 100% de similitud amb les seqüències corresponents de *Bif. saeculare* dipositades a les bases de dades GenBank i RDP.
- PG-B: Banda observada en 18 de les 24 mostres de porcs analitzades i fàcil d'aïllar ja que no hi ha bandes pròximes amb les que hi pugui haver confusió. Aquesta banda no ha estat identificada per comparació amb les seqüències dipositades a les bases de dades GenBank i RDP, però la seqüència més pròxima és *Bif. simiae* amb un 94% de similitud.
- CW-E: Banda observada en 10 de les 13 mostres d'origen boví analitzades. Presenta un 100% de similitud amb amb les seqüències corresponents de *Bif. pseudolongum* ssp. *globosum* dipositades a les bases de dades GenBank i RDP.
- CW-F: Aquesta banda es posiciona igual que la banda observada en porcs PG-H i presenta la mateixa seqüència (100% de similitud amb *Bif.*

thermophilum i *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum*). S'ha observat en 9 de les 13 mostres bovines (en les tres mostres on no s'ha detectat CW-E) i en 22 de les 24 porcines.

Aquestes sondes presenten una longitud d'unes 500 pb (tota la banda de DGGE). Cal tenir en compte, que un elevat número de zones del gen del 16S ARNr presenten poques variacions entre les espècies del mateix gènere; per tant poden produir-se unions inespecífiques durant la hibridació. S'ha utilitzat una temperatura d'hibridació de 70°C per tal de minimitzar-les.

Utilitzant la sonda HM-B s'han hibridat 16 soques aïllades a partir d'una mostra d'aigua d'entrada a EDAR utilitzant el medi selectiu Beerens (Taula 3.7). Cinc d'elles han hibridat amb la sonda i totes 5 han pogut ser amplificades amb els iniciadors Im26/Im3, específics del gènere *Bifidobacterium*. Una de les soques ha estat identificada com *Bif. adolescentis* (HM05) amb un 99% de similitud. Les quatre restants han estat identificades dos d'elles com *Bif. longum* (amb un 97% i un 99% de similitud), *Bif. pseudocatenulatum* (HM08 amb un 98% de similitud) i amb *Bif. pseudolongum* ssp. *pseudolongum* (HM12 amb un 99%).

S'ha seguit el mateix mètode per tal de recuperar mostres obtingudes d'aigua residual d'escorxadors d'aus. Per tant, s'ha utilitzat el medi Beerens ja que presenta una millor recuperació del gènere *Bifidobacterium* spp. que no pas el medi HBSA (Bonjoch, X., 2004b). Tot i així s'ha observat que l'espècie *Bif. saeculare* no creix bé en aquest medi. Per aquesta raó s'ha utilitzat ambdós medis per tal d'obtenir aïllaments de mostres d'escorxador de pollastre. S'han aïllat 33 soques utilitzant el medi Beerens i 27 utilitzant el medi HBSA. Quinze de les soques aïllades en Beerens han hibridat amb la banda PL (Taula 3.7), de les quals, només 3 s'han amplificat a l'utilitzar els iniciadors Im26/Im3 específics del gènere. Mitjançant seqüenciació, s'ha identificat aquestes espècies com *Bif. longum* (amb un 97% de similitud), que no correspon amb la seqüència de la banda. Per tant, la sonda s'uneix inespecíficament a soques d'altres espècies. S'ha utilitzat els iniciadors universals: 27f/1492r per a identificar dues de les soques que no havien estat identificades amb els iniciadors del gènere. Aquestes dues espècies han resultat pertànyer al gènere *Lactobacillus*.

De les 27 soques aïllades utilitzant el medi HBSA, 8 han hibridat amb la banda PL marcada. Cap d'aquestes soques ha crescut en el medi Beerens, on tan sols han pogut ser recuperades 9 de les 27 soques aïllades en el medi HBSA. A la vegada, cap de les soques positives per a la hibridació, han pogut ser amplificades fent ús dels

iniciadors Im26/Im3. S'ha utilitzat els iniciadors universals per tal d'identificar dues de les soques positives per a la hibridació, que han mostrat un 94% de similitud amb l'espècie *Morganella morganii*.

Per a la recuperació de soques a partir de mostres d'origen porcí s'ha aïllat 26 soques de dues mostres diferents. Dotze soques procedeixen d'una mostra de purí d'una granja de bestiar porcí i 14 d'una segona mostra provinent d'aigua residual d'un escorxador on es sacrifica porcs exclusivament. Onze de les soques han resultat hibridar amb la sonda PG-B (Taula 3.7). S'ha fet una primera aproximació i s'ha identificat dues de les soques positives, ambdós han estat amplificades mitjançant els iniciadors genèrics de *Bifidobacterium* spp. La seva identificació mitjançant seqüenciació ha posat en manifest la inespecificitat de la sonda ja que ambdós soques han estat identificades com *Bif. thermacidophilum* (PG2 amb un 99% de similitud i PG9 amb un 97%).

S'ha aïllat 44 soques d'origen boví a partir de quatre mostres de quatre escorxadors diferents. Disset soques han hibridat amb la sonda CW-E i vint per CW-F, 14 de les soques han hibridat amb ambdós sondes, el que assenyala una possible inespecificitat de les sondes (Taula 3.7). S'ha procedit a la identificació de 5 soques: una positiva exclusivament per la sonda CW-E, dues per la sonda CW-F i dues que hibridaven amb ambdós sondes. Només les dues soques que havien hibridat per ambdós sondes s'han amplificat amb els iniciadors Im26/Im3. Aquestes soques han estat identificades com *Bif. thermophilum* / *Bif. thermacidophilum* ssp. *suis* amb un 99% de similitud.

La inespecificitat d'aquestes sondes d'uns 500 pb també s'ha posat en manifest al obtenir hibridacions positives amb certes soques tipus que teòricament no haurien de ser diana de la sonda. Per tal d'evitar aquestes inespecificitats s'han creat noves sondes de menor longitud a partir de la seqüència obtinguda de les bandes.

Taula 3.7 Identificació de soques aïllades a partir d'aigua residual de diferents orígens mitjançant hibridació amb les sondes obtingudes amb el marcatge de la banda de DGGE.

Sonda	Similitud de la sonda amb espècies del GenBank	Núm. d'aïllaments (sorbitol positius) ¹	Proporció de soques que han hibridat amb la sonda	Proporció de soques amplificades amb Im26/Im3 de les que han hibridat	Identificació de les soques seqüenciades amb Im26/Im3 per comparació amb les bases de dades	Identificació de les soques seqüenciades amb 27f/1492r en comparació amb les bases de dades
HM-B	<i>Bif. adolescentis</i> (100%)	16 (14)	5/16	5/5	<i>Bif. adolescentis</i> (99%) <i>Bif. longum</i> (2) ² (97% i 99%) <i>Bif. pseudocatenulatum</i> (98%) <i>Bif. pseudolongum</i> (99%)	
PL	<i>Bif. saeculare</i> (100%)	33(6) Beerens	15/33	3/15	<i>Bif. longum</i> (3) ² (97%)	<i>Lactobacillus</i> spp. (2) ² (96%)
		27 (8) HBSA	8/27	0/8	-	<i>Morganella morganii</i> (2) ¹ (94%)
PG-B	<i>Bif. simiae</i> (94%)	26 (1)	11/26	2/2	<i>Bif. thermacidophilum</i> (2) ² (99% i 97%)	
CW-E	<i>Bif. pseudolongum</i> spp. <i>globosum</i> (100%)	44 (15)	17/44	2/3	<i>Bif. thermophilum</i> / <i>Bif. thermacidophilum</i> (2) ² (99%)	
CW-F	<i>Bif. thermophilum</i> / <i>Bif. thermacidophilum</i> (100%)	44 (15)	20/44	2/4		

¹ Soques que fermenten el sorbitol en el medi HBSA.

² Núm de soques que han mostrat igual identificació al comparar amb la base de dades RDP i GenBank.

3.3.4.2 Disseny de sondes a partir de les seqüències de les bandes de DGGE

S'han dissenyat 4 sondes específiques, per a la detecció d'espècies de *Bifidobacterium*, ubicades dintre dels fragments de DGGE seleccionats com exclusius per cada origen fecal (Figura 3.16). La seqüència de les sondes es mostra a la taula 3.8, presenten una longitud d'entre 33 i 36 pb, el que dificulta que hi hagi unions inespecífiques. S'han utilitzat en una hibridació colonial a una temperatura establerta en totes elles de 60°C, tal i com s'ha indicat anteriorment a l'apartat 3.2.11. En aquest cas s'ha utilitzat per a hibridar tant soques que han estat aïllades prèviament, a partir d'una mostra com directament sobre la sembra de la mostra. S'ha amplificat el gen del 16S ARNr d'aquelles soques que presentaven una hibridació positiva utilitzant els iniciadors específics per bifidobacteris lim26 i Im3. Els amplicons s'han seqüenciat i comparat amb les seqüències dipositades a la base de dades del GenBank i RDP.

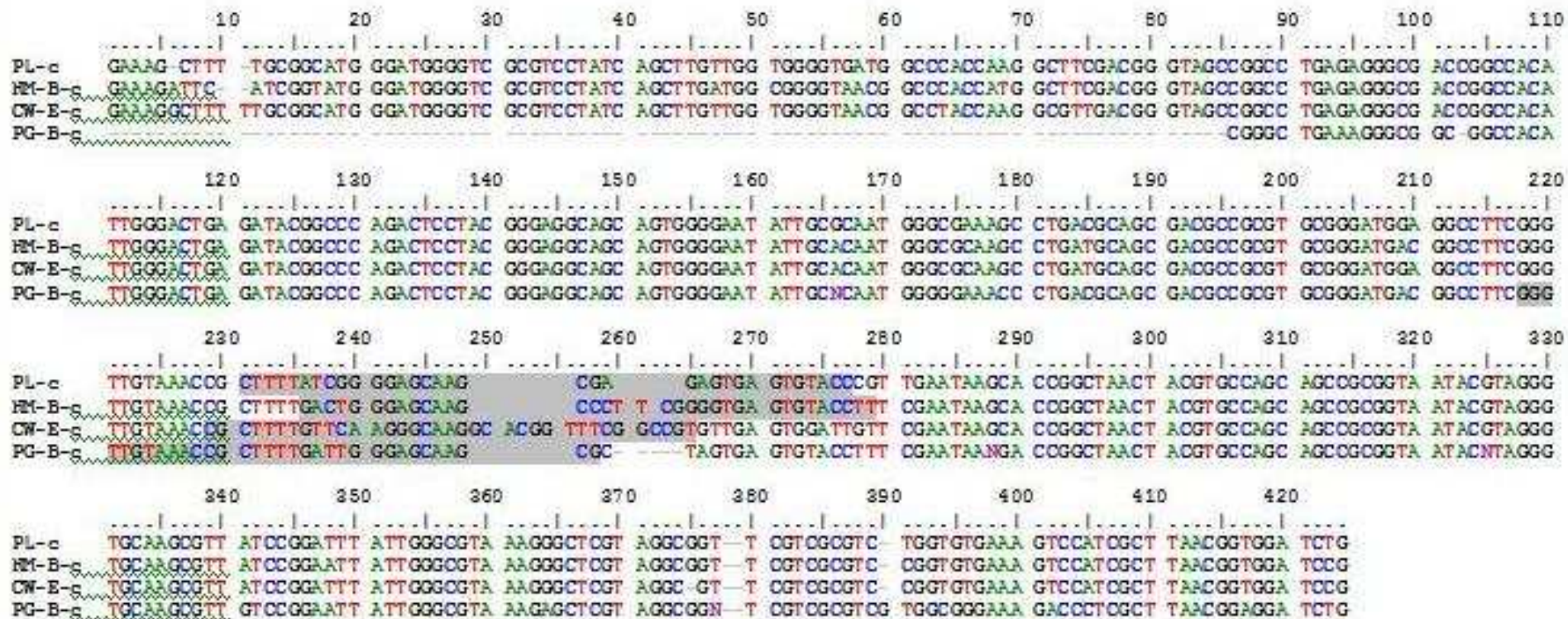
Taula 3.8 Sondes dissenyades a partir de les bandes de DGGE representatives de la comunitat de bifidobacteris d'aigua residual de diferents orïgens.

Sonda	Seqüència (5'-3')	Identificació per similitud*
HM-B	[DIG]GACTGGGAGCAAGCCCT TCGGGGTGAGTGACCTT	<i>Bif. adolescentis</i> , <i>Bif. longum</i> i <i>Bif. ruminantium</i>
PL	[DIG]CTTTTATCGGGGAGCAA GCGAGAGTGAGTGATACC	<i>Bif. gallinarum</i> , <i>Bif. pullorum</i> , <i>Bif. saeculare</i> i <i>Bif. subtile</i>
PG-B	[DIG]GGGTTGTAAACCGCTTT TGATTGGGAGCAAGCG	<i>Bif. simiae</i> , <i>Bif. minimum</i> , <i>Bif. indicum</i> , <i>Bif. asteroides</i> i <i>Bif. coryneforme</i>
CW-E	[DIG]CGCTTTTGTTC AAGGGC AAGGCACGGTTTCGGCCGT	<i>Bif. animalis</i> , <i>Bif. pseudolongum</i> i <i>Bif. bifidum</i>

*Espècies del RDP que presenten 100% de similitud amb les sondes dissenyades.

Per a la recuperació de soques humanes s'ha realitzat la hibridació directament sobre una mostra sembrada en medi Beerens. S'ha obtingut 5 colònies positives de les 132 presents a les membranes (Taula 3.9). Les 5 colònies han estat aïllades i s'ha extret l'ADN, totes han estat amplificades amb els iniciadors genèrics de *Bifidobacterium* spp. S'han identificat les 5 soques, una de les quals ha estat identificada com *Bif. adolescentis* amb un 98% de similitud amb les seqüències dipositades al GenBank. Les soques restants han estat identificades com *Bif. pseudocatenulatum* (tres d'elles) i *Bif. catenulatum* amb un 98% de similitud.

Figura 3.16 Aliniament de les bandes de DGGE: PL, HM-B, CW-E i PG-B. S'han marcat les sondes dissenyades per a la detecció mitjançant hibridació colonial de soques específiques de cada origen.



Taula 3.9 Identificació de soques aïllades a partir d'aigua residual de diferents orígens mitjançant hibridació amb les sondes dissenyades a partir de les bandes de DGGE.

Sonda	Similitud de la sonda amb espècies del GenBank	Núm. d'aïllaments (sorbitol positius) ¹	Proporció de soques que han hibridat amb la sonda	Proporció de soques amplificades amb Im26/Im3 de les que han hibridat	Identificació de soques seqüenciades amb Im26/Im3 per comparació amb les bases de dades	Identificació de les soques seqüenciades amb 27f/1492r en comparació amb les bases de dades
HM-B-c	<i>Bif. adolescentis</i> (100%)	132 (Beerens)	5/132	5/5	<i>Bif. adolescentis</i> (98%) <i>Bif. pseudocatenulatum</i> (3) ¹ (98%) <i>Bif. catenulatum</i> (98%)	-
PL-c	<i>Bif. saeculare</i> (100%)	33 soques 306 (HBSA) 142 (Beerens) 113 (CBA)	0	-	-	-
PG-B-c	<i>Bif. simiae</i> (94%)	79 soques 203 (HBSA) 37 (Beerens)	1/79 8/203 1/37	0/1 3/3 0/1	<i>Bif. thermophilum</i> / <i>Bif. thermacidophilum</i> (2) ² (98% i 96%) Bacteri no present a la base de dades. La soca més pròxima: <i>Bif. simiae</i> 93%	<i>Lactobacillus reuteri</i> 100%
CW-E-c	<i>Bif. pseudolongum</i> spp. <i>globosum</i> (100%)	49 soques 263 (Beerens)	20/44	2/4	<i>Bif. thermophilum</i> / <i>Bif. thermacidophilum</i> (2) ² (99%)	-

¹ Soques que fermenten el sorbitol en el medi HBSA.

² Núm de soques que han mostrat igual identificació al comparar amb la base de dades RDP i GenBank.

Per tal de recuperar soques de *Bifidobacterium* exclusives de mostres d'origen avícola, s'han analitzat: 33 soques aïllades prèviament a partir d'una mostra en medi Beerens, 306 colònies directament del cultiu d'una mostra en medi HBSA, 142 en medi Beerens i 113 en el medi ric CBA. Cap de les 595 soques, en total, analitzades, ha donat positiu per la sonda PL (Taula 3.9).

La recuperació de les soques exclusives d'origen porcí que hibriden amb la sonda PG-B s'ha realitzat a partir de: 79 soques prèviament aïllades a partir de diferents mostres d'origen porcí; 203 colònies crescudes en el medi HBSA i 37 colònies en medi Beerens (Taula 3.9). S'ha obtingut una soca i 9 colònies positives per la hibridació. La soca, aïllada a partir d'una mostra en medi Beerens no va amplificar-se amb els iniciadors Im26/Im3, però amb els iniciadors universals s'ha identificat com *Lactobacillus reuteri* amb un 100% de similitud. S'han amplificat tres de les colònies positives per la hibridació colonial procedents del creixement en medi HBSA. Dues d'elles han estat identificades com *Bif. thermophilum* i *Bif. thermacidophilum* amb un 98 i 96% de similitud i la tercera no ha mostrat una elevada similitud amb cap soca de les bases de dades observades. L'espècie més propera ha estat *Bif. simiae* amb un 93% de similitud, talment s'havia observat amb la banda PG-B.

S'ha seguit el mateix procediment per tal de recuperar les soques marcadores de contaminació d'origen boví a l'aigua. S'ha analitzat un total de 49 soques i 263 colònies (Taula 3.9). S'ha obtingut dues soques presumptivament positives per a la hibridació i han pogut ser recuperades i amplificades mitjançant els iniciadors Im26/Im3. Ambdues soques han estat identificades com *Bif. thermophilum* i *Bif. thermacidophilum* amb un 99% de similitud.

3.4 Discussió

3.4.1 *Anàlisi de les soques tipus amb gels de gradient desnaturalitzant*

L'anàlisi de les soques tipus amb gels de gradient desnaturalitzant en les condicions practicades ha permès la separació del fragment del 16S ARNr del gènere *Bifidobacterium* amplificat mitjançant iniciadors específics d'aquest gènere. Les diferents espècies han mostrat una diferent capacitat de migració el que es reflecteix amb una diferent posició en el gel. Per tant aquesta tècnica pot ser utilitzada per a l'anàlisi de comunitats formades per espècies del gènere *Bifidobacterium*.

Algunes soques assoleixen la mateixa posició en el gel, tot hi que presenten diferent seqüència nucleotídica. Això fa suposar que tot i tenir diferent seqüència poden presentar els mateixos dominis de desnaturalització i que per tant poden assolir la mateixa posició. Cal també considerar que tot i utilitzar un rang de gradient força estret (45 i 55%) no sigui suficient per tal de separar totes les espècies analitzades.

Dues de les espècies analitzades: *Bif. adolescentis* i *Bif. merycicum*, presenten dues bandes de DGGE, aquest fet suggereix que existeix dues possibles còpies diferents del gen del 16 ARNr. En un estudi anterior, es va observar que a l'analitzar la soca tipus de *Bif. adolescentis*, mitjançant l'anàlisi per DGGE en les mateixes condicions, s'obtenien 3 bandes diferents (la banda A, superior, la banda B i la banda C, inferior) (Satokari, R.M. et al, 2001a) . Aquestes bandes van ser identificades mitjançant el seu clonatge i seqüenciació, el que va mostrar l'existència de dues còpies diferents del gen que diferien en 8 nucleòtids (99,4%). La tercera de les bandes, que es posicionava a la part superior, mostrava una barreja de les dues seqüències. Per tant es tractava de molècules heterodúplexs formades de la barreja d'ambdós còpies del gen.

3.4.2 *Anàlisi de mostres d'aigua residual de diferents orígens amb gels de gradient desnaturalitzant*

L'anàlisi de les espècies de *Bifidobacterium* de mostres d'aigua residual de diferent origen utilitzant la tècnica de la DGGE ha mostrat que existeix una especiació

d'aquest gènere en funció dels seus hostes. Per tant, aquesta tècnica pot facilitar la diferenciació de les comunitats d'aigües contaminades per diferents fonts fecals.

Els perfils analitzats, tant de soques tipus com mostres ambientals, presenten una banda comuna a la part superior del gel. La seqüenciació d'aquesta banda en mostres humanes i bovines ha mostrat que està composta per una barreja de seqüències. En canvi, quan s'identifica en mostres d'aigua residual d'aus, presenta la mateixa seqüència que la única mostra que constitueix el perfil. El que suggereix que algunes molècules poden agafar conformacions anòmales o que es formen molècules heterodúplexes que degut a la seva naturalesa inestable romanen a la part superior del gel. Aquests resultats també indiquen que la diversitat de bifidobactèries en aus, és molt menor que en els humans i en els altres animals considerats.

Les mostres d'aigua residual d'origen urbà, és a dir, de contaminació fecal majoritàriament humana, mostren un perfil de bandes de DGGE bastant estable format majoritàriament per 9 bandes. Algunes d'aquestes, poden no ser-hi, mentre que en poden sorgir d'altres depenent de la concentració d'ADN o de la diversitat de *Bifidobacterium* spp. de la mostra.

Les mostres d'aigua residual obtingudes d'escorxadors d'aus presenten una sola espècie comuna a les totes les mostres analitzades.

Els perfils de DGGE obtinguts per mostres d'origen porcí (aigua residual d'escorxador i purí) mostren una més elevada diversitat d'espècies de *Bifidobacterium* i a la vegada una major heterogeneïtat entre mostres. La diversitat és major quan s'analitza mostres de purí que no pas en l'aigua residual d'escorxadors de porcí. Aquesta heterogeneïtat cal considerar que pot ser deguda a que l'aigua residual provinent d'escorxadors representa una població major i de diverses procedències amb diferents condicions d'engreix respecte les mostres obtingudes de purins. Aquest fet evita la diversitat associada a variacions entre individus tal i com s'ha descrit en estudis que comparen la diversitat de la microbiota intestinal en poblacions respecte la derivada per l'estudi de diferents individus (Ventura, M. et al, 2004; Zoetendal, E.G. et al, 1998).

Algunes mostres d'origen boví presenten perfils formats per poques bandes, mentre que d'altres mostren una més elevada diversitat. En aquest cas les diferències no atenen al lloc de recollida de la mostra, ja que tant mostres d'aigua residual d'escorxadors com de femtes mostren una elevada variabilitat. Per tant, cal considerar si el nombre d'individus que generen aquestes aigües residuals, és suficient per evitar la diversitat entre individus.

S'ha pogut definir perfils clars, associats a contaminació fecal humana i d'aus. S'ha observat perfils diferents en mostres d'origen porcí i boví, i tot i que existeixen bandes diferencials no s'ha pogut definir uns perfils específics. Això es deu a l'elevada diversitat d'espècies i a la diferent distribució d'algunes d'elles entre mostres.

3.4.3 Identificació de les espècies majoritàries que conformen els perfils

3.4.3.1 Identificació d'espècies d'origen humà

En els perfils obtinguts a partir de mostres d'origen humà, s'han descrit 5 bandes característiques (que com s'ha comentat a l'apartat 3.3.3.1 en alguns casos poden formar una doble banda) que es mantenen en pràcticament a totes les mostres analitzades. Les bandes HM-A i B corresponen a dues còpies diferents del gen del 16S ARNr de *Bif. adolescentis*, HM-D presenta una elevada similitud amb *Bif. longum*, i les altres dues bandes identificades: HM-C i E presenten un 98% de similitud amb *Bif. adolescentis*. *Bif. adolescentis* i *Bif. longum* han estat descrites com les espècies de *Bifidobacterium* spp., juntament amb el grup format per *Bif. catenulatum*, majoritàries en la microbiota intestinal d'adults (Matsuki, T. et al, 1999). Existeixen variacions segons els estudis fets per diferents autors. Així, per exemple, un estudi avaluant femtes d'individus mitjançant iniciadors específics d'espècie, van determinar que el grup de *Bif. catenulatum*, es trobava en un 92% de les mostres analitzades, el seguien *Bif. longum* i *Bif. adolescentis* amb una distribució del 65% i del 60% respectivament. Un altre anàlisi analitzant les femtes mitjançant la tècnica de DGGE va assenyalar que *Bif. adolescentis* o espècies pròximes, eren les més àmpliament distribuïdes entre els individus testats (Satokari, R.M. et al, 2001a). I en un altre estudi es va postular a *Bif. longum* com a espècie majoritària amb una incidència del 91% de les mostres, seguit de *Bif. adolescentis* i *Bif. bifidum* amb un 46% i *Bif. catenulatum*, *Bif. dentium* i *Bif. gallicum* amb un 18% (Mangin 2006). En aquest cas es va utilitzar la tècnica de TGGE.

La distribució de les espècies microbianes entre femtes de diferents individus és molt variable, cada organisme alberga una microbiota intestinal pròpia i independent de la resta que pot dependre de determinats factors, com són l'edat, la dieta o l'àrea geogràfica. Una mostra d'aigües residuals procedents d'un nombre molt baix d'individus o una mostra constituïda per una barreja d'unes poques mostres fecals es veu influenciada per la variabilitat poblacional entre individus, que dificulta la determinació de bandes (espècies) predominants i específiques d'una espècie d'hoste,

tal com s'ha vist en altres estudis realitzats utilitzant mostres de femtes d'individus (Ventura, M. et al, 2004). Tot i així, existeixen certes espècies dominants que poden ser compartides entre individus (Zoetendal, E.G. et al, 1998). Aquestes bandes predominants i específiques són les que permeten associar la contaminació fecal a un hoste i que siguin diferencials dels altres hostes. En aquest cas s'ha analitzat aigua residual d'origen humà, i que per tant, compren la microbiota aportada per un grup important d'individus. Les espècies presents poden ser diferents a les descrites en l'aparell digestiu o en femtes ja que dependran de les espècies dominants en el total de la població i de la seva capacitat de persistència.

En aquest estudi *Bif. adolescentis* ha estat detectat en el 100% de mostres d'aigua residual analitzades. Els resultats obtinguts confirmen les observacions fetes pel nostre grup de recerca en estudis anteriors on, s'havia obtingut la mateixa incidència d'aquesta espècie en mostres d'origen humà i no s'havia detectat en mostres animals. Això va portar a proposar aquesta espècie com a indicadora de l'origen de la contaminació humana a l'aigua (King, E.L. et al, 2007; Bonjoch, X. et al, 2004; Lynch, P.A. et al 2002). També havia estat estudiada la incidència de *Bif. longum* que s'havia detectat a un 58% de les mostres humanes analitzades i en cap mostra d'origen animal (Bonjoch, X., 2004b). Mitjançant la DGGE, s'ha detectat aquesta espècie a un 86% de les mostres analitzades. La desviació obtinguda pot ser un reflex dels problemes de la utilització de tècniques moleculars, que depenen dels iniciadors utilitzats i/o la tècnica de detecció es pot produir una sobreestimació o subestimació de la diversitat.

3.4.3.2 Identificació d'espècies d'origen avícola

L'existència i la distribució del gènere *Bifidobacterium* en femtes d'aus no han estat, ni de bon tros, tant estudiades com en el cas dels humans, i els resultats són força heterogenis. Una primera avaluació utilitzant el medi de cultiu YN-6 no va detectar bifidobacteris en pollastre (Resnick, I.G. et al, 1981). En canvi un anàlisi posterior utilitzant el medi TPY modificat (amb àcid acètic i mupirocina) va observar la presència de 10^7 UFC per gram de contingut extret de l'aparell digestiu de gallines. També existeixen estudis emprant diferents tècniques moleculars amb el mateix resultat. L'anàlisi de la microbiota intestinal de pollastre a partir d'una llibreria de clons, no va destacar la presència d'aquest gènere (Lan, P.T. et al, 2002). Un altre estudi realitzant l'anàlisi amb TGGE en va observar una baixa presència, representada per un 1,3% del total (Zhu, X.Y. et al, 2002). En canvi, en una altre cas utilitzant la tècnica de DGGE va destacar la presència de *Bif. pullorum* al llarg de l'aparell digestiu (Gong, J.

et al, 2008). Un estudi recent ha avaluat mostres fecals creant una llibreria de clons amb iniciadors genèrics de *Bifidobacterium* spp. La majoria de clons aïllats a partir de mostres de pollastre, formen un grup d'espècies relacionades amb bifidobacteris no cultivables. Paral·lelament s'han analitzat les mostres amb iniciadors específics d'espècies de *Bifidobacterium* spp.; d'aquesta manera s'ha detectat la presència de certes espècies pròpies d'humans com *Bif. adolescentis*, *Bif. gallicum*, *Bif. breve* i *Bif. bifidum* (Lamendella, R. et al, 2008).

En aquest estudi, mitjançant l'amplificació amb dues PCRs consecutives s'ha obtingut una sola banda de DGGE, el que mostra una baixa diversitat representada per una sola espècie. El fragment del gen del 16S ARNr avaluat ha mostrat una similitud del 100% amb *Bif. saeculare* que és una espècie que ha estat detectada en femtes de conill (Ventura, M. et al, 2004), però no en pollastres. Aquesta seqüència presenta, també, un 99% de similitud amb *Bif. pullorum* i *Bif. gallinarum*, ambdues descrites en pollastres (Trovatelli, L.D. et al, 1974). Un percentatge tan elevat de similitud no permet excloure la identificació de la banda amb aquestes espècies. Cal tenir en compte que l'anàlisi de bandes de DGGE limiten la identificació de les espècies a que corresponen, ja que estan basades en un fragment de 500 pb. Probablement disposar de tota la seqüència del 16S ARNr d'on provenen aquests fragments permetria resoldre les incerteses en la seva identificació. Cal tenir en compte que els iniciadors utilitzats no han pogut amplificar *Bif. gallinarum* que és una espècie que ha estat definida en aus i que per tant no pot ésser valorada en l'estudi.

3.4.3.3 Identificació d'espècies d'origen porcí

Les mostres analitzades d'origen porcí han mostrat una elevada diversitat d'espècies de *Bifidobacterium* que varien entre les diferents mostres. S'ha identificat 8 bandes diferents a partir de l'anàlisi amb els gels de DGGE, quatre d'elles han mostrat una similitud més gran del 98% amb soques cultivades dipositades a les bases de dades. L'espècie *Bif. minimum* que ha estat descrita a partir d'aigua residual, *Bif. longum* en intestí humà, *Bif. pseudocatenulatum* en femtes d'infants i *Bif. thermophilum* o *Bif. thermaciophilum* ssp. *porcinum* ambdues aïllades a partir de femtes de porcs (Ventura, M. et al, 2004). Una de les bandes, mostrava una barreja de seqüències però s'hi ha identificat *Bif. pseudolongum* ssp. *pseudolongum* descrita, també, a partir de femtes de porc. Les altres tres bandes no presenten una similitud més gran del 95% amb cap espècie cultivable dipositada a les bases dades. L'espècie més pròxima a una d'elles és *Bif. simiae*, i a les altres dues amb *Bif. crudilacis*, *Bif. psycraerophilum* i *Bif. minimum*.

En aquest estudi s'ha observat que la banda majoritària (PG-H) detectada en les mostres de porcs analitzades correspon a *Bif. thermophilum* o *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum* que s'ha detectat en un 92% de les mostres. La banda PG-A que s'identifica amb *Bif. minimum* a un 38% i la banda PG-B que no ha estat identificada amb cap espècie cultivable al 75% de les mostres. La poca distància entre les cinc bandes restants, la manca d'un marcador vàlid per al gels de DGGE i les petites diferències entre gels degudes a la formació del gradient, fa difícil que puguin ser discernides al comparar diferents gels. Tot i així, a la figura 3.14 es mostra un gel on la banda PG-G apareix en la majoria de les mostres analitzades (9/12).

Un anàlisi de la diversitat de bifidobacteris del cec de porcs va obtenir resultats similars al obtinguts en aquest estudi. Es va descriure una població dominada per 15 soques diferents classificables en quatre grups representats per *Bif. minimum*, *Bif. pseudolongum* ssp. *pseudolongum* i ssp. *globosum* i 2 grups formats per dues espècies noves: *Bif. psychraerophilum* i *Bif. aerophilum* (Simpson, P.J. et al, 2003). Aquesta última posteriorment fou reclassificada en l'espècie nova a *Aeriscardovia aeriphila* (Simpson, P.J. et al, 2004). L'anàlisi de la presència de *Bifidobacterium* en femtes de porcs va mostrar que l'espècie majoritària en mostres recollides a França eren *Bif. pseudolongum*, també es va detectar *Bif. thermophilum* i *Bif. adolescentis*. En canvi en un altre estudi efectuat a Àustria l'espècie majoritària va resultar ser *Bif. thermophilum*, seguida de *Bif. pseudolongum* i *Bif. animalis* (Gavini, F. et al, 2006). *Bif. thermophilum* també fou l'espècie majoritària a l'analitzar clons aïllats a partir de mostres de femtes de porcs, seguida de *Bif. boum* (Lamendella, R. et al, 2008). Un estudi analitzant l'efecte de prebiòtics en porcs va observar que una determinada dieta rica amb fructans, incrementa la concentració de *Bif. thermacidophilum* i *Megasphaera elsdenii* (Molbak, L. et al, 2007). Conjuntament, aquests dos microorganismes ajuden a la prevenció de disenteria porcina.

Els resultats obtinguts en aquest estudi confirmen la diversitat dels bifidobacteris en porcí, així com l'elevada heterogeneïtat de les mostres. Aquesta elevada diversitat bacteriana podria estar associada a la producció animal intensiva i a la diversitat de pinsos i dietes. Ja que una determinada dieta condiona la microbiota intestinal, s'ha descrit que la ingesta d'una major quantitat d'oligosacàrids incrementa la quantitat de bifidobacteris a l'intestí (Molbak, L. et al, 2007; Tzortzis, G. et al, 2005).

3.4.3.4 Identificació d'espècies d'origen boví

El gènere *Bifidobacterium* no és un gènere destacat dins la microbiota intestinal de remugants (Kocherginskaya, S.A. et al, 2001; Whitford, M.F. et al, 1998), però ja fa

temps que s'han descrit algunes espècies característiques com *Bif. ruminale* (espècie sinònima a *Bif. thermophilum*) i *Bif. globosum* (l'actual *Bif. pseudolongum* ssp. *globosum*) (Trovatelli, L.D. et al, 1974).

En aquest estudi, les mostres d'origen boví, també mostren una elevada diversitat i heterogeneïtat entre mostres. Algunes presenten una elevada diversitat mentre que d'altres estan representades per una sola espècie. La identificació de les bandes ha mostrat la presència de *Bif. ruminantium*, *Bif. merycicum*, *Bif. pseudolongum* ssp. *globosum*, descrites en rumen boví, *Bif. thermophilum* o *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum* descrites en femtes de porcs i *Bif. adolescentis* descrita en intestí humà (Ventura, M. et al, 2004). L'espècie amb una major incidència ha estat *Bif. pseudolongum* que s'ha descrit en el 77% de les mostres analitzades, seguida de *Bif. thermophilum/Bif. thermacidophilum* (69%), *Bif. ruminantium* (62%) i *Bif. merycicum* i *Bif. adolescentis* (39%).

Bif. adolescentis és una espècie que ha estat proposada com a indicadora de l'origen de la contaminació fecal humana. En aquests cas ha estat detectada en 5 de les 13 mostres d'origen boví analitzades. Altres estudis recents també mostren la presència d'aquesta espècie en mostres d'origen animal (Gavini, F. et al, 2006; Lamendella, R. et al, 2008). Així, *Bif. adolescentis* ha estat detectada en un 30% d'un total de 43 mostres de femtes de porc analitzades i en un 28% de 14 mostres de bestiar boví. Aquest estudi també va mostrar la presència d'altres espècies d'origen humà així com *Bif. catenulatum* i *Bif. dentium* entre d'altres (Lamendella, R. et al, 2008). Per tant, *Bif. adolescentis* podria estar present a l'intestí de bovins en una baixa proporció, però suficient per a ser detectat amb el mètode utilitzat.

No existeixen gaires estudis analitzant la presència de *Bifidobacterium* en el rumen. Tot i així els resultats són similars als obtinguts en aquest estudi. L'anàlisi de clons del *Bifidobacterium* aïllats a partir de femtes de bovins han mostrat la presència principalment de *Bif. pseudolongum* i també de *Bif. ruminantium* (Lamendella, R. et al, 2008). En un altre estudi avaluant soques aïllades de femtes de bestiar boví, també van descriure *Bif. pseudolongum* com a espècie majoritària, seguida de *Bif. thermophilum* i *Bif. ruminantium* i algunes espècies que no van poder ser identificades.

3.4.4 Recuperació de mostres ambientals

La recuperació de soques específiques de cada origen a partir de mostres ambientals mitjançant sondes d'ADN ha posat en rellevància les diferències existents entre la detecció utilitzant tècniques moleculars i tècniques de cultiu. Ja que, la tècnica d'hibridació colonial utilitzada precisa d'un cultiu previ de les mostres o de les soques. D'aquesta manera es pretenia observar si el coneixement de la composició i distribució de les espècies de *Bifidobacterium* a nivell molecular de les mostres, permetia generar eines per a poder recuperar les soques característiques de cada origen del medi.

En una primera aproximació s'ha utilitzat sondes de 500 pb del gen del 16S ARNr i que per tant, alberguen zones específiques entre espècies i zones comunes. Aquestes sondes no han estat suficientment específiques i per tant se n'han desenvolupat de noves més petites, a partir d'una zona específica per les diferents espècies.

Tant les sondes creades amb la banda completa de DGGE com les sondes curtes internes del fragment, han detectat espècies del gènere *Lactobacillus*, l'espècie *Morganella morganii* i altres espècies que no han estat amplificades mitjançant els iniciadors Im26/Im3. Per tant, indica un possible creixement d'altres espècies en els medis HBSA i Beerens. Ambdós medis són selectius pel gènere *Bifidobacterium* però ja s'havia postulat el creixement d'altres espècies com *Lactobacillus casei*, *Clostridium clostridioforme* i *Eubacteria multiforme* en el medi Beerens (Silvi, S. et al, 1996) i estreptococs fecals en el medi HBSA (Mara, D.D. et al, 1983).

Tant la sonda llarga com la curta, han detectat la presència de l'espècie *Bif. adolescentis* en l'aigua residual d'origen urbà. Això demostra que aquests medis permeten la recuperació d'aquesta espècie. No obstant, la sonda curta (HM-B-c), tampoc ha resultat ser específica ja que ha hibridat també, amb *Bif. pseudocatenulatum* i *Bif. catenulatum*. Aquestes tres espècies havien estat postulades juntament amb *Bif. longum* com les majoritàries en l'aparell digestiu humà. Per tant, es descarta la utilització d'aquesta sonda per a la detecció d'aquesta espècie al medi. La PCR múltiple descrita prèviament en el grup de recerca revela millors resultats (Bonjoch, X., 2004b).

S'ha analitzat un total de 594 soques aïllades a partir d'aigua residual de pollastre utilitzant la sonda dissenyada a partir de la banda de DGGE. No s'ha obtingut cap colònia positiva per a la hibridació colonial. Això es pot associar a que la soca que representa no sigui cultivable amb les condicions utilitzades en aquest estudi o que la seva presència en la mostra fos molt baixa. En aquest últim cas, podria ser detectada

mitjançant dues amplificacions consecutives que incrementarien significativament la seva concentració, però no amb tècniques de cultiu, ja que quedaria emmascarada per l'alta microbiota acompanyant. L'anàlisi mitjançant la hibridació colonial amb la sonda de 500 pb ha posat en rellevància la presència de *Bif. longum*, espècie "d'origen humà" i altres no bifidobacteris com *Morganella morganii* i *Lactobacillus* spp en les mostres d'aigües residuals provinents d'escorxadors d'aus.

La baixa especificitat de les sondes definides també s'ha fet pal·lesa en l'anàlisi de soques d'origen porcí aïllades en els medis selectius. La sonda curta dissenyada a partir de la banda PG-B presenta similitud amb una espècie que la tècnica de la DGGE ha mostrat majoritària en les mostres analitzades d'origen porcí. Aquesta soca, però, no ha mostrat similitud amb cap espècie dipositada a les bases de dades. Tot i així, ha estat recuperada del medi una soca que tampoc s'identifica amb cap de les soques dipositades a aquestes bases de dades i presenta un 93% de similitud amb *Bif. simiae*, talment la sonda PG-B-c. A la vegada, s'ha unit inespecíficament a una espècie que presenta una similitud del 96-98% amb *Bif. thermophilum*/*Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum*. Aquesta, és l'espècie majoritària a les mostres de porc analitzades i per tant deu ser present a una elevada concentració a les mostres. La sonda també ha hibridat amb *Lactobacillus reuteri*, espècie abundant en la microbiota intestinal de porcs (Simpson 2000). Per tant, en cas d'utilitzar-se, precisa d'una millora de les condicions d'hibridació i d'un anàlisi més extens de la seva especificitat.

La sonda CW-E-c ha estat dissenyada per tal de detectar *Bif. pseudolongum*, que és la banda que ha mostrat una major distribució entre les mostres de bestiar boví. La hibridació amb aquesta sonda tant sols ha recuperat soques que han mostrat similitud amb les espècies *Bif. thermophilum* i *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum*. Aquestes espècies que s'han relacionat amb porcí, han de considerar-se també, presents i de forma abundant en mostres d'origen boví, tal com s'ha observat en els gels de DGGE i en estudis previs per d'altres autors (Gavini, F. et al, 2006; Lamendella, R. et al, 2008).

Les diferents comunitats de bifidobacteris representades en aigües residuals de diferents orígens (humà, avícola, porcí i boví) poden ser discernides mitjançant la tècnica de DGGE. Aquesta tècnica presenta certes limitacions, una d'elles està associada a la diferent intensitat de les bandes en funció de la quantitat d'ADN. Aquest factor pot ser pal·liat mitjançant una quantificació prèvia de l'ADN de la mostra. La manca d'un marcador estandaritzat, també ha resultat una limitació alhora de comparar perfils de diferents gels. Recentment la casa comercial japonesa Nippon

Gene ha dissenyat uns nous marcadors que poden ser utilitzats en gels de DGGE (<http://www.nippongene.com/pages/products/electrophoresis/marker/dnamarker/dnamarker02.html>) i que podrien facilitar o millorar els anàlisis comparatius dels perfils.

Les sondes dissenyades a partir de les bandes de DGGE han presentat una especificitat moderada alhora de detectar soques d'espècies associades a cada origen fecal. A més a més, s'han fet pal·lesos els problemes associats al cultiu de les mostres com: la inespecificitat dels medis de cultiu, la possibilitat de no trobar espècies no cultivables o que tinguin una baixa representació en la mostra.

No obstant, una possible aplicació de les sondes, seria la seva utilització com sondes específiques per a realitzar un *Southern Blot* sobre els gels de DGGE. Això permetria la identificació de les bandes sense necessitat de la seva escissió i identificació. Cal considerar en futurs estudis la utilitat d'aquesta metodologia ja que permetria identificar orígens de contaminació fecal diferents en una mateixa mostra.

Capítol 4

Desenvolupament d'una PCR
quantitativa en temps real per a
l'enumeració del gènere
Bacteroides

4.1 Introducció

Una de les característiques que ha de reunir un bon indicador de la contaminació fecal és la de tenir un comportament semblant al dels patògens. És a dir, ser incapaç de reproduir-se al medi ambient, estar en una proporció similar i presentar igual o major resistència a tractaments de depuració i processos d'inactivació. La cinètica de persistència que segueix un microorganisme un cop és abocat al medi ambient, és un factor clau que s'ha de conèixer quan vol ser utilitzat com a indicador en models que considerin els efectes de dilució i persistència en el temps.

Actualment, s'està definint un elevat número de microorganismes que poden actuar com a indicadors amb una bona capacitat de discriminació entre diferents orígens de la contaminació fecal. Per altra banda, es coneix poc quina és la seva persistència o inactivació en el medi, així com a quins factors ambientals són més vulnerables. Per tant, s'ha d'anar més enllà i conèixer l'estabilitat dels marcadors proposats abans de poder ser aplicats a nivell rutinari.

Quan els microorganismes de l'aparell digestiu passen del seu ambient natural al medi aquàtic estan sotmesos a un entorn agressiu. La presència d'oxigen (per als bacteris anaerobis estrictes), la radiació solar, la manca de nutrients, les oscil·lacions de temperatura, el pH, la presència de depredadors i determinades substàncies poden danyar les cèl·lules afectant la seva viabilitat (Okabe, S. et al, 2007; Gourmelon, M. et al. 1994; Menon, P. et al, 2003; Jamieson, R. et al 2004).

Les tècniques de cultiu permeten un seguiment de la dinàmica de microorganismes que poden ésser cultivats. L'anàlisi d'una mateixa mostra amb tècniques de cultiu i mitjançant l'observació amb el microscopi ha posat en rellevància l'abundància d'altres estadis cel·lulars que no poden ser cultivats en les condicions habituals (Singh, A. et al, 1989).

En una mostra, atenent a les condicions en que es trobi, es poden trobar tres formes cel·lulars diferenciades: les cèl·lules viables cultivables, les cèl·lules viables no cultivables i les cèl·lules inviables (Kell, D.B. et al, 1998). S'han definit com a *cèl·lules viables cultivables* aquelles que poden ser cultivades en un determinat moment, utilitzant mètodes convencionals, amb un sol pas, com per exemple inoculació sobre una placa d'agar d'un medi adequat. Les *cèl·lules viables no cultivables* (VBNC: viable but non-culturable) s'han definit com aquelles que no poden ser recuperades amb les tècniques habituals ni créixer en medis usuals de cultiu, però que retenen l'activitat

metabòlica que pot ser detectada amb diferents metodologies (Kell, D.B. et al, 1998). Aquesta condició pot ser deguda a que les cèl·lules estiguin danyades de manera que es podran recuperar, o romandre en l'estat de "latència" que els permet la supervivència i resistència al medi ambient en condicions adverses. Els bacteris VBNC presenten una reducció de la mida i poden tenir activitat metabòlica, mantenir els factors de virulència i multiplicar-se en les condicions propícies; però no és possible cultivar-les amb les tècniques rutinàries del laboratori (Chaiyanan, S. et al, 2007; McFeters, G.A. et al, 1982; Ray, B., 1989). Les cèl·lules *inviabiles* són aquelles cèl·lules irreversiblement malmeses i que no poden ser cultivades, i no presenten cap risc potencial per a la salut.

S'ha vist que alguns patògens com *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella bovis* i *morbificans* i *S. enteritidis* en determinades condicions favorables (com a l'entrar a l'aparell digestiu, aplicant-los-hi unes determinades condicions de temperatura o de nutrients) poden recuperar la seva capacitat de multiplicació (Ben Abdallah, F. et al, 2007; Colwell, R.R., 1996; Kell, D.B. et al, 1998; Wai, S.N. et al, 1996). Per tant, aquestes cèl·lules presenten un potencial risc sanitari per a la població. Quan es vol estudiar la dinàmica i la persistència dels microorganismes quan arriben al medi ambient s'ha de tenir en compte aquests diferents estadis cel·lulars.

Les tècniques rutinàries de cultiu estimen la població de cèl·lules viables cultivables però no detecten la resta. En canvi les cèl·lules VBNC no poden ser cultivades amb els mètodes habituals al laboratori. Per tant, s'han desenvolupat algunes tècniques que permeten detectar aquestes formes cel·lulars (Rowan, N.J., 2004):

→ L'avaluació de les cèl·lules que presenten capacitat respiratòria utilitzant molècules redox fluorescents com el CTC (5-ciano-2,3-ditolil clorur de tetrazolium). El CTC és un acceptor d'electrons artificial que competeix amb l'oxigen. La reducció d'aquests compost per la cadena respiratòria genera cristalls de CTC-formazan, insolubles i fluorescents. Aquesta molècula s'acumula, solament, en bacteris metabòlicament actius i pot ser visualitzada mitjançant un microscopi d'epifluorescència (Besnard, V. et al, 2000).

→ El mètode de comptatge directe de viables (DVC: direct viable count). Aquesta tècnica es basa en la incubació del microorganisme amb agents inhibidors de la síntesi de l'ADN com l'àcid nalidíxic o el ciprofloxacina. L'activitat metabòlica no s'atura, de manera que la cèl·lula creixerà sense dividir-se. D'aquesta manera les

cèl·lules viables s'aniran elongant i es podran diferenciar de la resta al microscopi (Besnard, V. et al, 2000).

→ El radiomarcatge consisteix en valorar la metabolització, per les cèl·lules metabòlicament actives, de substrats marcats radioactivament amb ^{14}C o ^3H . Aquest mètode s'ha utilitzat per detectar la respiració cel·lular mitjançant la producció de $^{14}\text{CO}_2$ després d'afegir al medi glucosa marcada amb ^{14}C (Besnard, V. et al, 2000).

→ Tinció diferencial de diferents estadis cel·lulars. El iodur de propidi permet valorar la integritat de la membrana cel·lular, és un colorant impermeable i que per tant només penetrarà a les cèl·lules que tenen la membrana danyada, diferenciant així, les cèl·lules inviables. Els colorants fluorescents DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) o taronja d'acridina tenyeixen els àcids nucleics de les cèl·lules sense diferenciar el seu estat i en combinació amb altres colorants fluorescents permeten el recompte diferencial de cèl·lules vives i cèl·lules mortes amb el microscopi d'epifluorescència (Kell, D.B. et al, 1998). El kit de detecció LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, USA) combina el colorant SYTO-9 que tenyeix l'ADN i és permeable a la membrana, per tant tenyeix tot tipus de cèl·lules, amb el iodur de propidi que és impermeable, i que per tant només penetra a les cèl·lules danyades. Utilitzant el microscopi de fluorescència es visualitzen les cèl·lules viables de color verd i les cèl·lules danyades de color roig.

→ El comptatge utilitzant la tècnica de citometria de flux (Hoefel, D. et al, 2003). El citòmetre és un aparell que distingeix les cèl·lules tenyides amb colorants fluorescents que estan en una solució. El sistema de flux s'encarrega de conduir les cèl·lules al punt on es realitza la mesura i un cop allí detectarà i contarà les cèl·lules que emeten fluorescència. Segons el fluoròfor utilitzat (iodur de propidi, DAPI, etc) es podrà distingir entre cèl·lules viables i no viables.

→ La detecció d'ARNm i ARNr mitjançant les tècniques d'hibridació *in situ* o PCR amb la transcriptasa reversa. Només les cèl·lules metabòlicament actives sintetitzen ARN tot i que no puguin multiplicar-se (Rowan, N.J., 2004). Per tant la quantificació de l'ARN sintetitzat serà una estima de l'activitat metabòlica de la mostra.

Aquestes tècniques permeten la detecció de les cèl·lules VBNC però són complicades o laborioses d'aplicar a nivell rutinari al laboratori. A més, donen informació general sense poder discriminar fins al nivell d'espècie. Existeix una altra metodologia per tal de detectar i quantificar les cèl·lules cultivables i no cultivables

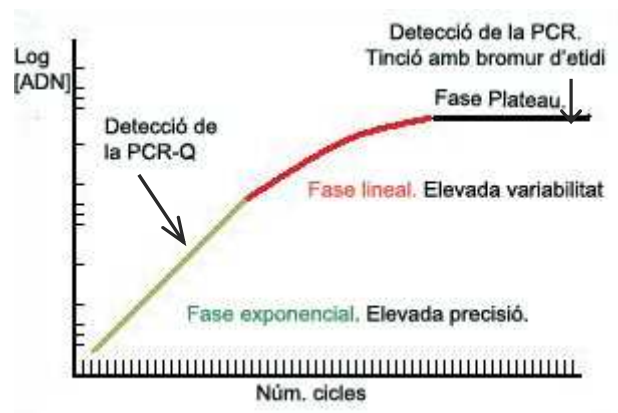
(viables i inviables) de manera específica. La PCR quantitativa a temps real permet la detecció de microorganismes independentment de cultiu entre una barreja complexa de poblacions. La utilització d'iniciadors específics permet detectar uns determinats microorganismes que a diferència de la PCR convencional poden ser quantificats.

4.1.1 PCR quantitativa en temps real

La PCR quantitativa a temps real (PCR-Q) és una evolució de la PCR convencional. La diferència fonamental entre ambdós PCRs és que permet la detecció i la quantificació específica d'un determinat fragment d'ADN a mesura que es produeix el procés d'amplificació. Per tant, no caldrà manipulacions posteriors a la reacció que poden contaminar la mostra; ni es precisarà del temps necessari per obtenir un gel i visualitzar el resultat de l'amplificació. Els resultats que s'obtenen són valors numèrics que es poden relacionar amb la quantitat d'ADN inicial de la mostra.

A mesura que incrementen els cicles d'una PCR es consumeixen els reactius i s'acumulen molècules inhibidores de la reacció (Ginzinger, D.G., 2002; Stratagene, 2004). La reacció arriba a un punt de saturació on no es produeix un increment de l'ADN amplificat. Aquests processos no són uniformes entre les mostres, i per tant se'n deriva diferències entre els valors finals obtinguts que no estan relacionades amb la concentració inicial d'ADN. A la PCR convencional es visualitza l'ADN amplificat que s'obté al final de la reacció: la fase estacionària o "plateau" (Fig. 4.1) en un gel d'agarosa. Els resultats obtinguts en aquesta última fase de la PCR són qualitius: ens indiquen la presència o absència d'amplificació. Les variacions obtingudes en els últims cicles no permeten la quantificació de l'ADN en aquesta fase (Costa, J., 2004).

Figura 4.1 Fases de la reacció d'amplificació per PCR.

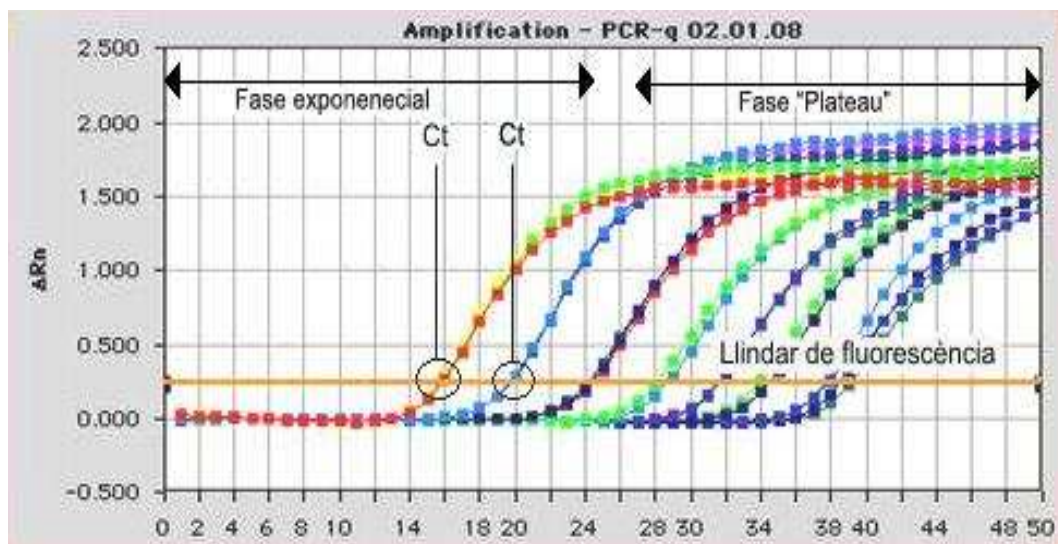


La PCR-Q utilitza molècules fluorescents que s'intercalen en l'ADN o que formen part d'una sonda específica. Aquesta PCR es duu a terme en termocicladors que

incorporen un lector de fluorescència i estan dissenyats per a mesurar en qualsevol moment, la fluorescència emesa a cada vial on es produeix l'amplificació (Costa, J., 2004). D'aquesta manera es pot fer un seguiment a temps real de l'amplificació durant tots els estadis de la reacció: fase exponencial, lineal i "Plateau" (Fig. 4.1). L'emissió de fluorescència queda dibuixada gràficament en corbes de cinètica de la reacció per cada una de les mostres i controls (Fig. 4.2). Només la fase exponencial de l'amplificació és proporcional a la quantitat inicial d'ADN i per tant, només amb la PCR-Q es pot establir relacions entre l'amplificat en un determinat moment i la quantitat inicial d'ADN de la mostra (Ginzinger, D.G., 2002; Kubista, M. et al, 2006).

Durant els primers estadis del desenvolupament de la PCR-Q, la fluorescència emesa no es distingeix del soroll de fons de la mostra (Fig. 4.2). Aquesta augmenta de manera proporcional a mesura que incrementa l'amplificació d'ADN. En la fase exponencial es determina un llindar de la senyal de fluorescència (threshold), superior a la fluorescència basal. El número de cicles de PCR que es necessita per que la corba d'amplificació de la mostra arribi a aquest llindar s'anomena valor C_T (Fig. 4.2). Aquest valor és el que s'utilitza per a comparar i quantificar les mostres i és inversament proporcional a la concentració inicial d'ADN diana. Quan es compara el valor C_T de cada mostra amb l'obtingut al valorar una corba estàndard de concentració d'ADN coneguda es pot extrapolar la quantitat inicial de la mostra.

Figura 4.2 Esquema del desenvolupament d'una PCR-Q en temps real.



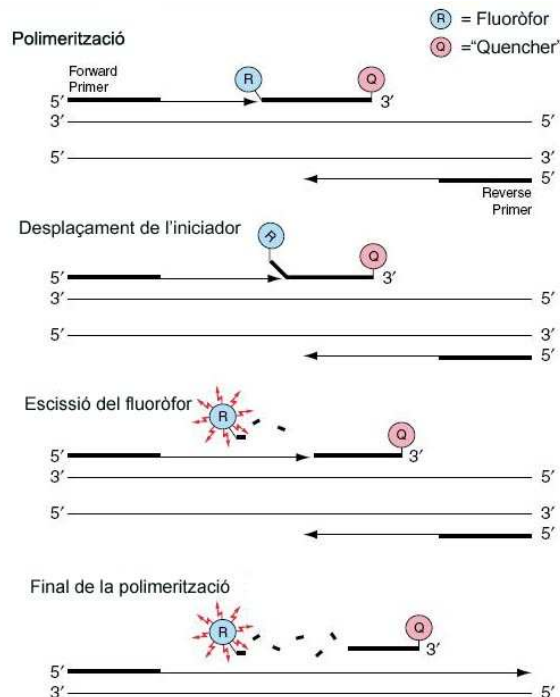
Existeixen diferents tipus de molècules fluorescents que s'utilitzen per a la detecció de l'ADN amplificat amb la PCR-Q a temps real. Les principals es detallen a continuació:

❖ *Sondes TaqMan*

Són oligonucleòtids específics que presenten un molècula donadora de fluorescència (fluoròfor) a l'extrem 5' i una acceptora ("quencher") a l'extrem 3'. Quan aquestes dues molècules estan pròximes, el "quencher" absorbeix la fluorescència emesa pel fluoròfor. Aquest procés és el que s'anomena transferència d'energia fluorescent mitjançant ressonància (FRET: Förster resonance energy transfer). El "quencher" emet la fluorescència que ha absorbit a una longitud d'ona diferent que la emesa pel fluoròfor (Costa, J., 2004). Es poden utilitzar diferents tipus de fluoròfors i "quenchers" per exemple: FAM, TAMRA, TET, Texas Red, CY5, etc., però s'ha de tenir en compte que no es solapin les diferents longituds d'ona d'emissió.

La sonda TaqMan hibrida específicament en una zona interna del producte que s'amplificarà a partir dels iniciadors, també específics. De manera que quan es produeix la desnaturalització de l'ADN la sonda hibrida amb la molècula de la mateixa manera que ho fan els iniciadors (Fig. 4.3). La polimerasa presenta activitat exonucleasa així que quan polimeritza la molècula i es troba la sonda hibridada, la degrada. Es produeix l'alliberació del fluoròfor i del "quencher" que ja no podrà absorbir-ne la fluorescència. Per tant, la fluorescència emesa pel fluoròfor ja podrà ser quantificada. Aquesta, anirà incrementant a mesura que es va amplificant l'ADN i es va degradant la sonda amb el fluoròfor (Holland, P.M. et al, 1991).

Figura 4.3 Procés d'emissió de fluorescència a la PCR-Q amb sondes TaqMan



iniciadors, etc. Per a pal·liar aquest inconvenient es realitzen les corbes de dissociació (“melting curves”) després d’haver-se realitzat la reacció d’amplificació. Aquest procés consisteix a incrementar gradualment la temperatura de les mostres amplificades. Quan s’assoleix la temperatura de desnaturalització de l’amplificat (T_m), la molècula amplificada es desnaturalitza s’allibera el fluoròfor disminuint abruptament la fluorescència detectada. Si hi ha formació de dímers o amplificacions inespecífiques, probablement, es desnaturalitzaran a una temperatura diferent, i per tant s’observaran corbes de desnaturalització diferents (Kubista, M. et al, 2006; Zipper, H. et al, 2004).

4.1.2 *PCR quantitativa en temps real aplicada al gènere Bacteroides*

La utilització de la PCR quantitativa a temps real permet estudiar la composició de diferents comunitats en els seus hàbitats i quantificar els seus canvis (Bach, H.J. et al, 2002; Dionisi, H.M. et al, 2003; Gueimonde, M. et al, 2004; Haarman, M. et al, 2005; Labrenz, M. et al, 2004; Stults, J.R. et al, 2001). Per tant, aquesta tècnica serà útil per a estudiar la persistència d’indicadors bacterians a l’aigua, poder establir com varien en el temps i a quines condicions són més vulnerables. Cal tenir en compte que aquesta tècnica detecta material genètic i per tant no diferencia entre cèl·lules viables, VBNC i inviables. Últimament s’han descrit mètodes per a poder diferenciar les cèl·lules no viables afegint substàncies que s’intercalen en l’ADN de les cèl·lules mortes i n’inhibeixen l’amplificació (Pisz, J.M. et al, 2007).

Per tal de poder estudiar la persistència de *Bacteroides* spp. quan arriba al medi natural (Veure Capítol 5) es va valorar el desenvolupament d’una PCR-Q específica. Com ja s’ha comentat, el gènere *Bacteroides* ha estat proposat des de fa temps com a possible indicador de l’origen de la contaminació fecal a l’aigua (Allsop, K. et al, 1984; Kreader, C.A., 1995) i s’han descrit un elevat nombre de metodologies moleculars per tal de poder ser utilitzat (Bernhard, A.E. et al, 2000a; Bernhard, A.E. et al, 2000b; Carson, C.A. et al, 2005; Kildare, B.J. et al, 2007; Kreader, C.A., 1995; Layton, A. et al, 2006). La seva fisiologia anaeròbia, que per una banda ha permès una co-evolució amb l’hoste, fa que la seva supervivència a l’ambient sigui curta, i per tant indica contaminació recent de l’aigua; però es coneix poc quina és la seva supervivència i quins factors afecten la seva viabilitat. A més a més, moltes de les espècies de *Bacteroides* no han estat cultivades encara, només se’n coneix les seqüències genòmiques dipositades als bancs de dades (Bach, H.J. et al, 2002; Suau, A. et al, 1999;

Eckburg, P.B. et al, 2005). Ni aquestes espècies, ni les VBNC, poden ser detectades ni quantificades amb els mètodes rutinaris de cultiu al laboratori. Així que caldran mètodes que vagin més enllà per tal de tenir-les en compte.

La PCR-Q es una bona tècnica per a poder estudiar la dinàmica de *Bacteroides* quan es abocat al medi. S'han descrit un elevat número de PCRs quantitatives a temps real per a poder detectar espècies d'aquest gènere. Algunes d'elles són genèriques i permeten detectar i quantificar el gènere *Bacteroides* (Dick, L.K. et al, 2004; Kildare, B.J. et al, 2007; Layton, A. et al, 2006; Siefering, S. et al, 2008). La majoria d'elles, però, s'han descrit com a tècniques de MST i per tant amplifiquen espècies capaces de discriminar l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Kildare, B.J. et al, 2007; Layton, A. et al, 2006; Okabe, S. et al, 2007a; Reischer, G.H. et al, 2006; Reischer, G.H. et al, 2007; Seurinck, S. et al, 2005a; Shanks, O.C. et al, 2008; Stricker, A.R. et al, 2008).

Per tal de poder estudiar, posteriorment, la dinàmica de *Bacteroides* spp. com a indicador de la contaminació fecal quan és abocat al medi, es va dissenyar i avaluar, prèviament, diferents PCR-Q a temps real. Així els objectius d'aquest capítol han estat:

1. Adaptar i avaluar una PCR-Q utilitzant SYBR Green i els iniciadors genèrics de *Bacteroides* Bac32 i Bac708 (Bernhard, A.E. et al, 2000a).
2. Disseny d'una PCR-Q a temps real amb sonda TaqMan específica pel gènere *Bacteroides*.
3. Comparar l'eficàcia d'aquestes dues tècniques moleculars amb una PCR-Q a temps real específica per *Bacteroides* spp. descrita prèviament (Layton, A. et al, 2006).

4.2 Materials i Mètodes

4.2.1 Determinació del límit de quantificació de la PCR-Q

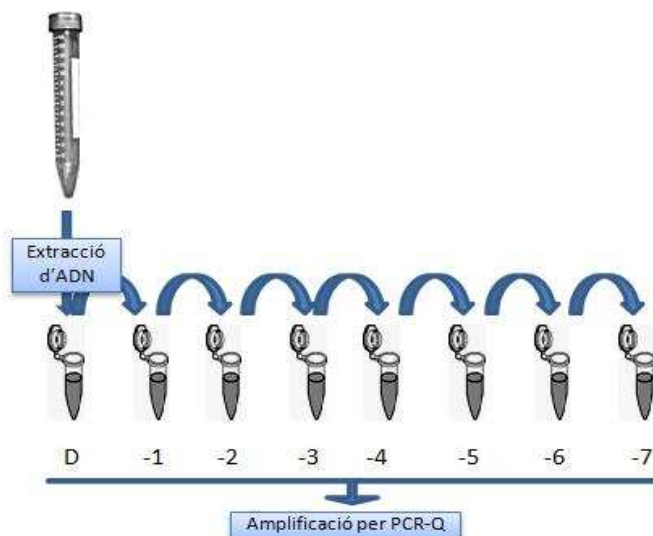
La corba estàndard és la base de la PCR-Q absoluta ja que permet establir una relació entre aquesta i la mostra. En aquest cas s'ha utilitzat el banc de dilucions generat per a determinar el límit de quantificació com a corba estàndard per a poder quantificar la concentració d'ADN de les mostres. A la vegada ha servit per a valorar les tres PCR-Qs que s'han avaluat en l'estudi.

Per a determinar el límit de quantificació de la PCR-Q s'ha utilitzat un cultiu pur de *Bacteroides fragilis* (DSM 2151^T). Aquesta soca s'ha descongelat i inoculat en brou BPRM (Annex I) tal com s'indica a l'apartat 2.2.2.1 i ha estat incubada a 37°C 48 h en condicions d'anaerobiosis. S'ha calculat la concentració de diferents estats cel·lulars del cultiu mitjançant:

- El recompte de cèl·lules cultivables a partir de la sembra en plaques d'agar BPRM (Annex I) .
- El recompte de cèl·lules totals mitjançant el comptador de partícules d'orifici de 30 µm Coulter Multisizer Particule Counter (Beckman Coulter). S'ha utilitzat solució Isoton (Beckman Coulter) per obtenir la concentració adequada de cèl·lules per a poder ser quantificades amb l'aparell.
- L'estimació del número de cèl·lules viables i inviables utilitzant el Kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, USA) segons les instruccions del fabricant. El recompte de cèl·lules tenyides s'ha fet amb un microscopi d'epifluorescència (Nikon) amb il·luminació de camp clar. Per la fluorescència s'ha utilitzat una làmpada de mercuri de 50W. Les cèl·lules viables es visualitzen al microscopi de color verd i les cèl·lules danyades de color roig.

A la vegada, del mateix cultiu, s'ha realitzat l'extracció d'ADN amb el Kit d'extracció QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen). Tal com es mostra a la figura 4.5 s'ha efectuat un banc de dilucions seriades (1/10) de l'extracció d'ADN del cultiu inicial. S'ha quantificat la concentració d'ADN de les diferents extraccions mitjançant el quantificador d'àcids nucleics GeneQuant™ *pro* RNA/DNA Calculator Spectrophotometer.

Figura 4.5 Obtenció del banc de dilucions per a calcular el límit de quantificació de la PCR-Q a temps real. S'ha realitzat el banc de dilucions (1/10) a partir de l'extracció d'ADN del cultiu inicial.

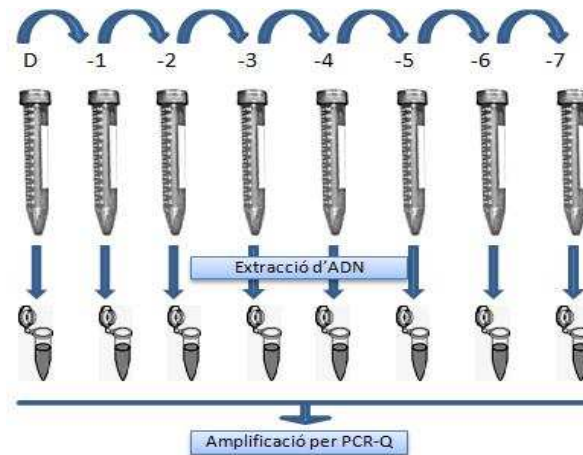


4.2.2 Determinació del límit de detecció de la PCR-Q

Quan s'aplica tècniques moleculars a l'anàlisi de mostres ambientals apareixen certes limitacions, com són la presència d'inhibidors de la PCR, l'eficiència d'extracció de l'ADN de la mostra, etc. S'ha vist que alguns mètodes d'extracció d'ADN mostren variabilitat alhora d'extreure l'ADN de les mostres (Dionisi, H.M. et al, 2003; Layton, A. et al, 2006). En aquest estudi s'ha utilitzat el banc de dilucions generat a partir de l'extracció d'ADN d'un cultiu com a recta patró, i per tant no reflecteix els problemes derivats de l'extracció d'ADN quan s'analitzen mostres ambientals. De totes maneres, per tal de tenir en compte possibles desviacions en les mostres ambientals, s'ha determinat el límit de detecció de la PCR-Q a partir de l'anàlisi d'un banc de dilucions del cultiu inicial de *B. fragilis* (DSM 2151^T).

Per això, s'ha realitzat dilucions seriades (1/10) utilitzant Ringer ¼ (Oxoid, Hampshire, England) de les quals s'ha extret l'ADN amb el Kit d'extracció QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen) (Figura 4.6). La concentració d'ADN obtinguda s'ha quantificat amb el quantificador d'ADN GeneQuant™ pro RNA/DNA Calculator Spectrophotometer (Amersham Biosciences).

Figura 4.6 Obtenció del banc de dilucions per a calcular el límit de detecció de la PCR-Q a temps real. S'ha realitzat l'extracció d'ADN de cada dilució seriada (1/10) a partir del cultiu inicial.



4.2.3 Desenvolupament de les diferents PCR-Q en temps real

4.2.3.1 PCR-Q en temps real utilitzant la molècula intercalant SYBRGreen

La primera aproximació a la PCR-Q ha estat utilitzant el fluoròfor intercalant de l'ADN: SYBR Green (PCR Core Reagents Appl Biosystems). Aquest mètode representa un menor cost econòmic, i és més fàcil de dur a terme una vegada s'han definit les condicions i els iniciadors a utilitzar; i aquests són suficientment específics i eficients.

En aquest cas s'ha utilitzat els iniciadors específics del gènere *Bacteroides*: Bac32 i Bac708 (Taula 4.1) i les condicions que havien estat definides prèviament per una PCR convencional (Bernhard, A.E. et al, 2000a).

Taula 4.1 Iniciadors utilitzat en l'aplicació de la PCR-Q amb SYBR-Green

Iniciador	Seqüència 5'-3'	T _m
Bac32F	AACGCTAGCTACAGGCTT	54°C
Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	

Els assajos de PCR-Q s'han dut a terme en un volum de reacció de 50 µl. Les concentracions de reactius utilitzats han estat: una concentració 1X de tampó de SYBR Green (Applied Biosystems), 200 µM de dNTPs (Applied Biosystems), 0,2 µM dels iniciadors Bac32 i Bac708 i 1,5 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems). S'han avaluat diferents concentracions de MgCl₂: 1 mM, 1,5 mM, 2 mM i 3 mM i diferents

volums d'ADN motlle 1 µl, 4 µl i 10 µl. També s'ha assajat diferents temperatures d'hibridació: 54°C, 57°C, 59°C i 61°C. El programa de la PCR-Q utilitzat es detalla a la taula 4.2.

Taula 4. 2 Programa utilitzat en la PCR-Q amb SYBR Green.

	94° C	5 min
30 cicles	94° C	30 s
	54-61° C	30 s
	72° C	40 s
	4° C	∞

4.2.3.2 Disseny d'una PCR-Q en temps real utilitzant una sonda TaqMan

A partir de l'alineament de seqüències de *Bacteroides*, obtingudes de la base de dades del GenBank, utilitzant el programa BioEdit s'ha establert una seqüència consens del gènere *Bacteroides*. Aquesta seqüència ha estat utilitzada per a dissenyar uns iniciadors i una sonda TaqMan específics per detectar el gènere *Bacteroides* mitjançant el programa Primer Express Software v2.0 (Applied Biosystems). Per al seu disseny s'ha seguit els requisits que assegurin el bon funcionament de la PCR-Q (Applied Biosystem, 2002): amplificat entre 50-150 pb, una temperatura d'hibridació dels iniciadors entre 58-60°C i 10°C més per la sonda TaqMan (68-70°C).

Finalment s'ha comprovat l'especificitat dels oligonucleòtids analitzant la seva similitud en la base de dades RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Els iniciadors i la sonda definits es mostren a la taula 4.3.

Taula 4.3 Iniciadors i sonda descrits per la TaqMan PCR-Q.

Iniciador	Seqüència 5'-3'
Bact1-F	CCGGGGCTACACACGTGT
Bact1-R	CAAGGCCCGGGAACGTAT
Bact1-S	6-FAM-TCGCGCATCAGCCA-TAMRA

La sonda incorpora el fluoròfor FAM (λ d'absorció màxima de 492 nm i una λ d'emissió màxima de 516 nm) i el "quencher" TAMRA (λ d'absorció màxima 556 nm i λ d'emissió màxima 580 nm) (Stratagene, 2004).

L'amplificació s'ha dut a terme en un volum de reacció de 20 µl, 10 µl dels quals corresponen a TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La Master

Mix conté: AmpliTaq Gold[®] ADN polimerasa, dNTPs, tampó i una referència passiva que permet normalitzar la senyal del fluoròfor. La normalització és necessària per evitar fluctuacions degudes a variacions de volum entre mostres.

Per tal d'aconseguir la màxima eficiència d'amplificació s'han assajat diferents concentracions:

→ d'iniciadors (600-600 nM, 400-400 nM, 200-200 nM, 300-300 nM, 300-200 nM, 200-300 nM, 100-200 nM, 200-100 nM, 100-100 nM)

→ de la sonda (200 nM, 150 nM, 100 nM, 50 nM)

→ de MgCl₂ (0 i 500 µM).

El programa de PCR que s'ha utilitzat es detalla a la taula 4.4.

Taula 4.4 Programa utilitzat en la TaqMan PCR-Q descrita pels iniciadors: Bact1-F i Bact1-R i la sonda Bact1-S.

	50°C	2 min
	95°C	10 min
40 cicles	95°C	15 s
	60°C	1 min
	4°C	∞

S'ha anomenat aquesta PCR-Q dissenyada com TaqMan 1 per tal de diferenciar-la de la següent PCR-Q valorada, detallada a continuació.

4.2.3.3 Avaluació d'una PCR-Q descrita prèviament (Layton et al. 2006)

Per últim, s'ha avaluat una PCR-Q utilitzant una sonda TaqMan que ha estat descrita prèviament per estimar el número d'espècies del gènere *Bacteroides* (en l'estudi s'ha anomenat TaqMan 2 per diferenciar-la de TaqMan 1) (Layton, A. et al, 2006). Els oligonucleòtids utilitzats en aquest assaig es detallen a la Taula 4.5. En aquest cas la sonda incorpora el fluoròfor FAM i el "quencher" BHQ (Black Hole Quencher). El "quencher" BHQ no emet la fluorescència fins que es produeix la hibridació, no presenta fluorescència basal, i per tant evita un possible soroll de fons que pot emascarar la senyal (Stratagene). La reacció s'ha portat a un volum de 20 µl amb 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µl d'ADN i una concentració de 600 nM de cada iniciador i 200 nM de la sonda. El programa de la PCR es detalla a la Taula 4.6.

Taula 4.5 Iniciadors i sonda utilitzats en la TaqMan PCR-Q basada amb les condicions descrites per Layton et al. 2006.

Iniciador	Seqüència 5'-3'
AllBact296f	GAGAGGAAGGTCCCCAC
AllBact412r	CGCTACTTGGCTGGTTCAG
AllBact375Bhqr	6-FAM-CCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCT –BHQ-1

Taula 4.6 Programa utilitzat en la TaqMan PCR-Q descrita prèviament (Layton, A. et al, 2006)

	50° C	2 min
	95° C	10 min
50 cicles	95° C	30 s
	60° C	45 s
	4° C	∞

Un cop ajustades les concentracions dels reactius i els programes de les reaccions; les diferents PCRs s'han avaluat mitjançant l'amplificació de la corba estàndard amb el termociclador ABI Prism ® 7700 Sequence Detection utilitzant el programa SDS v. 1.6.3 (Applied Biosystems).

4.2.4 Càlcul de l'eficiència de la PCR-Q

La reacció d'amplificació de l'ADN, durant la fase exponencial, segueix l'equació 4.1. On T_N és la quantitat d'ADN final de la reacció de N cicles. T_0 és la quantitat inicial d'ADN i E és l'eficiència en que es produeix la reacció. Així que, l'eficiència d'una PCR determina la mesura en que es produeix un nou amplificat de la PCR. La màxima eficiència de la reacció s'observa quan a cada cicle es duplica les molècules d'ADN de la mostra.

$$T_n = T_0 \cdot (E)^N \quad \text{Equació 4.1}$$

L'eficiència de la PCR-Q es calcula a partir de la pendent obtinguda de l'anàlisi d'una recta patró de concentracions conegudes i indica el número de cicles necessaris per tal d'incrementar un logaritme la quantitat d'ADN de la reacció. Un 100% d'eficiència correspon a una pendent del -3,322, això indica que amb 3,322 cicles de PCR s'incrementa un logaritme la quantitat d'ADN. L'eficiència d'amplificació es calcula tal com s'indica al panell 4.1.

Panell 4.1**Càlcul de l'eficiència de la PCR-Q**

Mitjançant l'anàlisi de la recta patró s'obté la relació entre la concentració de la mostra (en número de cèl·lules, ng ADN/ μ l, etc.) i el cicle C_T . És una relació lineal que segueix l'equació d'una recta de regressió:

$$\text{Equació de la recta patró: } y = Kx + a$$

A partir de la pendent de la recta (K) i utilitzant l'equació 4.2 es pot obtenir el càlcul de l'eficiència de la reacció.

$$\text{Eficiència} = 10^{-\frac{1}{K}} - 1 \quad \text{Equació 4.2}$$

4.3 Resultats

4.3.1 Caracterització de la composició de la corba estàndard

L'avaluació de les diferents PCR-Qs s'ha realitzant avaluant el banc de dilucions generat per analitzar el límit de quantificació i que ha servit de corba estàndard per a quantificar, posteriorment, les mostres.

Per tal de conèixer la població de les diferents dilucions que constitueixen la corba estàndard, s'ha calculat: el número de cèl·lules cultivables a partir d'un cultiu en plaques en agar BPRM; el número de cèl·lules viables avaluant la proporció de cèl·lules vives i mortes amb el Kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, USA) a partir del recompte de cèl·lules tenyides de verd o de roig; i el número de partícules més grans de 30 µm presents a la mostra amb el comptador de partícules Coulter Multisizer (Beckman Coulter). La concentració obtinguda es detalla a la taula 4.7.

Taula 4. 7 Caracterització de la composició del cultiu de *B. fragilis* (DSM 2151^T) utilitzat per avaluar el límit de detecció i quantificació de les PCR-Qs

Reactiu	Volum afegit
UFC/ml	$2,79 \cdot 10^8$
Estimació cèl. viables/ ml	$7,99 \cdot 10^8$
Partícules /ml	$1,07 \cdot 10^9$
concentració ADN ng/µl	12
còpies del 16S ARNr/µl	$2,21 \cdot 10^7$
Estimació cèl. totals/ml*	$3,69 \cdot 10^9$

*Estimació a partir del número de còpies del 16S ARNr (veure panell 4.2)

Un cop obtingut el banc de dilucions de l'extracció d'ADN s'ha quantificat la seva concentració mitjançant un quantificador d'àcids nucleics. L'extracte d'ADN directe del cultiu de *B. fragilis* conté una concentració de 12 ng/µl. No s'ha pogut valorar la majoria de les dilucions posteriors ja que el límit de detecció de l'aparell és de 3 ng/µl.

A partir de la concentració d'ADN, tal i com s'indica al Panell 4.2, s'ha estimat el número de còpies del gen del 16S ARNr que és el que es detecta en totes les PCR-Qs assajades i el número de cèl·lules totals teòriques que correspondria a aquesta quantitat (Panell 4.2) (Taula 4.7).

Panel 4.2

Estimació del número de còpies del gen 16S ARNr i de cèl·lules de la corba estàndard a partir de la concentració d'ADN

Tenint en compte que el genoma de *B. fragilis* mesura al voltant d'unes 5,2 Mb i conté 6 còpies del gen del 16S ARNr (Cerdano-Tarraga et al, 2005):

$$\frac{6\text{còpies}}{1\text{genoma}} \times \frac{1\text{genoma}}{5,2\text{Mb}} \times \frac{\text{Mb}}{1,096 \cdot 10^{-15} \text{g}} \times \frac{1\text{g}}{10^9 \text{ng}} \times \frac{21\text{ng}}{1\mu\text{l}} = 2,21 \cdot 10^7 \text{ còpies}/\mu\text{L}$$

* valor estàndard del pes en grams de $1 \cdot 10^6$ pb

$$2,21 \cdot 10^7 \frac{\text{còpies}}{\mu\text{l}} \times \frac{1\text{cèl·lula}}{6\text{còpies}} \times \frac{1000\mu\text{l}}{1\text{ml}} = 3,68 \cdot 10^9 \text{ cel}/\text{ml}$$

S'ha estimat que, aproximadament, a l'extracció directa del cultiu hi haurà $2,21 \cdot 10^7$ còpies del gen del 16S ARNr/ μL i això representa $3,68 \cdot 10^9$ cèl·lules/ml. Aquest valor és un valor teòric de les cèl·lules totals hauria de ser comparable amb el valor obtingut amb el comptador de partícules: $1,07 \cdot 10^9$ part./ml.

4.3.2 Avaluació de les diferents PCR-Q

S'ha valorat l'eficiència i el límit de quantificació de les diferents PCR-Qs introduïdes anteriorment analitzant el banc de dilucions caracteritzat a l'apartat 4.3.1. La caracterització d'aquests paràmetres ha permès avaluar la viabilitat de les diferents PCR-Qs per a poder ser utilitzades en posteriors estudis.

L'anàlisi de les diferents reaccions d'amplificació s'ha realitzat mitjançant els registres d'emissió de fluorescència al llarg de la PCR-Q. El programa informàtic S.D.S representa en una gràfica els increments de fluorescència de cada mostra durant cada cicle del procés d'amplificació.

En primer lloc s'ha avaluat la PCR-Q basada en una PCR convencional descrita prèviament (Bernhard, A.E. et al, 2000a) utilitzant com a fluoròfor la molècula SYBR Green. La dinàmica de les corbes d'amplificació que s'observen amb el programa S.D.S obtingudes amb aquesta metodologia, han mostrat una baixa eficiència de la reacció. Les corbes d'amplificació de la PCR-Q mostraven una saturació de la reacció, i no ha pogut ser millorada amb cap de les modificacions assajades. A més a més, les corbes de dissociació analitzades posteriorment a cada reacció d'amplificació han

mostrat unions inespecífiques del fluoròfor amb possibles dímers dels oligonucleòtids. Per tant, ja d'entrada, es va descartar aquesta PCR-Q per a posteriors anàlisis.

S'ha avaluat una segona PCR-Q, en aquest cas s'han dissenyat els iniciadors Bact1-F i Bact1-R i la sonda TaqMan Bact1-S per tal d'avaluar una nova PCR-Q (Taqman1). L'iniciador Bact1-F i la sonda Bact1-S presenten una similitud pràcticament exclusiva dels gèneres *Bacteroides* i *Prevotella*, tot i que hibriden amb algunes espècies del fílum Bacteroidetes. L'iniciador Bact1-R és inespecífic i presenta similitud amb un número més elevat d'espècies.

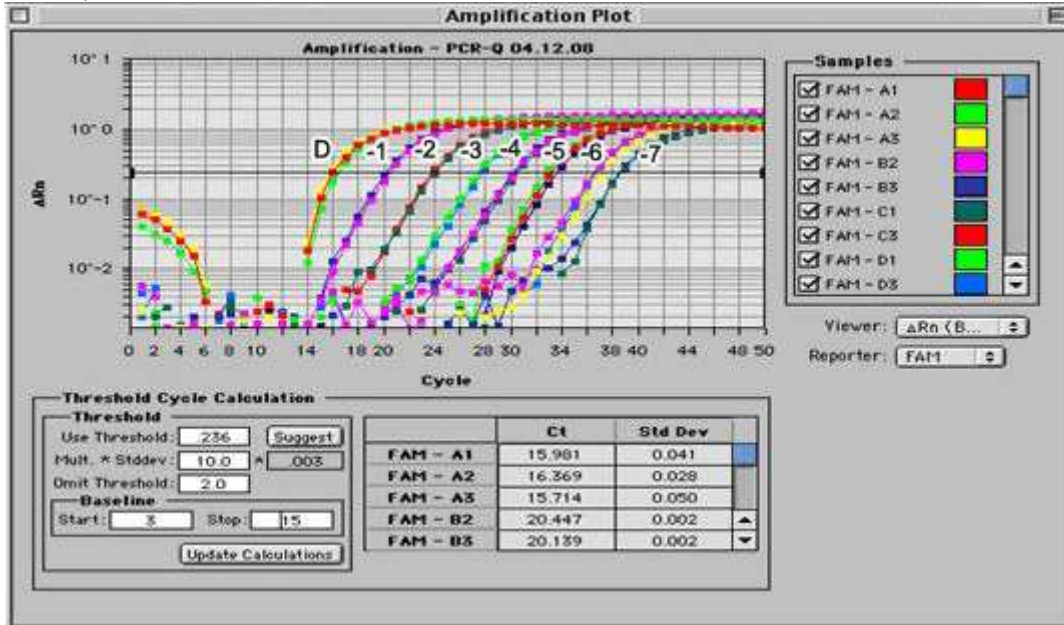
S'han avaluat diferents concentracions de reactius per tal d'establir les condicions amb que s'obtenia una millor eficiència d'amplificació. Les concentracions de reactius òptimes obtingudes que han permès una bona eficiència d'amplificació es detallen a la taula 4.8.

Taula 4.8 Reactius i concentracions necessàries per a la reacció de PCR-Q TaqMan 1.

Reactiu	Volum afegit	Concentració final
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Bisystems)	10 µl	1x
Iniciador Bact1-F (2 µM)	2 µl	200 nM
Iniciador Bact1-R (2 µM)	2 µl	200 nM
Sonda Bact1-S (1 µM)	2 µl	100 nM
ADN	2 µl	
H ₂ O	2 µl	
Volum Total	20 µl	

Finalment, s'ha avaluat la TaqMan PCR descrita prèviament (Layton, A. et al, 2006) que utilitza els iniciadors AIIbact296f/AIIbact412r i la sonda AIIbact375Bhqr. Els dos iniciadors presenten similitud, bàsicament, amb espècies del gènere *Bacteroides* i *Prevotella* i alguna que altra espècie del fílum Bacteroidetes. La sonda és menys específica i identifica espècies del gènere *Bacteroides*, *Porhyromonas*, *Prevotella* i *Flavobacterium* i altres espècies del fílum Bacteroidetes. A la Figura 4.7 es mostra les corbes d'amplificació obtingudes de l'anàlisi de la recta patró.

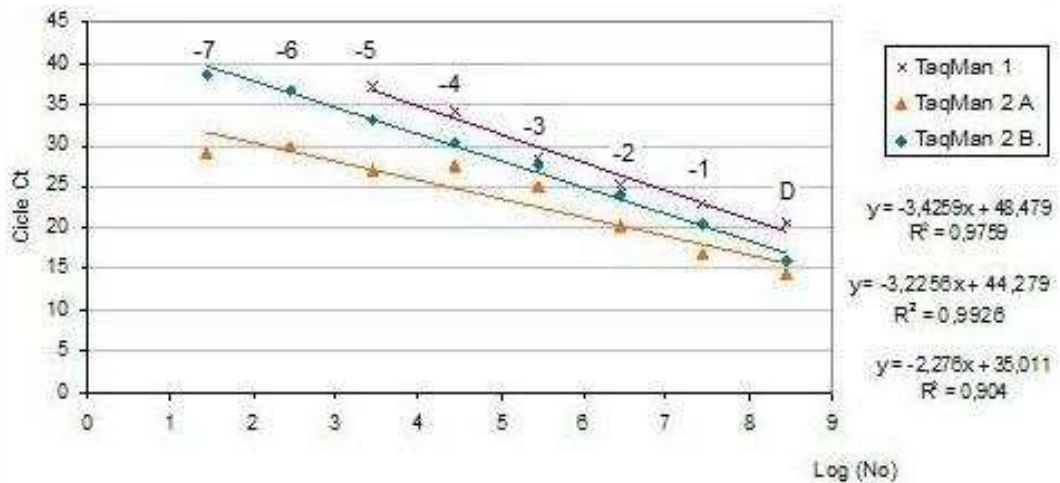
Figura 4.7 Gràfiques d'emissió de fluorescència de les diferents rèpliques de la PCR-Q a temps real de la corba estàndard TaqMan 2 B. D: Extracció directa del cultiu; -1: diluïció 1/10 de D; -2: diluïció 1/100; -3: diluïció 1/1.000; -4: diluïció 1/10.000; -5: diluïció 1/100.000; -6: diluïció 1/1.000.000; -7: diluïció 1/10.000.000.



4.3.3 Determinació del límit de quantificació de les PCR-Q

El límit de quantificació de les PCR-Qs s'ha calculat a partir de l'anàlisi d'un banc de dilucions d'una extracció d'ADN del cultiu de *B. fragilis* mitjançant les PCR-Q: TaqMan1 i TaqMan2. Una vegada analitzat el banc de dilucions mitjançant les dues metodologies, s'ha obtingut una recta estàndard en funció del logaritme de cèl·lules cultivables/ml i el cicle C_T. Les rectes patró obtingudes es mostren a la Figura 4.8.

Figura 4.8 Rectes patró obtingudes de l'anàlisi del límit de detecció amb les dues PCR-Qs assajades: TaqMan1 i TaqMan2 i del límit de detecció. Obtingudes a partir de la relació del cicle C_T (en que es sobrepassa el llindar de fluorescència basal) i el número d'UFC/ml en unitats logarítmiques.



La recta estàndard TaqMan 1 permet una bona quantificació fins a la dilució (-5) ($\log(N_0)=3,44$ unitats logarítmiques UFC/ml), el que correspon a $2,21 \cdot 10^2$ còpies del 16S ARNr/ μ l o $2,79 \cdot 10^3$ UFC/ml. En canvi, la recta estàndard derivada de la TaqMan 2 presenta una sensibilitat més elevada podent detectar fins a 2,21 còpies del 16S ARNr/ μ l o $2,79 \cdot 10^1$ UFC/ml. Tot i que a la dilució (-7) ($\log(N_0)=1,44$ unitats logarítmiques UFC/ml) s'observa una disminució de la linealitat de la recta (Fig 4.7 i 4.8).

L'eficiència d'amplificació de les dues PCR-Qs, s'ha calculat a partir de l'equació de la recta patró aconseguida durant els diferents assaigs realitzats. Les rectes patró obtingudes juntament amb l'error es mostren al marge dret de la gràfica en la Fig. 3.8. En ambdós casos s'ha obtingut una eficiència suficientment bona del 83% al 97% en la PCR-Q TaqMan 1 i més alta en la TaqMan 2, del 93 al 105% (Taula 4.9).

Taula 4.9 Eficiència i sensibilitat obtinguda amb les diferents PCR-Qs assajades en aquest estudi.

PCR-Q	Pendent de la recta	Eficiència	Rang de quantificació (UFC/ml)	Bibliografia
TaqMan 1	-3,426	83%-97%*	$2,79 \cdot 10^8$ - $2,79 \cdot 10^3$	Aquest estudi
TaqMan 2	-3,226	93%-105%*	$2,79 \cdot 10^8$ - $2,79 \cdot 10^1$	Layton et al. 2006

* Calculada a partir de l'Equació 4.1

4.3.4 Determinació del límit de detecció de les PCR-Q

La recta patró generada per a avaluar el límit de detecció s'ha creat a partir del banc de dilucions del cultiu directe de *B. fragilis* i l'extracció d'ADN de cada dilució. S'ha utilitzat per posar de manifest l'eficiència del Kit d'extracció.

Com que s'ha utilitzat el mateix cultiu que per a determinar el límit de quantificació, la composició i concentració cel·lular és la que s'ha mostrat a la taula 4.7. S'ha quantificat la concentració d'ADN de cada extracció, de totes maneres el límit de detecció del GeneQuant ha permès que solament es pogués quantificar la dilució (-1) on s'ha detectat una concentració de 5 ng/ μ l.

La recta que s'obté de l'anàlisi del banc de dilucions per analitzar el límit de detecció amb la PCR-Q TaqMan 2 es mostra a la Fig. 4.8 (símbol: triangle), de manera que es pot comparar amb el límit de quantificació obtingut de les PCR-Qs TaqMan 1 i 2. Aquesta recta presenta una tendència diferent en comparació a les altres dues que es dibuixen més o menys paral·leles i una R^2 de 0,904, lleugerament inferior a la resta. Quan s'eliminen els 3 últims punts (dilucions (-7), (-6) i (-5)) s'obté la recta:

$$y = 3,4357x + 42,943 \quad \text{amb una } R^2=0,9854$$

per tant, es guanya en eficiència i la pendent és més semblant a les altres dues rectes patró de quantificació.

4.4 Discussió

La recta patró és un factor clau alhora d'utilitzar una PCR-Q absoluta ja que permet la quantificació correcta de cèl·lules o còpies del gen d'una mostra ambiental. En aquest cas s'ha caracteritzat els diferents tipus cel·lulars que hi pot haver en el cultiu de *B. fragilis* que s'ha utilitzat per a dur a terme la corba estàndard. S'ha utilitzat el comptador de partícules per a reflectir el número de cèl·lules totals de la mostra. El comptador presenta, però, certes limitacions que cal tenir en consideració:

- No discrimina entre cèl·lules i partícules que poden estar en suspensió, com cristalls que poden ser comptabilitzats com a partícules
- El petit calibre de l'orifici (30 μm) el fa molt vulnerable a ser obstruït per qualsevol partícula, cosa que ha dificultat el maneig de l'aparell i la realització del recompte.
- Un *Bacteroides* mesura entre 0,5 μm i 1,5 μm , en canvi el comptador de partícules discrimina cèl·lules amb una mida entre 0,7 μm i 2 μm . Per tant el número de *Bacteroides* pot estar subestimat.

Amb el comptador de partícules s'ha obtingut un total d' $1,07 \cdot 10^9$ partícules/ml, el comptatge en medi BPRM ha donat $2,79 \cdot 10^8$ UFC/ml i l'estimació mitjançant el Kit LIVE/DEAD BacLight ha mostrat aproximadament un 75% de cèl·lules viables de les cèl·lules totals del cultiu. Mitjançant la concentració d'ADN de l'extracció directa del cultiu (la resta de dilucions tenien poca concentració per a poder ser quantificades) s'ha estimat un total de $2,21 \cdot 10^7$ còpies del 16S ADNr/ μl , número que correspondria a $3,69 \cdot 10^9$ cèl·lules/ml (Taula 4.7). Aquest és un valor teòric, però que indicaria una subestimació del valor observat amb el comptador de partícules.

Un cop caracteritzada la corba estàndard s'ha utilitzat per valorar les 3 PCR-Qs assajades en l'estudi.

La PCR-Q utilitzant el fluoròfor SYBR-Green representa una bona alternativa per a ser utilitzada ja que és un mètode fàcil d'aplicar i la més econòmica de les metodologies assajades. Aquesta PCR-Q permet utilitzar fragments d'ADN més grans que no pas la PCR-Q utilitzant sondes TaqMan que precisen de fragments d'amplificació de 150 pb. *Bacteroides* és un gènere complex genèticament, i per tant, és difícil de trobar una seqüència consens, en una zona bastant limitada del gen 16S ARNr, que agrupi totes les espècies del seu gènere i les distingeixi de la resta. Per

això alguns autors han preferit utilitzar aquest tipus de PCR-Q, enlloc d'utilitzar sondes TaqMan (Okabe, S. et al, 2007a). En aquest cas, s'ha utilitzat els iniciadors i les condicions d'una PCR descrita prèviament (Bernhard, A.E. et al, 2000a) i que ha estat utilitzada en altres casos per a la detecció específica del gènere *Bacteroides* (Lamandella, R. et al, 2007; Okabe, S. et al, 2007a; Shanks, O.C. et al, 2006).

La PCR-Q que utilitza el SYBR-Green ha presentat una baixa eficiència d'amplificació i deteccions inespecífiques del fluoròfor. La baixa eficiència pot ser deguda a que la mida de l'ADN amplificat és al voltant de 676pb i a mesura que incrementa la mida l'eficiència de la PCR disminueix. Així doncs, aquesta PCR-Q s'ha descartat de bon principi.

Per tant, s'han avaluat les dos PCR-Qs que utilitzen la sonda TaqMan per a posteriors estudis.

La PCR-Q TaqMan 1 presenta una eficiència d'amplificació entre el 83 i el 97% i la PCR-Q TaqMan 2 (Layton, A. et al, 2006) entre el 105 i el 93% (Taula 3.9). Ambdues PCRs presenten una bona eficiència d'amplificació tot i que és substancialment més alta la segona.

Un altre factor a tenir en compte alhora d'escollir la PCR-Q a utilitzar és el límit de quantificació o la sensibilitat de la PCR-Q. S'ha observat que en la majoria de PCR-Qs a temps real descrites a la bibliografia la sensibilitat oscil·la entre 10^2 i 10^3 cèl./ml (per exemple: $2,4 \cdot 10^3$ (Reischer, G.H. et al, 2007), $1,6 \cdot 10^3$ (Reischer, G.H. et al, 2006) $8,33 \cdot 10^2$ (Dick, L.K. et al, 2004) i $7,5 \cdot 10^2$ cèl. totals/ml (Layton, A. et al, 2006)). S'ha extrapolat aquestes concentracions de cèl·lules totals a partir del número de còpies del gen/ μ l que s'indica als articles.

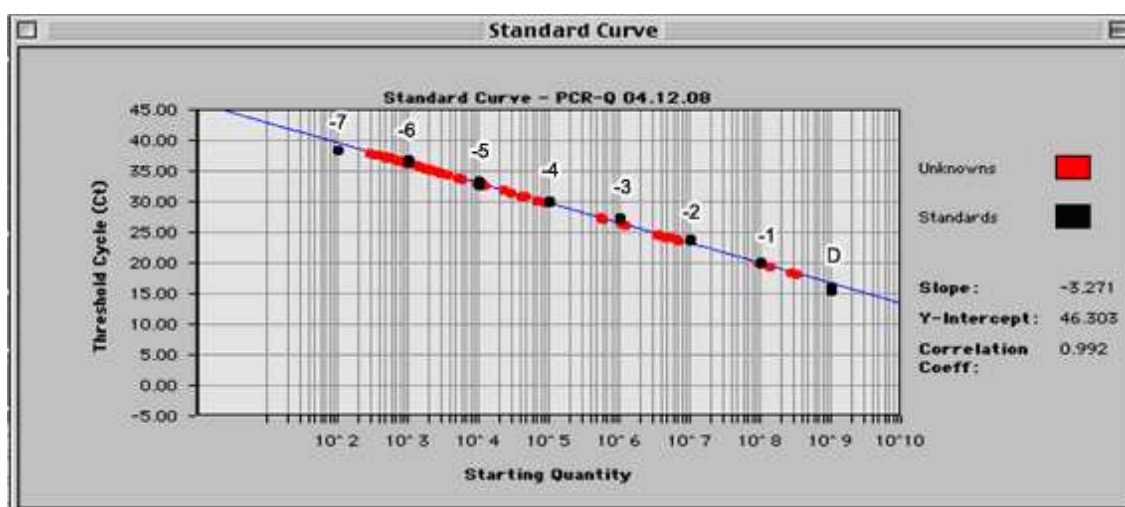
A partir de les concentracions cel·lulars de la Taula 4.7 es pot estimar la sensibilitat de les diferents PCR-Qs assajades. La PCR-Q TaqMan 1 presenta una sensibilitat de $3,68 \cdot 10^4$ cel. totals/ml. S'ha donat el valor a partir de l'estimació de cèl·lules totals/ml de la Taula 4.7, per tal d'equipar-ho amb el valors citats prèviament de la bibliografia. La sensibilitat obtinguda amb aquesta PCR-Q és baixa en comparació amb les sensibilitats esmentades.

La sensibilitat de la PCR-Q amb els iniciadors descrits per Layton (2006) és de $3,68 \cdot 10^2$ cel. totals/ml. Cal tenir en compte que l'últim punt de la recta patró (la dilució (-7)) perd la linealitat de la recta, per tant concentracions baixes que s'identifiquin amb aquest punt poden ser detectades però la quantificació pot no ser prou acurada.

Es va escollir la PCR-Q amb els iniciadors AIIbact296f i AIIbact412r i la sonda AIIbact375Bhqr (Layton, A. et al, 2006) per als posteriors estudis d'avaluació del comportament de *Bacteroides* en el medi ambient. Ja que presentava la millor eficiència i sensibilitat de les diferents PCR-Qs assajades en aquest estudi.

A la Figura 4.9 es mostra la recta patró obtinguda amb el programa informàtic S.D.S a partir de la relació entre la concentració cel·lular de la corba estàndard i dels cicles C_T a partir de la PCR-Q TaqMan 2.

Figura 4.9 Recta patró creada a partir de les C_T de la corba estàndard. Permet extrapolar les C_T de les mostres i d'aquesta manera quantificar-ne la concentració d'ADN. D: Extracció directa del cultiu; -1: dilució 1/10 de D; -2: dilució 1/100; -3: dilució 1/1.000; -4: dilució 1/10.000; -5: dilució 1/100.000; -6: dilució 1/1.000.000; -7: dilució 1/10.000.000.



Existeixen diferències importants quan es compara el límit de quantificació i el límit de detecció (Fig. 4.8) amb les mateixes condicions d'amplificació. La quantificació de la concentració d'ADN de les diferents dilucions del límit de detecció ja revela limitacions amb el mètode d'extracció ja que l'extracció directa del cultiu conté una concentració de 12 ng/ μ l, en canvi, la dilució (-1) mostra una concentració de 5 ng/ μ l. Aquesta concentració no conserva la proporció que li correspondria a una dilució 1/10 de la mostra directa. Aquesta manca de proporció entre dilucions, es fa més pal·lesa quan s'analitzen concentracions més baixes d'ADN. A la recta patró que es mostra a la figura 4.8 s'observa quan a partir de la dilució (-4), que correspon a $2,79 \cdot 10^4$ UFC/ml, es perd la linealitat. Aquesta ineficiència en l'amplificació, pot ser deguda a la metodologia d'extracció (Dionisi, H.M. et al, 2003) que pot presentar limitacions quan existeixen determinades concentracions d'ADN.

Capítol 5

Avaluació de la inactivació
de *Bacteroides* “in situ” en
aigua de riu

5.1 Introducció

Bacteroides és un gènere amb una elevada complexitat bioquímica i genètica el que ha fet que fos poc estudiat fins fa uns anys. Les tècniques moleculars i la seqüenciació del genoma d'algunes espècies han aportat noves dades sobre la complexitat genòmica (Cerdeno-Tarraga, A.M. et al, 2005; Kuwahara, T. et al, 2004; Xu, J. et al, 2003) i han permès un millor coneixement d'aquest gènere. Això ha provocat noves classificacions en la seva filogènia, així com el desenvolupament de noves metodologies per a la seva detecció. El gènere *Bacteroides* ha estat proposat des de fa temps com a possible indicador de contaminació fecal a l'aigua (Allsop, K. et al, 1985) ja que compleix la majoria de requisits per a ser-ho (veure apartat 1.1):

→ L'hàbitat habitual del gènere *Bacteroides* és l'aparell digestiu humà i d'animals de sang calenta, per tant està associat a la presència de patògens ja que són vessats al medi ambient juntament amb les femtes.

→ S'ha observat una concentració de 10^9 - 10^{11} *Bacteroides* per gram de femta en humans, remugants i porcs; una concentració molt superior a la de qualsevol patògen (Fiksdal, L. et al, 1985; Layton, A. et al, 2006; Okabe, S. et al, 2007a).

→ La seva fisiologia anaeròbia fa que la persistència i la capacitat de multiplicar-se al medi ambient sigui limitada. Per tant la seva presència en el medi aquàtic estarà relacionada amb una possible contaminació fecal (Kreader, C.A., 1998).

→ Aquesta limitada capacitat de creixement i persistència al medi ha afavorit una coevolució amb l'hoste i per tant s'ha proposat com a possible indicador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua (Bernhard, A.E. et al, 2000a; Kildare, B.J. et al, 2007; Kreader, C.A., 1995; Layton, A. et al, 2006).

En els capítols previs d'aquesta memòria s'ha avaluat algunes tècniques moleculars per a la detecció de *Bacteroides* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal utilitzant l'amplificació mitjançant PCR (veure capítol 2) i la detecció i quantificació del gènere *Bacteroides* utilitzant la PCR-Q a temps real (veure capítol 4). Ara bé, hi ha encara diferents aspectes que cal conèixer per a valorar la seva utilitat com a indicador fecal. Així és com resulta necessari conèixer la seva correlació amb els patògens i altres indicadors o el temps que persisteixen en el medi ambient. *Bacteroides* és un gènere anaerobi i per tant la seva persistència en un ambient aerobi cal esperar que sigui curta o moderada (Fiksdal, L. et al, 1985; Kreader, C.A., 1998). Per tant, la seva presència en aigües ambientals indicaria una contaminació fecal

recent. Caldrà, encara, saber com de recent és, i valorar els possibles efectes d'estacionalitat i dels diferents factors ambientals que poden condicionar la seva persistència.

5.1.1 *Bacteroides spp. al medi ambient*

Un indicador de la contaminació fecal ha d'estar relacionat amb la possible presència del patògen a l'aigua. És a dir, s'ha de detectar l'indicador a l'aigua quan s'hi manifesta el patògen. Un estudi ha analitzat la presència de *Bacteroides spp.* a l'aigua juntament amb la presència d'indicadors habituals com coliformes totals i fecals i la de patògens d'origen fecal (Savichtcheva, O. et al, 2007). S'ha establert que existeix una correlació més bona entre marcadors genètics de *Bacteroides* i determinats patògens com *E. coli* O-157, *Salmonella* i les enterotoxines LT (toxina termolàbil) i STh (toxina termoestable d'humans) d'*E. coli* enterotoxigènica que no pas entre els patògens i coliformes totals i fecals. Cal tenir en compte que la detecció dels coliformes s'ha dut a terme mitjançant tècniques de cultiu, en canvi s'han utilitzat metodologies moleculars per a la detecció de la resta de microorganismes.

Conèixer la capacitat de supervivència i la resistència als diferents factors que poden intervenir en la inactivació d'un microorganisme indicador és important per tal d'avaluar la seva utilitat com a tal. Alguns autors han avaluat la capacitat de persistència de *Bacteroides* en microcosmos al laboratori per tal d'analitzar la supervivència a diferents temperatures i/o salinitats (Kreader, C.A., 1998; Okabe, S. et al, 2007b; Seurinck, S. et al, 2005a). El primer estudi per a analitzar la persistència de *Bacteroides* al medi ambient es va dur a terme l'any 1985 utilitzant tècniques de cultiu. Es va observar que a les 24 hores de mantenir els bacteris a 12°C es produïa una disminució del 50% de la població i a la setmana restava, tan sols, un 1% de la població inicial (Fiksdal, L. et al, 1985).

Més recentment, s'han realitzat altres estudis per a avaluar la persistència. La majoria d'ells utilitzen tècniques de detecció molecular. En aquests estudis s'ha descrit que existeix una correlació entre la temperatura i la supervivència de *Bacteroides*. En un d'ells es va analitzar la persistència del marcador de contaminació fecal humana HF183 present en aigua residual mitjançant PCR-Q. Es va diluir l'aigua residual en aigua de riu i es va mantenir en microcosmos al laboratori extraient mostres per a avaluar cada cert temps. El marcador va ser detectat durant 8 dies quan la mostra era mantinguda a 28°C. En canvi, es va detectar fins a 24 dies quan es mantenia a 4 i 12°C (Seurinck, S. et al, 2005a).

Un altre estudi va consistir en la detecció de *B. distasonis* (l'actual *Parabacteroides distasonis*) emprant tècniques moleculars. La metodologia de detecció es basava en una PCR utilitzant iniciadors específics i una hibridació sobre l'amplificat amb una sonda, també específica de *P. distasonis*. Es va detectar aquest microorganisme durant 14 dies a 4°C, durant 4-5 dies a 14°C, 1-2 dies a 24°C i 1 dia a 30°C (Kreader, C.A., 1998). Aquest estudi justifica una part de la inactivació per la depredació. Es va realitzar l'assaig d'incubació a 24°C paral·lelament amb un assaig utilitzant la mateixa aigua però en aquest cas esterilitzada per filtració i un altre que hi incorporava ciclohexamida (compost utilitzat per inhibir les cèl·lules eucariotes). En aquest cas es va detectar *P. distasonis* durant 10-12 dies més, que quan hi havia predadors a la mostra (Kreader, C.A., 1998).

Un tercer estudi (Okabe, S. et al, 2007b) també relaciona una baixada de la persistència amb un increment de temperatura quan analitza la persistència de *Bacteroides-Prevotella* mitjançant PCR-Q. En aquest cas es va diluir femtes en aigua de riu i es va mantenir l'experiment en microcosmos al laboratori a 4, 10, 20 i 30°C. També es va estudiar l'efecte de la salinitat sobre la persistència avaluant diferents concentracions salines (0, 10, 20 i 30 ppt). La variació deguda a diferències de salinitat no era tan obvia com amb la temperatura, però, mostrava una tendència a incrementar la persistència quan ho feia la salinitat. També es va avaluar aigua filtrada i no filtrada per tal d'observar el paper dels depredadors. Aquest estudi justifica la menor persistència de *Bacteroides* a elevades temperatures, a més del paper de la temperatura per si sola, per una major activitat dels depredadors a aquestes temperatures.

La majoria d'estudis duts a terme per tal d'observar la persistència al medi ambient, s'han realitzat mitjançant microcosmos o mesocosmos al laboratori (Anderson, K.L. et al, 2005; Okabe, S. et al, 2007b; Seurinck, S. et al, 2005a; Walters, S.P. et al, 2006) on les condicions poden estar més o menys controlades. Els anàlisis al laboratori permeten estudiar com actuen els diferents factors ambientals que influeixen en la supervivència, però no simulen el que passa realment al medi ambient. Al medi ambient hi intervenen un elevat número de factors i variables complexes i que interaccionen entre elles modulant la supervivència dels microorganismes al medi aquàtic.

La persistència dels microorganismes un cop s'ha produït un abocament dependrà principalment de la resistència del propi microorganisme, del paper dels microorganismes predadors, de les oscil·lacions de la temperatura, de la radiació a que pot estar sotmès, de la quantitat d'oxigen dissolt a l'aigua, de la deficiència de

nutrients, de la salinitat i dels processos físics de sedimentació, de l'adsorció a partícules i del flux hidràulic (Anderson, K.L. et al, 2005; Craig, D.L. et al, 2004; Gourmelon, M. et al, 1994; McFeters, G.A. et al, 1982; Menon, P. et al, 2003; Roslev, P. et al, 2004). Els factors més estudiats que hi intervenen es detallen a continuació.

5.1.2 Factors ambientals que intervenen en la persistència dels microorganismes

5.1.2.1 La temperatura

La temperatura és un dels principals factors que intervenen en la cinètica de vida dels microorganismes i un dels més estudiats. Tot microorganisme presenta: una *temperatura mínima* per sota de la qual és metabòlicament inactiu. A mesura que disminueix la temperatura s'alenteix el transport de nutrients a través de la membrana i la formació del gradient protònic (Madigan, M.T. et al, 1998), fins que arriba un moment que s'atura. Una *temperatura òptima* en la qual es produirà el màxim creixement. I una *temperatura màxima* per sobre de la qual les proteïnes, àcids nucleics i altres components cel·lulars es danyaran irreversiblement. Aquest rang de temperatura determina la supervivència en el medi ambient dels microorganismes.

S'han fet varis estudis per a conèixer els efectes de la temperatura en la persistència al medi d'*E. coli* i d'altres indicadors de contaminació fecal. Aquests estudis són molt heterogenis. Uns autors analitzen microcosmos al laboratori, d'altres en caixes al fons del mar, alguns utilitzen aigua estèril, solucions salines o diferents tipus d'aigües, d'altres ho fan en foscor eliminant possibles efectes de la llum solar (Foppen, J.W. et al, 2006). Per tant, aquests estudis són difícils de comparar i discernir quins efectes sobre la supervivència es deuen a la influència d'altres factors. Fins hi tot s'ha arribat a definir resultats contradictoris (Barcina, I. et al, 1997).

Un estudi avaluant la persistència d'*E. coli* en aigua de mar en microcosmos al laboratori indica que la capacitat de supervivència disminueix a mesura que incrementa la temperatura. Es va analitzar la inactivació d'*E. coli* a 10, 20 i 30°C i es va obtenir que el temps que trigava la població a disminuir un 90% la seva concentració (T_{90}) era entre 51,12 i 114,24 a 10°C, entre 26,88 i 52,28 hores a 20°C i entre 13,68 i 26,40 hores a 30°C (Craig, D.L. et al, 2004).

En un altre estudi es va analitzar *E. coli* i enterococs a dues temperatures diferents (20 i 14°C) simulant la temperatura de la superfície del mar a l'estiu i al hivern. Van determinar una T_{90} per *E. coli* de 109,7 h al hivern i de 76,7-79,4 hores a

l'estiu. Els enterococs presentaven una major persistència, una T_{90} de 143,9-177,1 h al hivern i de 115,1-121,2 h a l'estiu (Noble, R.T. et al, 2004). Els números poden diferir més o menys en altres estudis però aquesta tendència es manté: una major inactivació dels coliformes fecals que els enterococs; i una major inactivació a altes temperatures que a baixes temperatures on es mantenen més estables (Nasser, A.M. et al, 1993; Sinton, L.W. et al, 1994).

Com s'ha comentat, la supervivència de *Bacteroides*, un cop abandona l'aparell digestiu, també està lligada a la temperatura. Els valors publicats segueixen una mateixa tendència (major supervivència quan la temperatura és menor) tot i tenir valors numèrics diferents ja que s'han analitzat marcadors diferents amb metodologies diferents. A més a més, quan s'utilitzen diferents condicions existeixen moltes altres variables que poden interferir i que s'han de tenir en compte.

5.1.2.2 La presència de depredadors

Alguns autors han situat la depredació com el principal factor responsable de l'eliminació de la microbiota al·lòctona i de bacteris entèrics del medi aquàtic (Gonzalez, J.M. et al, 1992; Menon, P. et al, 2003). Fins hi tot alguns autors, han rellevat el paper de la temperatura pels depredadors, ja que han atribuït la inactivació, justificada per elevades temperatures, a una major activitat dels depredadors (Barcina, I. et al, 1997) quan aquesta s'incrementa.

En molts estudis de inactivació es realitza, paral·lelament a l'anàlisi, experiments utilitzant aigua estèril o amb substàncies que inhibeixen l'activitat de cèl·lules eucariotes (Flint, K.P., 1987; Foppen, J.W. et al, 2006; Kreader, C.A., 1998; Okabe, S. et al, 2007b), i així poder avaluar el paper dels depredadors.

Els principals microorganismes depredadors de bacteris són: protozous (principalment flagel·lats, però també ciliats i amebes), bacteris lítics com *Bdellovibrio* spp. i virus bacteriòfags (Barcina, I. et al, 1997). S'ha vist que *E. coli* i altres gram negatius són depredats més fàcilment que *Ent. faecalis*. S'ha postulat que es deu a la millor capacitat de digestió de la seva paret cel·lular que la formada per una capa gruixuda de peptidoglicà dels bacteris gram positius (Barcina, I. et al, 1997).

S'ha realitzat estudis per estudiar la mortalitat bacteris al·lòctons i bacteris fecals com *E. coli*, *Sal. typhimurium* i *Str. faecalis* en el medi aquàtic i avaluar si la inactivació era deguda a la predació. Per això es varen marcar els bacteris amb una molècula fluorescent i es va analitzar la seva disminució. Es va determinar que d'un 54 a un

99% d'inactivació de les bacteris es devia als efectes de la predació (Gonzalez, J.M. et al, 1992; Menon, P. et al, 2003).

Bacteroides també és susceptible a ser depredat. S'ha detectat una major supervivència del gènere quan es realitza l'experiment utilitzant aigua esterilitzada o que incorpora ciclohexamida. En un estudi analitzant la persistència a 10°C, quan s'analitzava aigua sense filtrar als 11 dies ja no es detectava *Bacteroides*; en canvi, quan s'analitzava aigua filtrada, als 16 dies la població havia disminuït quatre logaritmes però encara es detectava (Okabe, S. et al, 2007b). En un altre estudi es va detectar *P. distasonis* mitjançant PCR i hibridació durant 2 dies quan l'experiment es realitzava en aigua no filtrada mantinguda a 24°C i 14 dies quan s'utilitzava aigua filtrada per a dur a terme l'experiment (Kreader, C.A., 1998).

5.1.2.3 L'oxigen

L'oxigen és aportat a l'aigua a partir de l'atmosfera i de la fotosíntesis de les algues. La quantitat que resta dissolta a l'aigua dependrà de paràmetres físics com són la temperatura i la pressió parcial atmosfèrica (l'altitud) i de paràmetres biològics com la presència d'organismes fotosintètics o respiradors. Una diferència de temperatura pot fer variar significativament la concentració d'oxigen dissolt: de 11,25 mg/L a 10°C i 7,55 mg/L a 30°C en condicions estàndards (<http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/solutions/faq/predicting-DO.shtml>).

El gènere *Bacteroides* és anaeròbic però algunes espècies poden tolerar exposicions més o menys prolongades en ambients oxigenats. S'ha definit *B. fragilis* com un dels bacteris anaerobis més aerotolerants i que pot sobreviure fins 48-72h sense multiplicar-se en presència d'oxigen atmosfèric (Rocha, E.R. et al, 1996; Rolfe, R.D. et al, 1978). Fins hi tot s'ha postulat que *B. fragilis* es beneficia de concentracions nanomolars d'oxigen i creix millor amb un mínim d'oxigen a l'ambient (<5 µM d'O₂) (Baughn, A.D. et al, 2004).

En condicions d'aerobiosis es formen compostos anomenats espècies reactives de l'oxigen (ROS: Reactive Oxygen Species) com el ió superòxid. Els ROS provoquen danys a macromolècules: peroxidació de lípids de membrana, oxidació d'aminoàcids i proteïnes, destrucció d'enzims que presenten el grup ferro-sulfur i modificacions de bases d'ADN (Pan, N. et al, 2001). Per a evitar tots aquests danys, les cèl·lules han evolucionat creant enzims capaços de detoxificar aquests ROS. La superòxid bismutasa catalitza la detoxificació del ió superòxid a peròxid d'hidrogen i la catalasa catalitza la reacció de peròxid d'hidrogen a aigua i oxigen. S'ha descrit que *B. fragilis* i

P. distasonis tenen els enzims superòxid dismutasa i la catalasa, en canvi *B. thetaiotamicron*, *B. ovatus* i *B. eggerthi* presenten només la catalasa (Wilkins, T.D. et al, 1978).

En un estudi es va observar la persistència en aigua de beguda d'espècies de *Bacteroides* aïllades de femtes i es van comparar amb la persistència d'un cultiu pur de *B. fragilis*. Es va registrar una persistència de *Bacteroides* spp. de 4h a 24°C, que en canvi fou de 48 h quan s'analitzava la soca tipus. Aquesta diferència es va justificar pel fet que els aïllats clínics de *Bacteroides* són més resistents a la presència d'oxigen que no pas les soques aïllades de femtes (Savichtcheva, O. et al, 2005).

5.1.2.4 La radiació solar

La incidència de la radiació solar influeix negativament sobre la inactivació i la cultivabilitat d'algunes poblacions microbianes (Barcina, I. et al, 1997). La llum solar està formada per la llum ultraviolada (UV), la radiació de llum visible i la radiació infraroja. La radiació UV-B amb un espectre de 280-320 nm és la més bactericida ja que la seva emissió és prop del màxim d'absorció de l'ADN causant-l'hi directament dany fotobiològic (Atlas, R. et al, 2001). La llum visible (320-800 nm) també afecta la supervivència dels microorganismes creant formes reactives de l'oxigen per fotoxidació, principalment peròxid d'hidrogen i hidroxils radicals que danyaran les cèl·lules (Barcina, I. et al, 1997; Sinton, L.W. et al, 1999). Per tant, microorganismes que tenen enzims detoxificants d'aquests compostos seran més tolerants a la llum solar.

La radiació no afecta a tots els microorganismes per igual, s'ha vist que els enterococs en aigua de mar són més resistents a la radiació que els coliformes fecals i que la llum no afecta a microorganismes com *Vibrio anguillarum* o *Pseudomonas fluorescens* (Barcina, I. et al, 1997; Rozen, Y. et al, 2001).

Sembla que els efectes de la llum solar afecten més la capacitat de cultiu dels microorganismes, de manera que disminueix el número de cèl·lules cultivables però es manté el número de cèl·lules viables (Davies-Colley, R.J. et al, 1994; Gourmelon, M. et al, 1994). Per tal de comprovar els efectes de la llum sobre els microorganismes s'han aplicat paral·lelament, microcosmos sotmesos a la radiació i d'altres en fosc coberts amb diferents materials. S'ha detectat que cèl·lules d'*E. coli*, coliformes fecals i enterococs fecals mantingudes en els microcosmos coberts mantenen durant més temps la capacitat de poder ser cultivats (Gourmelon, M. et al, 1994; Sinton, L.W. et al, 1999; Sinton, L.W. et al, 2002).

5.1.2.5 Les sals, els nutrients, i el pH

Una elevada concentració de sals al medi produeix la deshidratació de les cèl·lules degut a un xoc osmòtic i altera l'estructura terciària de les proteïnes el que provoca la pèrdua de la seva activitat enzimàtica. I al contrari, la incubació de cèl·lules en un ambient hipotònic, pot provocar la ruptura de les cèl·lules degut a que les molècules d'aigua tendeixen a penetrar a l'interior de la cèl·lula. Els microorganismes toleren un determinat rang de salinitat segons les estratègies que hagin desenvolupat per fer front a condicions adverses, acumulant soluts a l'interior, bombejant aigua a l'exterior, etc. (Atlas, R. et al, 2001). Quan s'analitza la persistència d'*E. coli* en diferents concentracions salines s'observa que a mesura que incrementa la concentració de sals disminueix la capacitat de supervivència. Es va observar una supervivència del 8% de la població inicial quan es va incubar *E. coli* en aigua de mar (Rozen, Y. et al, 2001). Els enterococs sobreviuen millor en ambients salins que no pas *E. coli* (Anderson, K.L. et al, 2005). *Bacteroides* presenta menys sensibilitat a diferents concentracions salines, un estudi ha observat una supervivència lleugerament superior quan s'incrementava la salinitat de 0 a 30 ppt (Okabe, S. et al, 2007b).

La manca de nutrients que troba un microorganisme quan arriba al medi ambient oligotròfic limita la seva supervivència. Un estudi d'inactivació d'*E. coli* dut a terme en una zona on es rebia efluents d'una destil·leria de rom amb una elevada càrrega de carboni orgànic va demostrar que la inactivació era major quan s'aturava l'emissió del residu (Rozen, Y. et al, 2001).

Els microorganismes també presenten un determinat rang de pH entre el qual podran créixer. Aquest rang de pH acostuma a ser bastant ampli, per exemple *E. coli* pot créixer en un rang entre 5 i 9 unitats de pH però grans variacions poden alterar la membrana plasmàtica dels microorganismes i inhibir l'activitat de les proteïnes transportadores.

5.1.2.6 Sedimentació i adsorció a partícules

Quan els microorganismes arriben al medi aquàtic, estan sotmesos a un flux hidràulic que farà que es desplacin per l'aigua. Depenent de la velocitat de l'aigua i de la mida de partícules en suspensió on puguin quedar adsorbides les cèl·lules, aquests microorganismes poden sedimentar i quedar dipositats al fons del riu, del llac o del mar, romanent allí fins que determinats factors en permetin la resuspensió.

Diferents estudis han comparat la persistència dels indicadors fecals en la columna d'aigua i els sediments (Anderson, K.L. et al, 2005; Craig, D.L. et al, 2004). Aquests estudis han demostrat que les fines partícules de sediments protegeixen els microorganismes d'agents externs com la llum solar, baixes temperatures i contribueixen amb una aportació de matèria orgànica i inorgànica que es diposita al fons juntament amb els microorganismes. S'ha detectat cèl·lules cultivables d'*E. coli* durant com a mínim 28 dies en sediments de la costa (Craig, D.L. et al, 2004).

És important considerar aquests microorganismes que queden dipositats als sediments, ja que turbulències naturals, un període plujós o l'activitat d'oci humana poden comportar la resuspensió d'aquests microorganismes incrementant el risc de possibles gastroenteritis (Brownell, M.J. et al, 2007; Craig, D.L. et al, 2004).

Tots aquests factors fan que la inactivació al medi sigui un procés complex d'estudiar. Treballar en models *in situ* permet simular al màxim les condicions que es troben els bacteris entèrics quan són vessats al medi, però fa més difícil poder discernir quins són els factors que hi estan involucrats. En aquest estudi s'ha volgut conèixer la persistència de *Bacteroides* spp. ja que cada cop està prenent més importància com a indicador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua. Per això s'han establert els següents objectius:

1. Estudiar la inactivació de dues de les principals espècies que formen part de la microbiota intestinal humana: *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*, en aigua de riu *in situ* utilitzant tant metodologies moleculars com de cultiu.
2. Comparar la persistència de la soca tipus de *B. fragilis in situ* en dos condicions diferents: utilitzant aigua de riu en condicions naturals i aigua de riu autoclavada per tal d'avaluar l'efecte dels possibles predadors presents en l'aigua de riu.
3. Estudiar la persistència de *Bacteroides* spp. de l'aigua residual en aigua de riu *in situ*, per poder ser utilitzat com a indicador de l'origen de la contaminació fecal. Comparant-la amb la persistència d'altres indicadors de la contaminació fecal: els coliformes fecals i enterococs fecals de la mateixa aigua residual i les soques tipus esmentades.

4. Avaluació de l'efecte de la temperatura i dels depredadors sobre les soques *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* en microcosmos en condicions controlades al laboratori.

5.2 Materials i Mètodes

El treball experimental realitzat consta de dues parts ben diferenciades una primera que analitza la inactivació *in situ*, es a dir en les condicions naturals del riu, de diferents poblacions de *Bacteroides* spp. (les soques tipus: *B. fragilis* DSM 2151^T i *B. thetaiotaomicron* DSM 2079^T i soques ambientals de l'aigua residual). I una segona part que analitzarà l'efecte de la temperatura sobre les dues soques tipus de *Bacteroides* esmentades, amb i sense presència de depredadors, en condicions controlades i per tant prescindint dels altres factors que intervenen en el medi ambient.

5.2.1 Enumeració de *Bacteroides* utilitzant tècniques de cultiu

5.2.1.1 Enumeració amb el medi selectiu i diferencial BBE

S'ha utilitzat el medi BBE per tal de fer un seguiment de la dinàmica d'inactivació de *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* i de *Bacteroides* spp. presents a les femtes.

El medi BBE va ser descrit per a detectar i enumerar el grup de *B. fragilis*. És un medi selectiu i diferencial que conté bilis (Sigma, St. Louis, EUA), esculina (Sigma, St. Louis, EUA), citrat amònic fèrric (Sigma, St. Louis, EUA), hemina (Sigma, St. Louis, EUA) i gentamicina (Schering-Plough, Kenilworth, EUA) (Annex I) (Livingston, S.J. et al, 1978). Quan el medi s'incuba en les condicions adequades la majoria d'espècies de *Bacteroides* hi creixen i algunes degraden l'esculina formant colònies amb una coloració negrosa (Livingston, S.J. et al, 1978).

Prèviament, s'ha valorat la capacitat de creixement de 6 soques tipus de *Bacteroides* i una de *Parabacteroides* en aquest medi: *P. distasonis* (DSM 20701^T), *B. eggerthii* (DSM 20697^T), *B. fragilis* (DSM 2151^T), *B. ovatus* (DSM 1896^T), *B. thetaiotaomicron* (DSM 2079^T), *B. uniformis* (DSM 6597^T) i *B. vulgatus* (DSM 1447^T).

Per a l'anàlisi de la persistència del gènere *Bacteroides* s'ha fet dilucions seriades de cada mostra obtinguda (una mostra de cada diferent assaig per cada dia de mostreig (Aparat 5.2.6)) en Ringer ¼ (Oxoid) i s'ha sembrat 100 µl en el medi BBE. Les sèmres s'han incubat a 37°C durant 48 h en condicions d'anaerobiosis en un sistema GasPak (BBL) amb Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemanya) per tal de crear una atmosfera reductora adequada per al creixement de *Bacteroides*.

5.2.1.2 Enumeració amb el medi ric BPRM i hibridació amb la sonda Bac303

Tal i com s'ha comentat, en el medi ambient i degut a l'actuació de determinats factors adversos, com la irradiació, una manca de nutrients, un excés d'oxigen dissolt, etc. fa que les cèl·lules entrin en l'estat de VBNC. Aquestes cèl·lules danyades són més fàcilment recuperables quan s'utilitzen medis rics que incorporen tots els nutrients necessaris per al seu creixement i no contenen factors inhibidors com antibiòtics per a inhibir el creixement d'altres espècies.

En un estudi *in situ*, com el realitzat, els factors ambientals juguen un paper important, fent que les cèl·lules entrin en un estat que fa que siguin difícils de recuperar en un medi selectiu com el BBE. Per tant, paral·lelament a la sembra en medi selectiu s'ha realitzat el seguiment de la dinàmica d'inactivació amb el medi ric BPRM (*Bacteroides* Phages Recuperation Medium). Posteriorment s'han confirmat les colònies crescudes com a presumptes *Bacteroides* spp. mitjançant una hibridació amb una sonda específica del gènere.

El medi BPRM (Scharlau) és suplementat amb CaCl₂, hemina i NaCO₃ (Annex I). Aquest medi fou descrit per tal de millorar l'eficiència de recuperació de bacteriòfags de *B. fragilis* com a indicadors de contaminació fecal humana de mostres ambientals (Tartera, C. et al, 1992) i permet un bon creixement de *Bacteroides* spp. La descripció d'aquest medi inclou kanamicina (100 mg/l) i àcid nalidíxic (100 mg/l), però en aquest estudi s'ha prescindit de l'ús d'antibiòtics per tal de facilitar la recuperació de microorganismes en estat no cultivable.

Per tant, per tal de fer el seguiment de la dinàmica d'inactivació en un medi ric i per permetre la recuperació soques danyades, s'ha sembrat 100 µl de dilucions seriades de la mostra en Ringer ¼ (Oxoid) en plaques d'agar BPRM. Aquestes s'han incubat a 37°C durant 48 h en sistema GasPak (BBL) amb Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemanya) tal i com s'ha comentat al punt anterior.

5.2.2 Confirmació de presumptes *Bacteroides* mitjançant hibridació colonial

El medi BPRM, utilitzat sense antibiòtics, és un medi ric on poden créixer una gran majoria de bacteris anaerobis. Per diferenciar *Bacteroides* spp. de la resta de microorganismes que creixen al medi, s'ha utilitzat la tècnica d'hibridació colonial amb la sonda Bac303 (Manz, W. et al, 1996) específica del gen del 16S ARNr. La seqüència de la sonda Bac303 és:

5'-GAAGGTCCCCCACATTGG-3'

La sonda presenta una T_m de 58° C i una elevada similitud amb els gèneres *Bacteroides*, *Prevotella* i *Parabacteroides*, incorpora digoxigenina per tal de facilitar la immunodetecció de l'híbrid.

Una vegada enumerades les colònies d'anaerobis totals i anaerobis facultatius de bacteris presents a la mostra que creixen en BPRM s'ha realitzat la hibridació colonial. Mitjançant un contacte de membrana sobre la placa d'agar BPRM, s'han transferit les colònies crescudes en el medi a una membrana de niló Hybond N⁺ (Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Regne Unit) carregada positivament. A la cara de la membrana on hi ha les colònies s'ha afegit una colònia crescuda en placa de *B. fragilis* DSM2151^T com a control positiu i d'*E. coli* DH5 α com a control negatiu. A continuació s'ha realitzat el procés d'hibridació prèviament descrit en altres treballs (Garcia-Aljaro, C., 2004).

El protocol de lisi cel·lular que s'ha utilitzat ha estat:

- a. La membrana de niló sobre la qual han estat transferides les colònies s'ha col·locat sobre paper Whatman 3 MM saturat amb solució desnaturalitzant (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) (Annex II) i s'ha incubat durant 4 min a temperatura ambient. A continuació s'ha incubat 4 min més amb la mateixa solució a 80°C.
- b. S'ha transferit la membrana sobre un nou paper Whatman 3 MM saturat amb solució neutralitzant (Tris-HCl 1 M pH=7,4, NaCl 1,5 M) (Annex II) i s'ha incubat durant 4 min a temperatura ambient.
- c. S'ha realitzat un tractament amb Proteïnasa K per a eliminar les restes cel·lulars. Per això, s'ha afegit una concentració de 250 µg/ml de proteïnasa K (Merck, Darmstadt, Alemanya) en la solució de lisis (Tris-HCl 50 mM pH=8,5, EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, Na-lauril-sarcosina 1% p/v i) (Annex II). La membrana s'ha incubat durant 30 min a 37°C sobre paper Whatman 3 MM saturat amb la solució.
- d. S'ha assecat la membrana en un forn a 80°C durant 10 min.
- e. L'ADN ha estat fixat mitjançant una làmpada de llum ultraviolada (UV) durant 4 min per la cara de les cèl·lules i 2 min per la cara reversa.

Un cop fixat l'ADN o s'ha seguit el procés d'hibridació o s'ha guardat la membrana a 4°C embolcallada amb film transparent fins al moment de fer-ho.

El procés d'hibridació i detecció de la sonda marcada és el mateix que s'ha detallat a l'apartat 3.2.11 (dels punts g a la j) per les hibridacions utilitzades per a detectar espècies del gènere *Bifidobacterium*. S'ha utilitzat una concentració de 25 ng/ml de la sonda Bac303 marcada amb digoxigenina i una temperatura d'hibridació de 60°C. La detecció de la digoxigenina s'ha realitzat mitjançant el mateix Kit de detecció que anteriorment, però s'ha utilitzat el substrat CSPD (Disodium 3-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate) (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya) per a la fosfatasa alcalina. Quan aquest substrat és metabolitzat emet llum enlloc de produir un substrat d'un determinat color. Per tant, s'ha seguit el protocol esmentat a l'apartat 3.2.11 fins al punt en que s'afegeix el substrat (del punt k a l'o). El protocol seguit a partir de llavors es detalla a continuació.

- p. S'ha afegit una dilució 1:100 del substrat CSPD (Roche Diagnostics) en tampó 3 (0,5 ml per sobre de cada membrana). S'ha mantingut estàtica entre dos films a temperatura ambient durant 5 min.
- q. S'ha col·locat la membrana en una bossa de plàstic segellada i dins un cassette autoradiogràfic (Gevamatic AGFA). El conjunt ja s'ha incubat 10 min a 37°C.
- r. Per captar la senyal lumínica del substrat s'ha exposat la membrana a un film de radiografia (Curix RP2, AGFA-Geavert, Bèlgica) un mínim de 60 min. La reacció de la fosfatasa alcalina conjugada amb l'anticòs antidigoxigenina i el substrat CSPD emet llum que queda impresa al film en forma de taca negra.
- s. S'ha revelat del film radiogràfic amb solucions de revelat i fixació fotogràfiques (AGFA).

D'aquesta manera s'ha avaluat les 7 soques tipus de *Bacteroides* esmentades anteriorment per tal de comprovar l'especificitat de la hibridació; i posteriorment s'ha utilitzat per confirmar les colònies de *Bacteroides* presents a les mostres ambientals.

5.2.3 Avaluació dels medis BBE i BPRM i de la hibridació colonial

S'ha fet diferents assajos per comprovar si hi havia diferents eficiències de recuperació entre el medi selectiu i diferencial BBE i el medi ric BPRM. Per això s'ha fet un cultiu de la soca tipus de *B. fragilis* (DSM 2151^T) en brou BPRM (Annex I) i s'ha incubat en condicions d'anaerobiosis a 37°C. A les 24 hores s'ha fet una sembra de 100 µl de diferents dilucions en els medis BPRM i BBE. El cultiu s'ha mantingut durant

7 dies més a 37°C, per veure quin resultat s'obté quan el cultiu envelleix, i per tant les cèl·lules poden estar danyades. Passat aquest període s'ha fet noves sembres de diferents dilucions del cultiu.

Amb la mateixa finalitat, s'ha comparat les enumeracions obtingudes de l'anàlisi d'una mostra ambiental provinent d'aigua residual d'EDAR mitjançant el comptatge en el medi BBE i sobre BPRM i confirmació per hibridació colonial amb la sonda Bac303.

5.2.4 Detecció amb PCR i PCR-Q específiques del grup *Bacteroidetes*

La majoria de mètodes actuals que proposen *Bacteroides* com a indicador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua es basen en tècniques moleculars (Bernhard, A.E. et al, 2000b; Carson, C.A. et al, 2005; Kreader, C.A., 1995; Layton, A. et al, 2006; Okabe, S. et al, 2007a). Per tant, resulta també necessari observar quina és la persistència de *Bacteroides* a l'aigua mitjançant aquestes tècniques.

Per a la detecció de *Bacteroides* mitjançant tècniques moleculars s'ha realitzat l'extracció d'ADN de 200 µl de cada mostra (una mostra de cada assaig per cada dia de mostreig) mitjançant el Kit d'extracció QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya).

L'extracció d'ADN s'ha utilitzat per a realitzar una PCR convencional i un PCR-quantitativa.

5.2.4.1 Anàlisi mitjançant una PCR convencional

Per a la detecció de *Bacteroides* com a marcador molecular amb una PCR convencional s'ha utilitzat una reacció de PCR específica del grup Bacteroidetes descrita prèviament (Bernhard, A.E. et al, 2000a). Els iniciadors utilitzats, les condicions de la reacció i el programa d'amplificació es mostren respectivament a les Taules 5.1, 5.2 i 5.3. L'amplificació s'ha realitzat en un termociclador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn).

Taula 5.1 Iniciadors utilitzats per a la detecció del grup Bacteroidetes.

Diana	Iniciador	Seqüència 5'-3'	Tm	Amplificat
Grup de <i>Bacteroides-Prevotella</i>	Bac32F	AACGCTAGCTACAGGCTT	53°C	692
	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG		

Taula 5.2 Reactius i concentracions necessàries per a la reacció de PCR dels marcadors de Bacteroidetes.

Reactiu	Volum afegit	Concentració final
Tampó 10x ¹ (Eppendorf, Hamburg,	5 µl	1x
MgCl ₂ (25mM) (Eppendorf)	1 µl	500 µM
dNTPs (25mM) (Eppendorf)	0,4 µl	200 µM
Iniciadors (5µm)	2 µl	0,2 µM
Taq (5U/µl) (Eppendorf)	0,25 µl	1,25 U
ADN	2µl	
H ₂ O	37,35 µl	
Volum Total	50 µl	

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

Taula 5.3 Programa per a la reacció de PCR dels marcadors de Bacteroidetes.

	94° C	5 min
35 cicles	94° C	1 min
	65- 61°C*	1 min
	72° C	1,5 min
	72° C	7 min
	4°C	∞

*S'ha fet un anàlisi descendent ("touchdown") de manera que cada cicle de PCR disminueix 1°C la temperatura d'hibridació dels iniciadors fins a arribar a 61°C. La reacció s'ha mantingut a aquesta temperatura durant els següents 31 cicles.

La detecció dels fragments amplificats per PCR s'ha fet en un gel d'agarosa amb una concentració de l'1'5% en TBE 1x (Annex I). El gel s'ha tenyit en una solució de bromur d'etidi (Annex I) per tal de visualitzar i capturar la imatge de les bandes amplificades en un aparell ImageMaster (Pharmacia Biotech).

5.2.4.2 Anàlisi mitjançant una PCR quantitativa en temps real

Per a la detecció de *Bacteroides* spp. mitjançant una PCR-Q es va utilitzar la que presentava una millor eficiència i sensibilitat de les tres PCR-Q valorades en el capítol anterior on s'ha anomenat TaqMan 2 (Layton, A. et al, 2006). Aquesta tècnica ha estat utilitzada en aquest estudi per tal d'avaluar i quantificar la inactivació d'espècies

ambientals i soques tipus de *Bacteroides* spp. quan es troben al medi ambient. Els iniciadors i la sonda utilitzats, les concentracions dels reactius, el programa que s'ha utilitzat i les característiques de l'amplificació es detallen a l'apartat 4.2.4.1.

5.2.5 Enumeració de coliformes i enterococs fecals

Conjuntament amb l'anàlisi de la persistència d'espècies de *Bacteroides* en l'aigua residual, s'ha fet un seguiment de dos indicadors clàssics de la contaminació fecal: els coliformes fecals (CF) i els enterococs fecals (EF). L'avaluació dels indicadors de contaminació fecal s'ha fet utilitzant el mètode de la filtració per membrana (Annex I) (Clesceri, L.S., 1998). Aquest mètode consisteix en passar la mostra a través de filtres de membrana d'esters de cel·lulosa (Ez-Pak™ Membrane Millipore) amb un porus de 0,45 µm de diàmetre on quedaran retinguts els microorganismes. Per tal de comptabilitzar el número de microorganismes, s'ha filtrat 1 ml de diferents dilucions decimals seriadades de les mostres en Ringer ¼ (Oxoid, Hampshire, Eng.). El filtre s'ha incubat sobre el medi selectiu adequat. S'ha utilitzat el medi mFC agar (Difco, Le Pont de Claix, França) per als coliformes fecals que s'han incubat 44,5°C durant 24; i el medi mEA (Difco, Le Pont de Claix, França) per als enterococs fecals incubats a 37°C durant 48 h (Annex I).

El medi mFC conté, entre d'altres components: àcids biliars, lactosa i àcid rosòlic. Els coliformes fecals, en aquestes condicions fermenten la lactosa del medi, d'aquesta manera disminueix el pH i l'àcid rosòlic que actua d'indicador, vira de roig a blau (Grabow, W.O. et al, 2001). Per tant les colònies blaves en aquest medi ens indicaran el número de coliformes fecals a la mostra.

El medi mEA conté azida sòdica, component que inhibeix la citocrom oxidasa de bacteris Gram negatius però no afecta als enterococs, i també un indicador incolor, clorur de trifeníl-2,3,5 tetrazòlic, que quan és reduït pels enterococs dóna una coloració vermellosa. Posteriorment, cal una prova confirmativa de les colònies. El filtre amb les colònies crescudes es traspassa en el medi Bilis Esculina Agar (BEA) (Difco, Le Pont de Claix, França) i s'incuba a 44,5°C durant 1h. Els enterococs fecals degraden l'esculina present al medi a esculina formant un precipitat de color negre (Figueras, M.J. et al, 1998; Manero, A. et al, 1999). Per tant les colònies negres seran considerades com a enterococs fecals.

5.2.6 Assaigs de la persistència “in situ” en aigua de riu

El principal objectiu d'aquest estudi ha estat fer el seguiment de la dinàmica de *Bacteroides* spp. al medi ambient i conèixer la seva persistència. Amb aquesta finalitat s'ha valorat la seva dinàmica analitzant les mostres tant amb tècniques de cultiu com moleculars.

Aquests anàlisis consten de tres assaigs:

1. Un primer assaig consisteix en l'estudi de la inactivació de dues de les espècies més abundants de la microbiota intestinal humana: *Bacteroides fragilis* i *B. thetaiotaomicron* en aigua de riu *in situ*.
2. El segon assaig consisteix en la comparació de la persistència en aigua de riu *in situ* de *B. fragilis* en dos condicions diferents:
 - utilitzant aigua de riu en les condicions naturals
 - utilitzant aigua de riu autoclavada on s'elimina la presència de microorganismes depredadors
3. El tercer assaig consisteix en l'estudi de les poblacions de *Bacteroides* spp. que es troben en l'aigua residual en aigua de riu *in situ*. Paral·lelament a l'anàlisi de *Bacteroides* s'ha avaluat la inactivació dels dos principals indicadors de contaminació fecal: coliformes fecals i enterococs fecals. S'ha comparat la persistència al medi ambient d'aquestes soques naturals de l'aigua residual amb les soques tipus analitzades al assaig 1.

S'ha analitzat el creixement i la identificació dels presumptes *Bacteroides* spp mitjançant:

- el medi BBE (Livingston, S.J. et al, 1978) que és selectiu i diferencial per aquest gènere.
- el medi ric BPRM (Tartera, C. et al, 1992). S'han confirmat les colònies com possibles *Bacteroides* spp. mitjançant hibridació colonial amb una sonda específica del gènere.
- una PCR específica del grup Bacteroidetes (Bernhard, A.E. et al, 2000a)
- una PCR-Q específica del gènere avaluada al capítol 4 (Layton, A. et al, 2006)

Els assaigs d'inactivació de *Bacteroides* spp. *in situ* s'han dut a terme en una cubeta situada a l'entrada de la planta potabilitzadora d'Abrera (ATLL). En aquesta cubeta hi circula un flux continu d'aigua del riu Llobregat com la que entra a la planta

per a ser potabilitzada. Per tant, aquesta cubeta simula perfectament les condicions del riu. La cubeta incorpora sensors de temperatura, oxigen dissolt, pH, potencial redox i salinitat. Per tant s'ha registrat aquestes dades durant tot el procés experimental. S'han realitzat diferents assaigs.

1. El primer assaig ha consistit en l'avaluació de dues de les soques més abundants de la microbiota intestinal humana: *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*. El inòcul s'ha obtingut a partir d'un cultiu de les soques tipus *B. fragilis* (DSM 2151^T) i *B. thetaiotaomicron* (DSM 2079^T) que s'han descongelat i cultivat en brou BPRM 48h a 37°C tal com s'indica a l'apartat 2.2.2.1. S'ha fet una dilució 1:10 de cada inòcul en aigua de riu obtinguda de la cubeta de la planta potabilitzadora. S'ha anomenat assaig 1.a a l'assaig dut a terme amb *B. fragilis* i 1.b amb *B. thetaiotaomicron*.
2. En el segon assaig s'ha estudiat l'efecte dels depredadors sobre la inactivació de *B. fragilis*. Per tant, paral·lelament a l'assaig 1.a s'ha desenvolupat un segon assaig utilitzant aigua obtinguda de la cubeta que s'ha esterilitzat mitjançant un autoclau. S'ha realitzat una dilució 1:10 d'un cultiu de la soca tipus de *B. fragilis* (DSM 2151^T) tal com s'indica per l'assaig 1 i s'ha diluït en l'aigua de riu autoclavada.
3. El tercer assaig ha consistit en avaluar la persistència en el medi de soques ambientals de *Bacteroides* spp. en l'aigua residual i comparant-les amb els indicadors clàssics de contaminació fecal. Per a la preparació de l'experiment s'ha utilitzat aigua residual d'entrada de l'EDAR de Gavà com a aportació de les soques a analitzar. S'ha fet una dilució 1:50 de l'aigua residual en aigua de riu obtinguda de la cubeta de la planta potabilitzadora d'Abbrera.

Amb aquestes solucions s'ha omplert una bossa de diàlisis, amb la suspensió bacteriana corresponent, per cada dia de mostreig i per cada un dels assaig a analitzar. De manera que cada dia de mostreig s'agafava una bossa de diàlisis per cada un dels quatre assaigs descrits (1.a, 1.b, 2 i 3). Aquestes bosses de diàlisis s'han preparat a partir de membranes de diàlisi (Medicell Dialysis Tubing Visking, London, Regne Unit). Les membranes de diàlisi són tubs elàstics fets de cel·lulosa formant una malla semipermeable amb un porus entre 12 i 14 KDa. Per tant, permeten que els soluts i l'aigua difonguin la membrana sempre a favor d'un gradient de concentració. Així que, el sistema pot respondre als canvis físics i químics que esdevenen al medi

que l'envolta, la concentració de sals de dins les bosses serà la mateixa que la del riu, però no hi entraran ni sortiran cèl·lules.

Abans de poder ser utilitzades les membranes han estat rentades per eliminar el glicerol que porten com humectant i altres impureses que poden obstruir els porus. Per aquest procés s'ha seguit les instruccions del fabricant (Annex II):

→ Les membranes s'han bullit durant 10 min en una solució de rentat de bicarbonat sòdic al 2% i EDTA 1 mM pH 8.

→ Posteriorment s'han rentat amb aigua bidestil·lada.

→ Finalment s'han bullit durant 10 min en una solució d'EDTA 1 mM i pH 8 (Sambrook, J. et al, 2001). S'han mantingut en aquesta dilució a 4°C fins al moment de ser utilitzades (un temps màxim de 6 mesos).

Les membranes plenes de la mostra corresponent, s'han dipositat en una gàbia per tal d'evitar agressions de partícules grolleres que poguessin malmetre les membranes. I la gàbia s'ha submergit a la cubeta de la planta potabilitzadora a una distància d'uns 20 cm de la superfície (Fig. 5.1).

Figura 5.1 Cubeta de la planta potabilitzadora d'Abrera on s'ha efectuat l'experiment d'inactivació *in situ*.



Durant 1 o 2 setmanes s'ha recollit diàriament una bossa de diàlisis per cada assaig. I s'han realitzat set assajos: 2 temporades d'hivern, 1 de primavera i 4 a l'estiu per tal de poder observar els factors relacionats amb l'estacionalitat (Fig. 5.2).

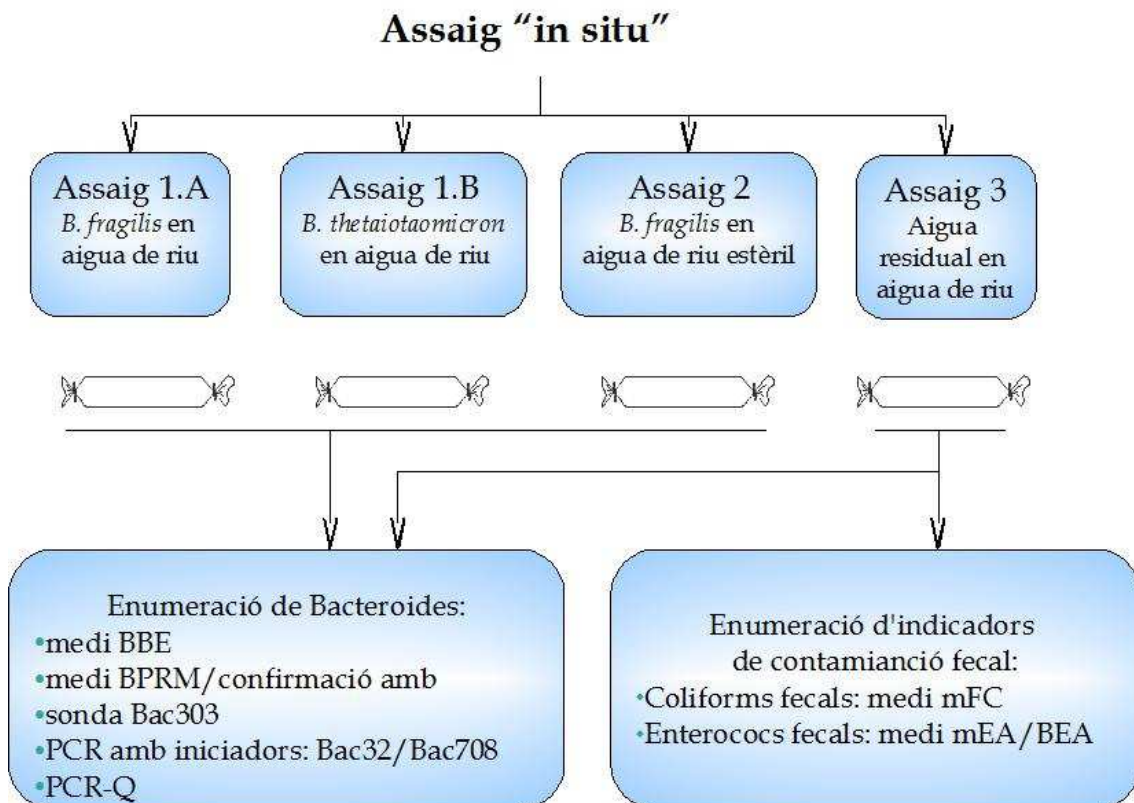
Figura 5.2 Campanyes de mostreig realitzades per a l'experiment d'inactivació *in situ*.

Hivern 1	Hivern 2	Primavera	Estiu 1	Estiu 2
06/02/06- 17/02/06	20/02/06- 01/03/06	20/03/06- 29/03/06	05/07/05- 11/07/05	18/07/05- 25/07/05
			Estiu 3	Estiu 4
			04/07/06- 12/07/06	19/07/06 25/07/06

S'ha fet els anàlisis pertinents segons els objectius a valorar a cada assaig estudiat (Fig. 5.3):

→ Als assaigs 1.a, 1.b i 2 s'ha enumerat: *Bacteroides* spp. (medi BBE, BPRM i hibridació colonial, PCR i PCR-Q).

→ A l'assaig 3 s'ha enumerat: coliformes fecals (medi mFC), enterococs fecals (medi mEA i BEA) i *Bacteroides* spp. (medi BBE, BPRM i hibridació colonial, PCR i PCR-Q).

Figura 5.3 Esquema dels experiments d'inactivació realitzats *in situ*.

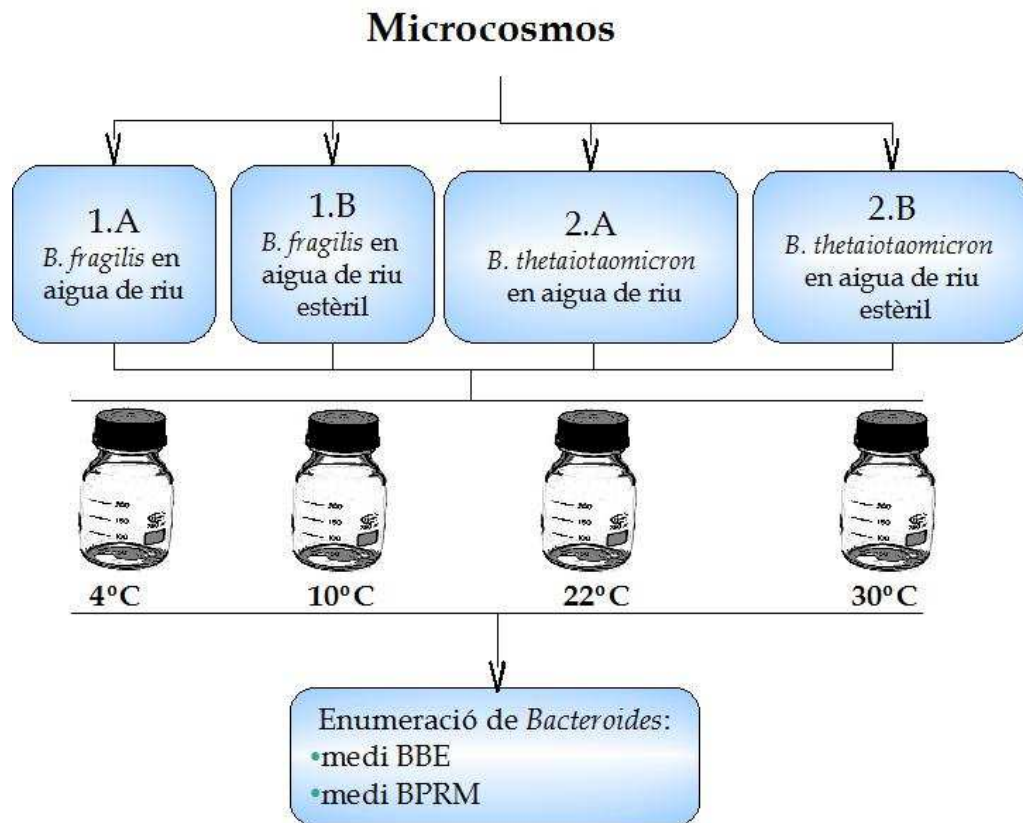
5.2.7 Assaigs de persistència en microcosmos (model experimental)

Els experiments *in situ* permeten simular les dificultats que troba un microorganisme quan passa del seu medi habitual, en aquest cas l'aparell digestiu humà, al medi ambient. L'elevada diversitat de factors als quals és sotmès, fa difícil de saber quins són els factors que més influeixen en la seva inactivació. Per tant, els microcosmos incubats al laboratori ens permeten controlar més fàcilment determinats paràmetres. En aquest cas s'ha tingut en compte la temperatura, la presència de depredadors i l'espècie de *Bacteroides* a analitzar alhora d'avaluar la persistència.

Per a avaluar la persistència de *B. fragilis* (DSM 2151^T) i *B. thetaiotaomicron* (DSM 2079^T) en condicions controlades s'ha fet diferents assaigs en microcosmos en ampolles estèrils. Les suspensions bacterianes s'han dut a terme a partir d'un cultiu de les soques esmentades crescudes en brou BPRM tal com s'ha indicat a l'apartat 2.2.2.1. S'ha fet una dilució 1:10 de cada cultiu bacterià en aigua de riu o en aigua de riu esterilitzada a l'autoclau. Així doncs, s'ha obtingut 4 suspensions: *B. fragilis* en aigua de riu (1.A), *B. fragilis* en aigua de riu estèril (1.B), *B. thetaiotaomicron* en aigua de riu (2.A) i *B. thetaiotaomicron* en aigua de riu estèril (2.B). S'ha distribuït 200 ml de cada suspensió en ampolles de vidre estèrils per cada temperatura a què es volia dur a terme l'assaig: 4°C, 10°C, 22°C i 30°C. Les ampolles s'han tancat de manera que no pogués difondre partícules a l'interior però sí l'oxigen i s'han incubat en cambres d'incubació i refrigeració amb les temperatures esmentades. A la vegada s'ha fet un seguiment de l'aigua de riu sense inocular per tal descartar possibles efectes de la microbiota autòctona del riu.

Cada 24 h, en condicions d'esterilitat, s'ha obtingut una alíquota per tal d'observar la inactivació de les dues espècies.

El seguiment de les poblacions de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* dels microcosmos, s'ha fet mitjançant tècniques de cultiu. S'ha efectuat l'enumeració en el medi selectiu i diferencial BBE i en el medi ric BPRM (Apartat 5.2.1) de diferents dilucions en Ringer ¼ de les alíquotes obtingudes tal com s'esquematitza a la figura 5.4.

Figura 5.4 Esquema dels experiments d'inactivació realitzats en microcosmos al laboratori.

5.2.8 Càlcul de la inactivació i anàlisi dels valors

El principals valors a tenir en compte a l'hora de valorar la inactivació de les poblacions bacterianes són: la constant d'inactivació K_s i la T_{90} . La K_s indica la taxa de disminució de la població al llarg del temps. La T_{90} indica el temps necessari perquè es produeixi la inactivació del 90% de la població inicial, o dit d'una altra manera, que hi hagi una disminució d'una unitat logarítmica de la població.

Per a valorar la dinàmica d'inactivació de les poblacions bacterianes estudiades s'ha analitzat la seva supervivència en el temps mitjançant l'enumeració en els diferents medis i la seva detecció i enumeració amb la PCR i PCR-Q. Una vegada obtinguts els recomptes s'ha efectuat models lineals de cada una de les poblacions bacterianes estudiades. S'ha fet el seguiment de la disminució de la població fins que hi ha hagut una caiguda d'uns 2 logaritmes o fins a unes 96 h. Aquests criteris s'han seguit sobretot a l'estiu que degut a l'elevada temperatura les membranes comencen a danyar-se a partir de les 72-96 h afectant la permeabilitat i per tant la supervivència de les poblacions.

La dinàmica d'inactivació de les poblacions no té perquè seguir un model lineal. S'ha elegit aquest model per poder simplificar i unificar la inactivació de les diferents poblacions. Si s'utilitza el mateix model es pot comparar les diferents taxes d'inactivació entre les diferents poblacions estudiades i les metodologies analitzades.

Per tal de desenvolupar el models lineals s'ha utilitzat la reducció logarítmica de les poblacions respecte el temps de l'inici de l'experiment. A partir de la relació s'ha obtingut una recta de regressió amb un valor inicial igual a zero ja que la inactivació és nul·la al moment que s'ha iniciat l'experiment.

Al panell 5.1 es mostra com a partir de la recta de regressió obtinguda dels models lineals d'inactivació s'obté la constant d'inactivació i la T_{90} de les poblacions.

Panell 5.1

Càlcul de la K_s i de la T_{90}

Els models lineals obtinguts a partir de la gràfica d'inactivació de les diferents poblacions bacterianes estudiades permeten l'obtenció la recta de tendència del model. Aquesta recta depèn de la relació entre la reducció logarítmica i el temps de realització de l'experiment i presenta aquesta forma:

$$\log(N_T - N_0) = -m \cdot T$$

on N_T és el número de cèl·lules al temps T , N_0 el número de cèl·lules al moment inicial de l'experiment i la pendent de la recta (m) equival a la constant d'inactivació (K_s).

La T_{90} representa el temps necessari per a que es produeixi una disminució del 90% de la població, es a dir, una reducció d'una unitat logarítmica ($\log(N_T - N_0) = -1$).

$$T_{90} = \left(\frac{-1}{-K_s} \right)$$

S'ha utilitzat el programa Statgraphic plus versió 5.0. per tal d'avaluar quins han estat els factors ambientals (temperatura, oxigen dissolt, efecte dels depredadors) que més han intervingut en la persistència de les poblacions analitzades.

5.3 Resultats

5.3.1 Valoració del medi BBE, BPRM i hibridació colonial

El medi BBE fou definit per tal de seleccionar i identificar presumptivament espècies de l'antigament anomenat: grup de *B. fragilis* (Livingston, S.J. et al, 1978). Aquest grup el constituïen: *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. distasonis*, *B. vulgatus* i *B. ovatus*. Prèviament a l'anàlisi de la persistència, s'ha volgut valorar la capacitat de creixement de 6 soques tipus de *Bacteroides* i *P. distasonis* en aquest medi i comparar-la amb el medi ric BPRM. També s'ha valorat la capacitat de detecció d'aquestes espècies mitjançant la sonda Bac303 (Manz, W. et al, 1996). Tal com s'indica a la taula 5.4, no totes les espècies es comporten igual, les colònies de *B. uniformis* i *B. vulgatus* no presenten la coloració negra característiques del gènere *Bacteroides* en aquest medi; en canvi, totes les espècies poden créixer sobre el medi BPRM i ser detectades mitjançant la hibridació colonial (HC).

Taula 5.4 Detecció de les soques tipus de diferents espècies de *Bacteroides* amb les tècniques de cultiu utilitzades en l'anàlisi de persistència

	Creix. en BBE	Colònies negres	Creix. en BPRM	Detecció amb Bac303
<i>P. distasonis</i> (DSM 20701 ^T)	si	si	si	si
<i>B. eggerthii</i> (DSM20697 ^T)	si	si	si	si
<i>B. fragilis</i> (DSM 2151 ^T)	si	si	si	si
<i>B. ovatus</i> (DSM 1896 ^T)	si	si	si	si
<i>B. thetaiotaomicron</i> (DSM 2079 ^T)	si	si	si	si
<i>B. uniformis</i> (DSM 6597 ^T)	si	no	si	si
<i>B. vulgatus</i> (DSM 1447 ^T)	si	no	si	si

Les cèl·lules danyades poden no ser recuperades quan existeixen factors inhibidors del creixement, com és el cas del medi BBE, però si en un medi ric com el BPRM. S'ha valorat si aquests factors poden influir en el número de cèl·lules recuperades en el medi BBE.

Quan s'analitza la sembra de diferents dilucions d'un cultiu de 24 h en brou BPRM de *B. fragilis* en els medis BPRM i BBE, s'observa un recompte lleugerament superior en el medi ric (Taula 5.5). En canvi, si es sembra el mateix cultiu que ha estat incubat durant 168 hores, la diferència es fa més gran i en el medi BBE es recupera un

número significativament menor de les cèl·lules que es recuperen en el medi BPRM (un 26%).

Taula 5.5 Recòmptes d'un cultiu de *B. fragilis* incubat durant 24 i 168 h en els medi BBE i BPRM.

temps incubació	BPRM (UFC/ml)	BBE (UFC/ml)
24 h	$2,02 \cdot 10^9$	$1,65 \cdot 10^9$
168 h	$9,6 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$

Per tal d'observar quina és la recuperació quan s'analitza una mostra ambiental, s'ha comparat el comptatge de colònies en el medi BBE amb les colònies positives per la sonda Bac303 sobre BPRM d'una mostra d'aigua residual d'EDAR. El 94,6% de les bacteris anaerobis i aerobis facultatius calculats a partir del medi BPRM ($1,06 \cdot 10^7$ UFC/100ml) han hibridat amb la sonda ($4,35 \cdot 10^6$ UFC/100ml). Mentre que quan s'ha sembrat la mostra en el medi BBE han crescut $3 \cdot 10^5$ UFC/100ml, el que representa un 82,4% del total de presumptes *Bacteroides* aïllats en BPRM i confirmats amb la HC.

5.3.2 Valoració de la inactivació natural del gènere *Bacteroides* "in situ" mitjançant tècniques moleculars i medis selectius

Tal i com s'ha descrit en l'apartat 5.2.6 de Materials i Mètodes s'ha dividit l'estudi de la persistència de *Bacteroides in situ* en aigua de riu en tres assaigs diferents per observar la persistència de *B. fragilis* (amb o sense la presència de depredadors), *B. thetaiotaomicron* i *Bacteroides* spp. de l'aigua residual.

S'ha realitzat 7 campanyes de mostreig: 4 a l'estiu, 2 al hivern i 1 al final de l'hivern que s'ha anomenat primavera. Les dades registrades dels factors ambientals que han intervingut en l'experiment *in situ* es detallen a la taula 5.6. Aquestes dades s'han registrat diàriament entre les 10 i les 11 del matí, que correspon a l'hora en que han estat recollides les mostres.

Tot i que els assaigs realitzats a l'estiu s'hagin practicat durant la mateixa època (juliol) però en dos anys consecutius presenten unes dades bastant heterogènies. Els estius 1 i 2 mostren una temperatura de l'aigua bastant elevada (que ha oscil·lat entre 27,3 i 32,6°C, a l'hora en que es va realitzar el mostreig), en canvi durant l'estiu 3 i estiu 4 s'ha registrat una temperatura més moderada (entre 21,6 i 23,4°C). Al hivern s'ha registrat un interval de temperatures entre 5 i 9°C i a la primavera una temperatura intermèdia de 13,9-15,2°C.

Taula 5.6 Valors mitjans de temperatura, oxigen dissolt, pH i conductivitat registrats a la cubeta on s'ha realitzat l'anàlisi de persistència *in situ*. Entre parèntesi s'indica el rang dels valors registrats al llarg de la campanya de mostreig.

	Temperatura (°C)	Oxigen dissolt (ppm)	pH	Conductivitat (mS/cm)
Estiu 1	29,40	7,23	8,23	1,52
	(27,3-32,6)	(6,2-9,4)	(8,02-8,5)	(1,02-1,69)
Estiu 2	29,62	5,70	7,84	1,46
	(29,2-30,3)	(5-6,8)	(7,74-8,05)	(1,31-1,83)
Estiu 3	22,33	3,75	8,07	1,54
	(21,8-23)	(3,3-4)	(7,98-8,19)	(1,5-1,58)
Estiu 4	22,87	3,53	7,99	2,52
	(21,6-23,4)	(3,1-3,9)	(7,78-8,13)	(1,95-3,19)
Primavera	14,22	7,30	8,16	1,84
	(13,9-15,2)	(7-7,8)	(8,06-8,25)	(1,8-1,95)
Hivern 1	6,29	8,59	8,55	1,28
	(5-8)	(8,4-8,7)	(7,87-8,69)	(1,11-1,38)
Hivern 2	8,36	8,70	8,3	1,55
	(7,5-9)	(8,6-8,9)	(8,43-8,61)	(1,49-1,59)

Pel que fa a la concentració d'oxigen dissolt, s'observa una elevada diferència entre els diferents assajos, registrant-se les concentracions més baixes a l'estiu 3 i 4 (entre 3,1 i 4 ppm) i més altes durant els hiverns 1 i 2 (entre 8,4 i 8,9). Durant l'estiu 1 i 2 s'observa uns valors d'oxigen dissolt més pròxims als observats a baixes temperatures que no pas als assaigs de l'estiu 3 i 4, amb una oscil·lació que va entre 6,2 i 9,4 ppm. En l'assaig que es va dur a terme a finals de l'hivern (primavera), alguns factors ambientals, com la temperatura i oxigen dissolt, presenten uns valors intermedis entre les dos estacions.

Els valors de pH i conductivitat no manifesten diferències en funció de l'estacionalitat i mostren una variació entre 7,4 i 8,69 i 1,02 i 3,19 mS/cm, respectivament. La conductivitat de l'estiu 4 sembla ser lleugerament superior a la resta, amb una mitja de 2,52 mS/cm, mentre que la resta es mantenen entre 1,28 i 1,89.

5.3.2.1 Assaig 1: Anàlisi de la persistència de les soques tipus *Bacteroides fragilis* i *B. thetaiotaomicron* "in situ" en aigua de riu

En aquest assaig s'ha analitzat la persistència al medi aquàtic de dos soques tipus: *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* amb el medi selectiu BBE, el medi ric BPRM i

confirmació amb la hibridació colonial (BPRM/HC) i tècniques moleculars: PCR convencional i PCR-Q pel gènere *Bacteroides*. Diàriament s'ha mostregat una bossa de diàlisi amb la mostra pertinent i s'ha fet un seguiment de la disminució de les dues poblacions.

A les taules 5.7.a i 5.7.b es mostren les enumeracions expressades amb unitats logarítmiques i s'observa la disminució de la població de *B. fragilis* analitzada mitjançant els medis BBE i BPRM/HC. El número de cèl·lules inicial és bastant semblant entre les diferents estacions i entre els dos mètodes de detecció utilitzats, sent el comptatge més baix de 8,02 unitats logarítmiques/100 ml i el més alt de 9,90 unitats logarítmiques/100 ml. Amb excepció dels números obtinguts durant l'hivern 1 que han resultat més baixos dels esperats.

El seguiment de la dinàmica de *B. fragilis* amb el comptatge en el medi BBE (Taula 5.7.a), mostra durant l'estiu una disminució moderada durant les primeres 24 h i una disminució més brusca a partir de les 48 h; a excepció de l'estiu 3 que mostra una disminució brusca ja, a les 24 h. Durant l'hivern 2 i la primavera s'ha produït una disminució més gradual fins a les 48-72h, a partir de les quals, s'ha esdevingut, també, una forta davallada de la població. A la figura 5.5.a es mostra la gràfica d'inactivació on s'observa una certa tendència a persistir millor durant les estacions amb més baixes temperatures. La gràfica d'inactivació de *Bacteroides* mitjançant el seguiment amb el medi BPRM/HC mostra també, aquesta tendència però no tan pronunciada (Fig. 5.5.b). Estiu 4 i hivern 2 es comporten d'una manera semblant amb uns valors intermedis a la resta d'assaigs. Els recomptes utilitzant BPRM/HC sempre són superiors als observats en el medi BBE.

Els comptatges de *B. thetaiotaomicron* es mostren a les taules 5.7.c i 5.7.d. La població inicial en la majoria de casos supera o està pròxima a les 9 unitats logarítmiques/100 ml, tant en els anàlisis per les diferents estacions com pels diferents mètodes de detecció. Tan sols a l'estiu 2 s'ha comptat un número més baix que correspon a 7,96 unitats logarítmiques/100ml.

Taules. 5.7 Recòmptes en unitats logarítmiques de l'experiment d'inactivació de *B. fragilis* (Bloc 1.a) i de *B. thetaiotaomicron* (Bloc 1.b) en els medi BBE (taula a i c) i en el medi BPRM amb hibridació colonial (taula b i d).

a. BBE *B. fragilis*

	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	8,63	9,39	8,72	8,82	8,02	<6	9,27
24	7,99	8,25	5,60	8,68	7,63	<6	8,12
48	4,06	5,76	4,73	5,39	7,56	<4	7,43
72	3,48	4,00	-	4,58	4,08	3,47	n.d
96	<3	3,88	3,81	-	<3	<3	<3

b. BPRM/HC de *B. fragilis*

	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	-	-	8,76	9,38	8,57	6,60	9,90
24	-	-	9,80	9,46	8,08	6,54	9,01
48	-	-	7,53	8,00	8,84	6,28	8,79
72	-	-	7,30	-	8,18	-	8,26
96	-	-	-	8,09	7,78	-	7,46
144	-	-	-	-	-	6,63	-
168	-	-	-	7,57	-	6,41	-

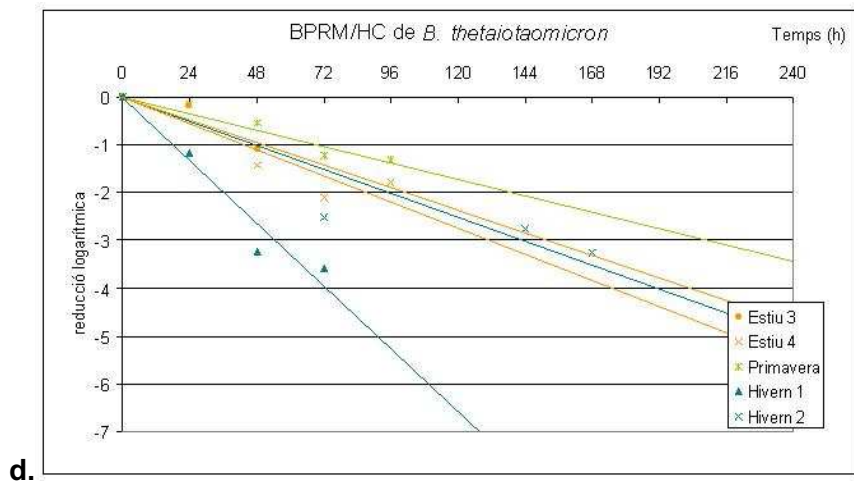
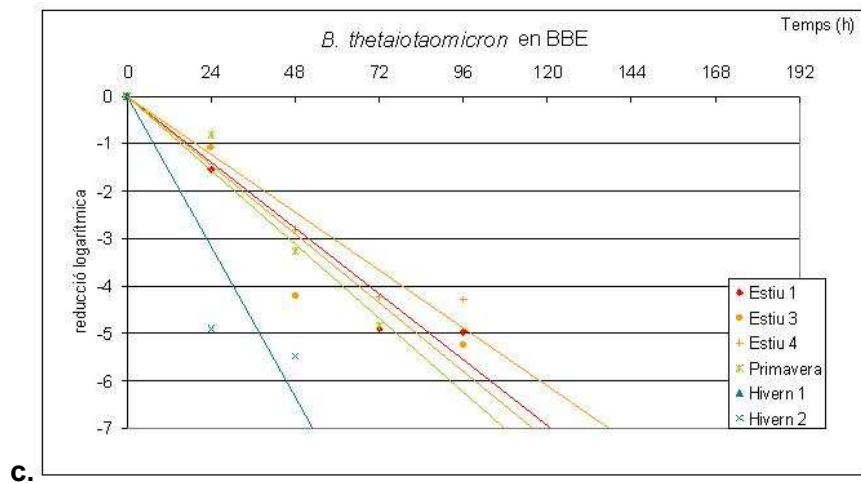
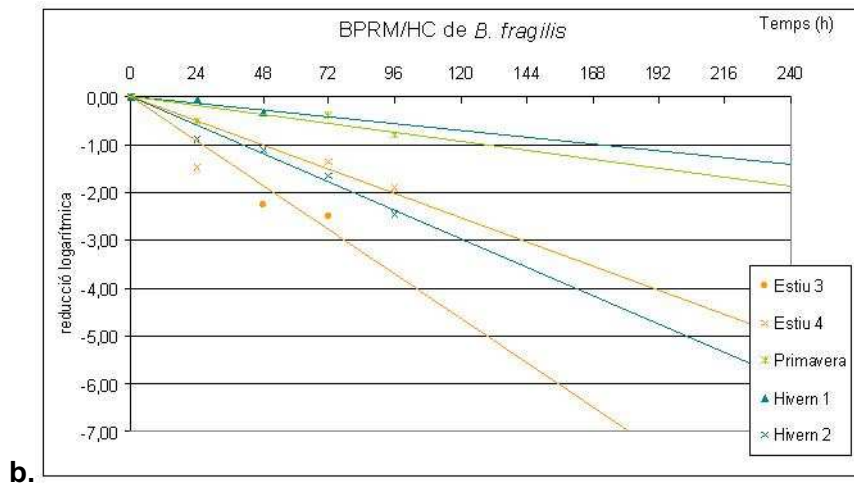
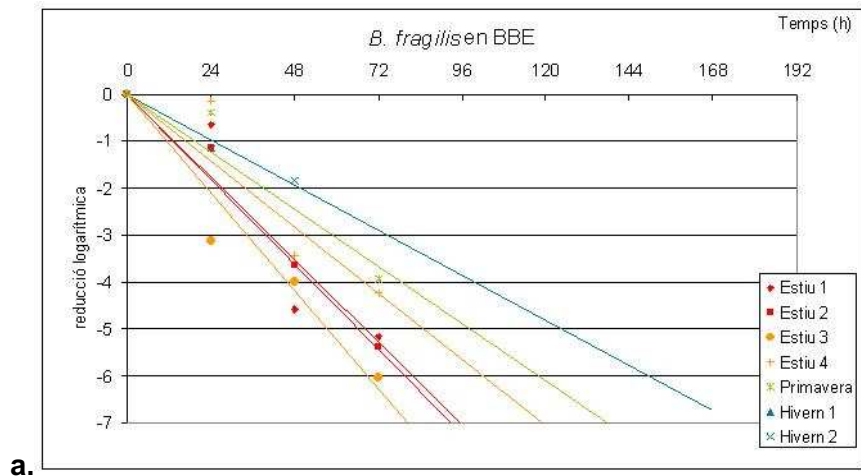
c. BBE *B. thetaiotaomicron*

	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	8,87	7,96	9,15	9,44	9,16	9,16	9,05
24	7,31	5,04	8,08	5,88	8,35	<7	4,15
48	-	-	4,93	-	5,89	<5	3,56
72	3,95	4,00	n.d.	5,20	4,32	<3	<3
96	3,90	3,88	3,90	5,16	<3	<3	<3

d. BPRM/HC *B. thetaiotaomicron*

	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	-	-	9,32	9,78	9,61	9,72	9,88
24	-	-	9,15	9,62	-	8,56	7,20
48	-	-	8,23	8,36	9,08	6,48	-
72	-	-	-	7,66	8,40	6,15	7,36
96	-	-	-	-	8,30	-	-
144	-	-	7,56	-	-	-	7,11

Figures 5.5 Models lineals de les cinètiques d'inactivació de *B. fragilis* en medi BBE (a.), en BPRM/HC (b.), *B. thetaiotaomicron* en BBE (c.) i en BPRM/HC (d.).



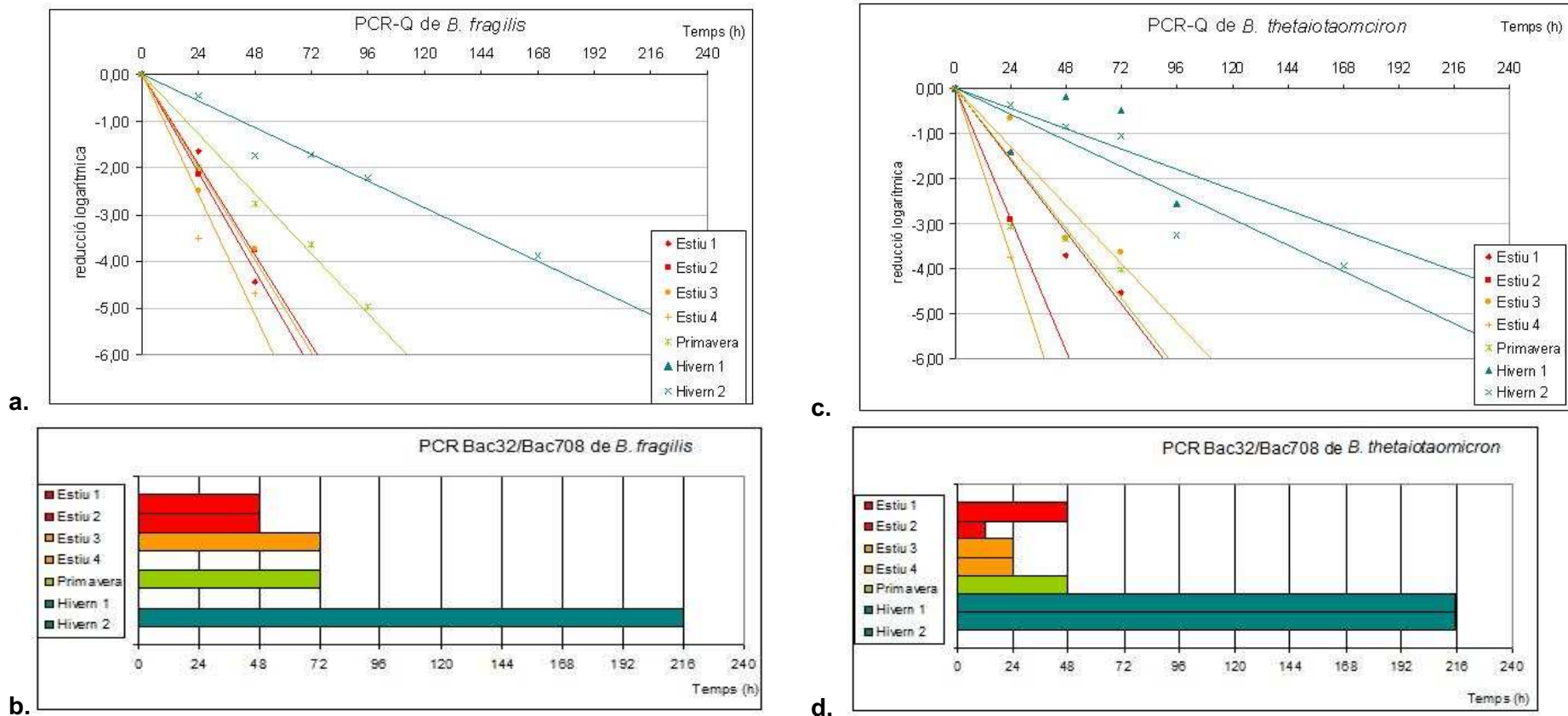
B. thetaiotaomicron mostra una forta disminució de la persistència a les 24-48h durant els assaigs realitzats amb el medi BBE en totes les estacions (Taula 5.7.c). Aquesta disminució sembla més acusada durant l'hivern tal com s'observa a la gràfica d'inactivació, el contrari de la tendència observada en *B. fragilis* (Fig. 5.5.c). Tant utilitzant el medi BBE com BPRM/HC la dinàmica de la població durant la primavera es més semblant a com es comporten durant l'estiu. El decreixement de la població *B. thetaiotaomicron* observada amb el mètode BPRM/HC és menys pronunciat que pas la que es revela en el medi BBE, però mostra la mateixa tendència (Fig 5.5.d). S'ha produït una disminució d'un log en 48-72h a l'estiu i en 24 h o menys durant l'hivern (Taula 5.7.d).

El temps durant el qual es pot detectar el material genètic utilitzant els iniciadors Bac32/Bac708 específics del gènere *Bacteroides* es mostra a la figura 5.6.b per *B. fragilis* i 5.6.d per *B. thetaiotaomicron*. La persistència de l'ADN de *B. fragilis* al medi ambient és entre 48 i 72 h a l'estiu i de més de 216 h durant l'hivern. Durant la primavera mostra un comportament més semblant a l'estiu. La persistència de *B. thetaiotaomicron* és lleugerament més baixa; l'ADN pot ser detectat durant les primeres 12 i 48 h a l'estiu i 48 h a la primavera. Al hivern s'ha detectat l'ADN durant les 216 h en que s'ha dut a terme l'experiment.

Per als recomptes obtinguts utilitzant la PCR-Q s'ha utilitzat com a corba estàndard la relació entre C_T i les cèl·lules crescudes en el medi BPRM (veure apartat 4.3.1). Quan s'analitza la disminució de les poblacions mitjançant la PCR-Q específica de *Bacteroides*, també s'observa l'efecte de la temperatura, i la inactivació és semblant en ambdós espècies analitzades (Taula 5.8.a i 5.8.b). Durant l'estiu, a les 48 h hi ha hagut una disminució de més de 3 unitats logarítmiques tant en la població de *B. fragilis* com de *B. thetaiotaomicron*. Durant la primavera la baixada és més gradual i no tant ràpida; i durant l'hivern la disminució és molt més lenta; a les 48 h, la població de *B. fragilis* ha minvat 1,74 unitats logarítmiques i la de *B. thetaiotaomicron* 0,85 unitats logarítmiques (Fig. 5.6.a i b)

A partir dels models lineals de les gràfiques d'inactivació s'ha obtingut una recta de regressió per cada paràmetre observat i per cada assaig. La pendent de la recta de regressió és la constant d'inactivació (K_s) i juntament amb la R^2 obtinguda es mostra a la Taula 5.9. A partir de la K_s s'ha calculat els temps d'inactivació del 90% de la població (T_{90}) tal com s'indica al panell 5.1 de l'apartat 5.2.8 que es mostra a la taula 5.10.

Figura 5.6 Models d'inactivació obtinguts de l'anàlisi de la població de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* mitjançant PCR-Q (a. i c. respectivament) i detecció amb els iniciadors Bac32/Bac708 de (b. i d.).



Taula 5.8 Recomptes de la població de *B. fragilis* (bloc 1.a) i *B. thetaiotaomicron* (bloc 1.b) mitjançant PCR-Q.

BBE <i>B. fragilis</i> en aigua estèril							
a.	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	9,59	8,69	9,27	9,71	9,21	-	9,97
24	7,93	6,71	6,98	6,46	7,21	-	9,52
48	5,15	5,21	5,84	5,36	6,43	-	8,23
72	5,04	4,96	-	5,37	5,56	-	8,25
96	4,88	-	-	5,70	4,23	-	7,76
168	-	-	-	-	-	-	6,08

BPRM/HC <i>B. fragilis</i> en aigua estèril							
b.	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	9,48	8,82	8,88	9,50	9,50	9,62	9,90
24	8,05	5,89	8,23	6,14	6,41	-	9,59
48	5,77	5,64	5,55	6,42	6,15	9,42	9,14
72	4,95	-	5,24	-	5,47	9,13	8,95
96	-	-	-	-	-	7,05	6,97
168	-	-	-	-	-	7,55	6,36

Taula 4.9. Valors de K_s i R^2 obtinguts a partir dels models lineals de les corbes d'inactivació de *B. thetaiotaomicron* i *B. fragilis* en aigua de riu i *B. fragilis* en aigua de riu estèril *in situ*.

K_s		Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
BBE	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-0,058 $R^2=0,95$	-0,122 $R^2=1$	-0,060 $R^2=0,88$	-0,051 $R^2=0,93$	-0,065 $R^2=0,96$	n.d.	-0,132 $R^2=0,80$
	<i>B. fragilis</i>	-0,075 $R^2=0,89$	-0,073 $R^2=0,98$	-0,087 $R^2=0,94$	-0,059 $R^2=0,86$	-0,051 $R^2=0,92$	n.d.	-0,040 $R^2=0,97$
	<i>B. fragilis</i> en aigua estèril	-0,047 $R^2=0,88$	-0,106 $R^2=1$	-0,030 $R^2=0,92$	-0,035 $R^2=0,98$	-0,037 $R^2=0,99$	-0,062 $R^2=1$	-0,033 $R^2=0,94$
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	n.d.	n.d.	-0,020 $R^2=0,84$	-0,023 $R^2=0,83$	-0,014 $R^2=0,5$	-0,055 $R^2=0,94$	-0,111 $R^2=1$
BPRM/HC	<i>B. fragilis</i>	n.d.	n.d.	-0,039 $R^2=0,93$	-0,021 $R^2=0,98$	-0,008 $R^2=0,61$	-0,006 $R^2=0,86$	-0,025 $R^2=0,96$
	<i>B. fragilis</i> en aigua estèril	n.d.	n.d.	-0,015 $R^2=0,98$	-0,031 $R^2=0,90$	-0,031 $R^2=0,86$	-0,035 $R^2=0,87$	-0,018 $R^2=0,87$
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	-0,067 $R^2=0,97$	-0,122 $R^2=1$	-0,054 $R^2=0,99$	-0,156 $R^2=1$	-0,065 $R^2=0,71$	-0,019 $R^2=0,39$	-0,024 $R^2=0,88$
PCR-Q	<i>B. fragilis</i>	-0,087 $R^2=0,97$	-0,081 $R^2=0,99$	-0,083 $R^2=0,96$	-0,107 $R^2=0,92$	-0,053 $R^2=0,95$	n.d.	-0,028 $R^2=0,96$
	<i>B. fragilis</i> en aigua estèril	-0,069 $R^2=0,88$	-0,061 $R^2=0,81$	-0,072 $R^2=0,95$	-0,063 $R^2=0,89$	-0,065 $R^2=0,82$	-0,014 $R^2=0,88$	-0,017 $R^2=0,72$

La T_{90} de *B. fragilis* calculada a partir del creixement en el medi BBE durant l'estiu, ha estat al voltant de 13,9 h. A la primavera, s'ha observat una persistència lleugerament major amb una T_{90} de 19,65 h; i major durant l'hivern amb una T_{90} de 24,87 h. L'anàlisi d'aquestes dades mitjançant una ANOVA simple mostra amb un P-valor de 0,0464 que existeixen diferències estadísticament significatives entre les T_{90} mitjanes de les estacions per un nivell de confiança del 95%. El contrast múltiple de rangs realitzat amb el mètode de les menors diferències possibles de Fisher (LSD), indica que hi ha diferències entre estiu i hivern, mentre que la primavera presenta valors intermedis. Una regressió simple indica una important relació entre la T_{90} i la temperatura que explica un 71,79% del model però no mostra relació amb la concentració d'oxigen dissolt a l'aigua.

Taula 5.10 Valors de les T_{90} obtingudes a partir dels models lineals de les corbes d'inactivació de *B. thetaiotaomicron* i *B. fragilis* en aigua de riu i *B. fragilis* en aigua de riu estèril (AE) *in situ*.

	T_{90} (h)	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
BBE	<i>B. thetaiotaomicron</i>	17,27	n.d.	16,53	19,65	15,36	n.d.	7,55
	<i>B. fragilis</i>	13,3	13,66	11,51	17,03	19,65	n.d.	24,87
	<i>B. fragilis</i> AE	21,32	n.d.	32,36	28,73	27,17	n.d.	29,5
BPRM/HC	<i>B. thetaiotaomicron</i>	n.d.	n.d.	50,76	43,66	69,93	18,25	8,98
	<i>B. fragilis</i>	n.d.	n.d.	25,91	47,39	129,87	169,49	40
	<i>B. fragilis</i> AE	n.d.	n.d.	67,56	32,68	32,36	28,57	54,94
PCR-Q	<i>B. thetaiotaomicron</i>	14,97	8,2*	18,45	6,4*	15,38	53,18	41,32
	<i>B. fragilis</i>	11,4	12,4	12,06	9	18,27	n.d.	42
	<i>B. fragilis</i> AE	14,57	16,31	13,93	15,82	15,46	74,07	59,17

*La majoria d'assajos en que s'ha efectuat el model amb 2 punts s'han eliminat. Excepte aquests valors en que la disminució brusca registrada a les 24 h fa que disminueixi per sota el límit de detecció de la PCR-Q i per tant s'han considerat en l'anàlisi tot i que la recta està formada per dos únics punts.

La detecció mitjançant BPRM/HC mostra uns valors de T_{90} més baixos a major temperatura. Durant l'hivern 2, però, s'ha obtingut una T_{90} més baixa (40 h) que desequilibra aquesta tendència (Taula 5.10). L'anàlisi estadístic del les T_{90} obtingudes no revela diferències significatives entre estacions quan s'analitza amb aquest mètode.

B. thetaiotaomicron presenta una T_{90} mitjana de 17,8 h a l'estiu, sent més elevada que al hivern, quan s'ha obtingut una T_{90} de 7,55 h. La primavera mostra una T_{90} amb

un valor intermedi de 15,36 h. Quan s'analitza aquests valors mitjançant una ANOVA simple, s'obté un P-valor de 0,063. És a dir, que no hi ha diferències significatives per un nivell de confiança del 95% però sí del 90%. El contrast múltiple de rangs indica diferències entre estiu i hivern, mentre que la primavera es troba entre ambdós grups.

El seguiment de la població mitjançant BPRM/HC mostra la mateixa tendència que amb el medi BBE: una T_{90} més alta a més elevada temperatura. Amb un P-valor de 0,0279, l'anàlisi de la variància mostra que existeix diferències significatives entre les T_{90} de les diferents estacions (nivell de confiança del 95%) quan s'analitza la persistència amb aquesta metodologia.

En ambdós espècies la supervivència observada amb el cultiu en el medi ric i confirmació amb la hibridació colonial, sempre és major que la observada mitjançant el medi BBE.

L'anàlisi de l'ADN mitjançant la PCR-Q ha mostrat que es produeix, durant l'estiu, una gran disminució durant les 24-48 hores i que després s'estabilitza. Per tal d'obtenir els models lineals s'ha calculat la T_{90} utilitzant aquests primers valors. S'observa una mateixa tendència en *B. fragilis* com en *B. thetaiotaomicron*, la T_{90} mitjana ha estat de 12 i 11,21 h respectivament a l'estiu, al hivern de 42 i 47,25 h i a la primavera s'han observat uns valors intermedis de 18,27 i 15,38 h respectivament.

5.3.2.2 Assaig 2: Anàlisi de la persistència de *B. fragilis* "in situ" en aigua de riu estèril

En l'assaig 2 s'ha estudiat la inactivació de *B. fragilis* en les mateixes condicions que l'assaig 1.a, però l'aigua de riu utilitzada per a realitzar la suspensió, ha estat esterilitzada per valorar el possible efecte dels depredadors.

Les taules 5.11.a i 5.11.b mostren els recomptes expressats en unitats logarítmiques obtinguts en aquest assaig utilitzant el medi BBE i BPRM. La població de partida al inici de cada experiment, és semblant entre les diferents estacions i entre els diferents anàlisis (BBE i BPRM/HC) entre 8,47 i 10,46 unitats logarítmiques/100 ml. Quan s'analitza la inactivació de les poblacions s'observa que ni els recomptes ni els models lineals de les gràfiques d'inactivació (Fig. 5.7.a i 5.7.b), mostren que hi hagi una diferent disminució de les poblacions en funció de les estacions.

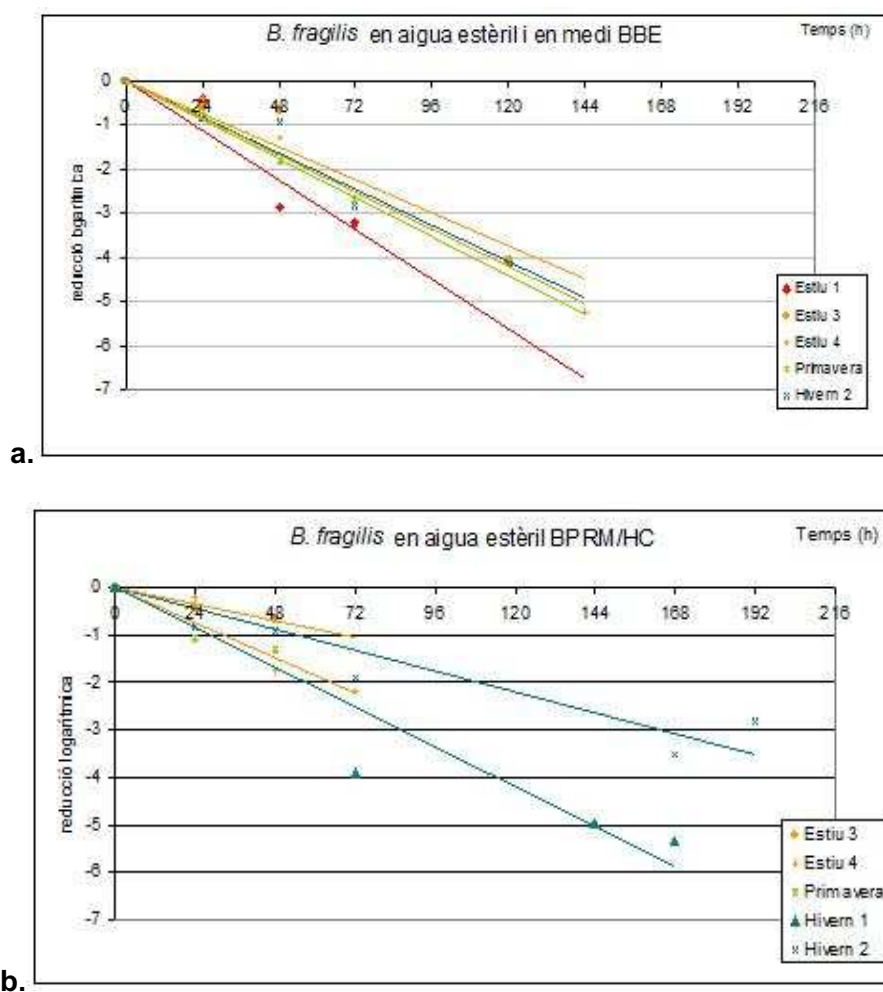
Les enumeracions en el medi BBE, mostren una major inactivació durant els estius 1 i 2 (l'estiu 2 i l'hivern 1 s'han prescindit de posteriors estudis ja que només es tenia 2 enumeracions), la resta d'assaigs (estiu 2 i 3, primavera i hivern) presenten unes cinètiques d'inactivació molt semblants.

Taula 5.11 Recòmptes de la població de *B. fragilis* de l'assaig 2 mitjançant el medi BBE (a.) i amb el medi BPRM i confirmació amb hibridació colonial (b.)

BBE <i>B. fragilis</i> en aigua estèril							
a.	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	8,47	9,69	10,35	9,24	8,69	9,50	8,85
24	8,06	-	9,73	8,85	8,01	-	8,00
48	5,59	4,60	9,69	7,96	6,87	-	7,94
72	5,27	-	-	-	6,02	3,30	6,03
120	-	-	6,29	-	-	-	4,73
144	-	-	-	4,02	-	-	-

BPRM/HC <i>B. fragilis</i> en aigua estèril							
b.	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	-	-	10,46	9,84	10,00	9,57	9,51
24	-	-	10,05	9,61	8,93	n.d.	8,67
48	-	-	9,79	8,08	8,69	5,90	8,59
72	-	-	7,00	7,66	5,30	5,65	7,59
144	-	-	-	-	-	4,60	-
168	-	-	-	-	-	4,23	6,00

Figura 5.7. Models lineals de les cinètiques d'inactivació de *B. fragilis* en medi BBE (a.) i en BPRM/HC (b.) quan s'han eliminat els depredadors del medi

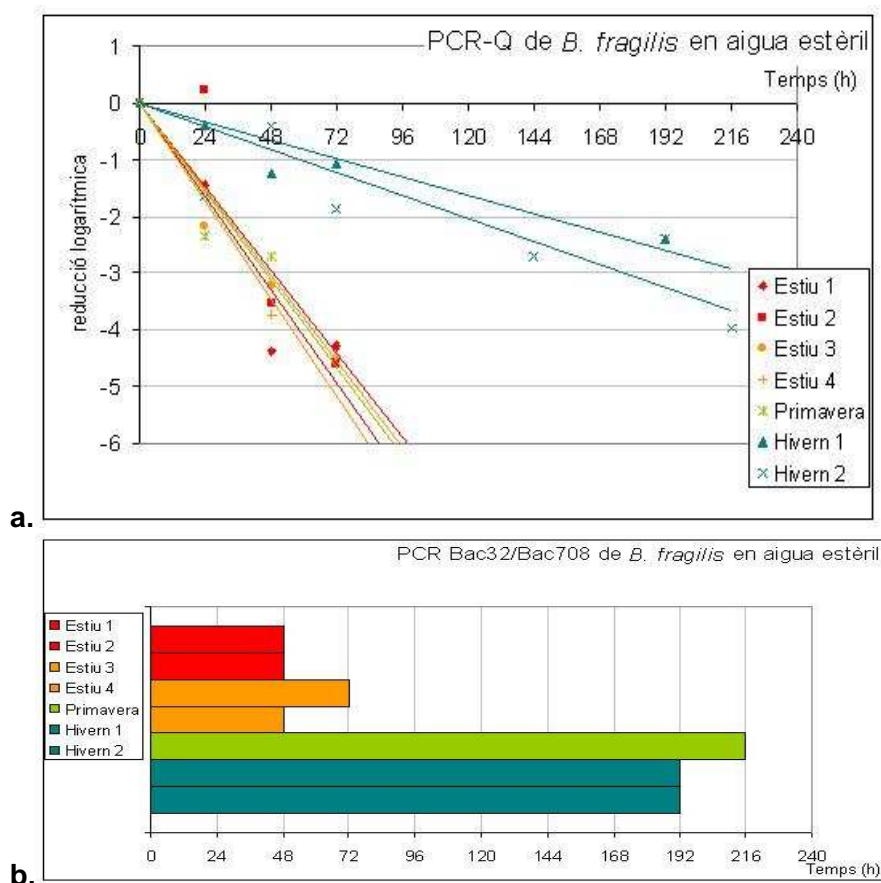


El comptatge realitzat mitjançant la tècnica BPRM/HC no mostra una estacionalitat (cal tenir en compte que no s'ha utilitzat aquest mètode per l'estiu 1 ni per l'estiu 2, que en aquest cas mostraven valors lleugerament diferents en el recompte amb el medi BBE) (Fig. 5.7.a i 5.7.b).

S'ha detectat el material genètic de *Bacteroides* amb la PCR utilitzant els iniciadors Bac32/708 durant 48-72 h a l'estiu i durant tots els dies en que s'ha realitzat l'assaig durant l'hivern i la primavera (192 i 216 h respectivament) (Fig. 5.8.a).

La detecció utilitzant la PCR-Q mostra la mateixa tendència que en l'assaig 1; durant l'estiu, a les 24-48 h es produeix una davallada forta, de manera que a les 48 h la concentració d'ADN ha disminuït més de 3 unitats logarítmiques. Durant la primavera, es comporta, en aquest cas, de manera semblant a l'estiu. Al hivern la concentració d'ADN baixa de manera més gradual i a les 48 hores hi hagut una disminució aproximada d'una unitat logarítmica (Taula 5.12 i Fig. 5.8.b).

Figura 5.8 Model d'inactivació obtingut de l'anàlisi de la població de *B. fragilis* en aigua estèril mitjançant PCR-Q (a.) Detecció de l'ADN mitjançant els iniciadors Bac32/Bac708 (b.)



Taula 5.12 Recomptes de la població de *B. fragilis* del assaig 2 mitjançant PCR-Q.

	PCR-Q <i>B. fragilis</i> en aigua estèril						
	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	7,90	6,87	7,29	7,70	7,31	7,36	7,95
24	6,60	7,08	5,12	7,31	5,09	6,99	6,26
48	3,98	3,61	4,07	4,26	4,74	6,12	7,53
72	-	2,71	-	3,61	4,89	6,27	6,06
144	-	-	-	-	-	7,26	5,21
192	-	-	-	-	-	4,96	-
216	-	-	-	-	-	-	5,53

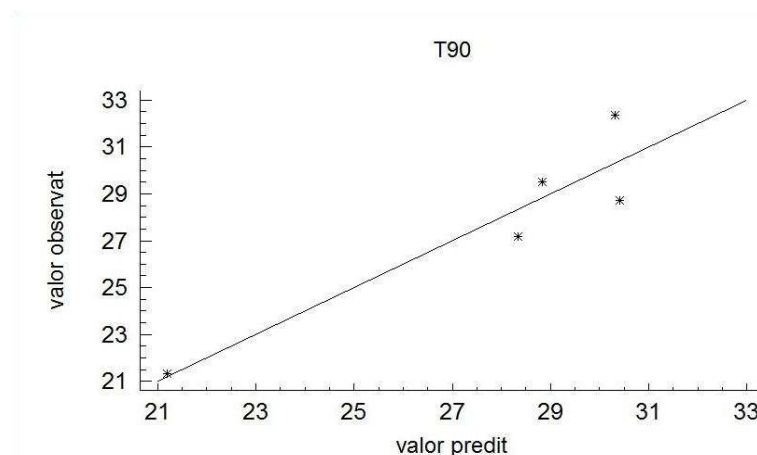
Les K_s i R^2 obtingudes a partir dels models lineals es mostren a la taula 5.9, juntament amb els resultats del assaig 1, i les T_{90} a la taula 5.10.

Les T_{90} calculades a partir dels recomptes en el medi BBE oscil·len entre 27,17 i 32,36 h, amb excepció de l'estiu 1 amb un valor més baix de 21,32 h (estació que coincideix amb una menor concentració d'oxigen dissolt i a la vegada una elevada temperatura). Les T_{90} tampoc no mostren cap tendència en funció de la temperatura ni de l'oxigen dissolt a l'aigua quan s'analitza cada paràmetre mitjançant una regressió lineal. En canvi, quan s'analitza les dades mitjançant una regressió lineal múltiple que té en compte ambdós paràmetres, s'obté l'equació 5.1 que ajusta perfectament ambdós variables a un model de predicció de la T_{90} (Fig. 5.9). La temperatura mostra un P-valor de 0,0859 i l'oxigen dissolt de 0,0895 per tant l'equació s'ajusta al model explicant un 86,78% amb un nivell de confiança del 90%.

$$T_{90} = 47,1576 - 0,477789 \times \text{temperatura} - 1,64786 \times OD \quad \text{Eq. 5.1}$$

Quan s'ha analitzat amb aquest model les dades de l'assaig 1.a, no s'ha obtingut aquesta relació. Probablement per que el factor depredeció afecta de manera força important la persistència.

Figura 5.9 Valors observats de T_{90} obtinguts a partir del creixement en el medi BBE de l'assaig 2 (*) en front els valors predits a partir del model de regressió lineal múltiple (Eq. 5.1).



Mitjançant el recompte amb BPRM/HC s'obté uns valors de T_{90} més heterogenis, que oscil·len entre 28,57 h i 67,56 h, sense mostrar cap relació en funció de les estacions. L'anàlisi de la variància d'aquests valors tampoc mostra diferències estadísticament significatives entre elles.

S'ha utilitzat una ANOVA simple per avaluar si existeixen diferències entre avaluar la inactivació de *B. fragilis* quan s'han eliminat o no els depredadors del medi (entre els assaig 1.a i 2). L'anàlisi dels valors de T_{90} obtinguts del seguiment de la persistència mitjançant el medi BBE presenten un P-valor de 0,0031 (per un nivell de confiança del 95%) i per tant mostren diferències estadísticament significatives entre la persistència de la població amb i sense depredadors.

La inactivació valorada mitjançant la PCR-Q segueix la tendència que s'ha vist en l'assaig 1.a. Durant l'estiu, s'ha calculat una T_{90} mitja de 15,15 h; la degradació de l'ADN a la primavera, es comporta de manera semblant, amb una T_{90} de 14,46 h. Al hivern s'ha observat una T_{90} mitja de 66,6 h; que és més alta durant l'hivern 1 al que correspon una menor temperatura de l'aigua.

S'han comparat les T_{90} obtingudes amb la PCR-Q dels assaigs 1.a, 1.b i 2 mitjançant una ANOVA de dos factors, per tal d'avaluar el factor estacional i discernir si hi ha diferències entre els tres assaigs. S'ha obtingut que hi ha diferències significatives entre les estacions amb un P-valor de 0 discernint dos grups: hivern i estiu més primavera. Existeixen, també diferències entre les dos soques tipus en aigua de riu i *B. fragilis* en aigua esterilitzada (P-valor de 0,0579). Aquests resultats confirmen que els depredadors intervenen en la inactivació dels microorganismes en el medi.

5.3.2.3 Assaig 3: Anàlisi de la persistència de *Bacteroides* spp. i altres indicadors microbians "in situ" en aigua de riu

En aquest assaig s'ha estudiat com evolucionen les espècies de *Bacteroides* que es troben a l'aigua residual juntament amb els indicadors tradicionals microbians quan arriben al medi ambient. Per això, s'ha fet una dilució 1:50 d'aigua d'entrada d'una EDAR en aigua de riu, i s'ha incubat *in situ* en la cubeta d'aigua d'entrada del riu a la planta potabilitzadora d'Abbrera (Apartat 5.2.6).

A les taules 5.13 s'observa els valors logarítmics de les enumeracions de les poblacions bacterianes analitzades. A les figures 5.10 es presenten les seves gràfiques d'inactivació.

Taules. 5.13 Recòmptes en unitats logarítmiques de l'experiment d'inactivació del bloc 3: coliformes fecals (a.) enterococs fecals (b.) *Bacteroides* spp. presents en l'aigua residual en el medi BBE (c.) i en el medi BPRM amb hibridació colonial (d.).

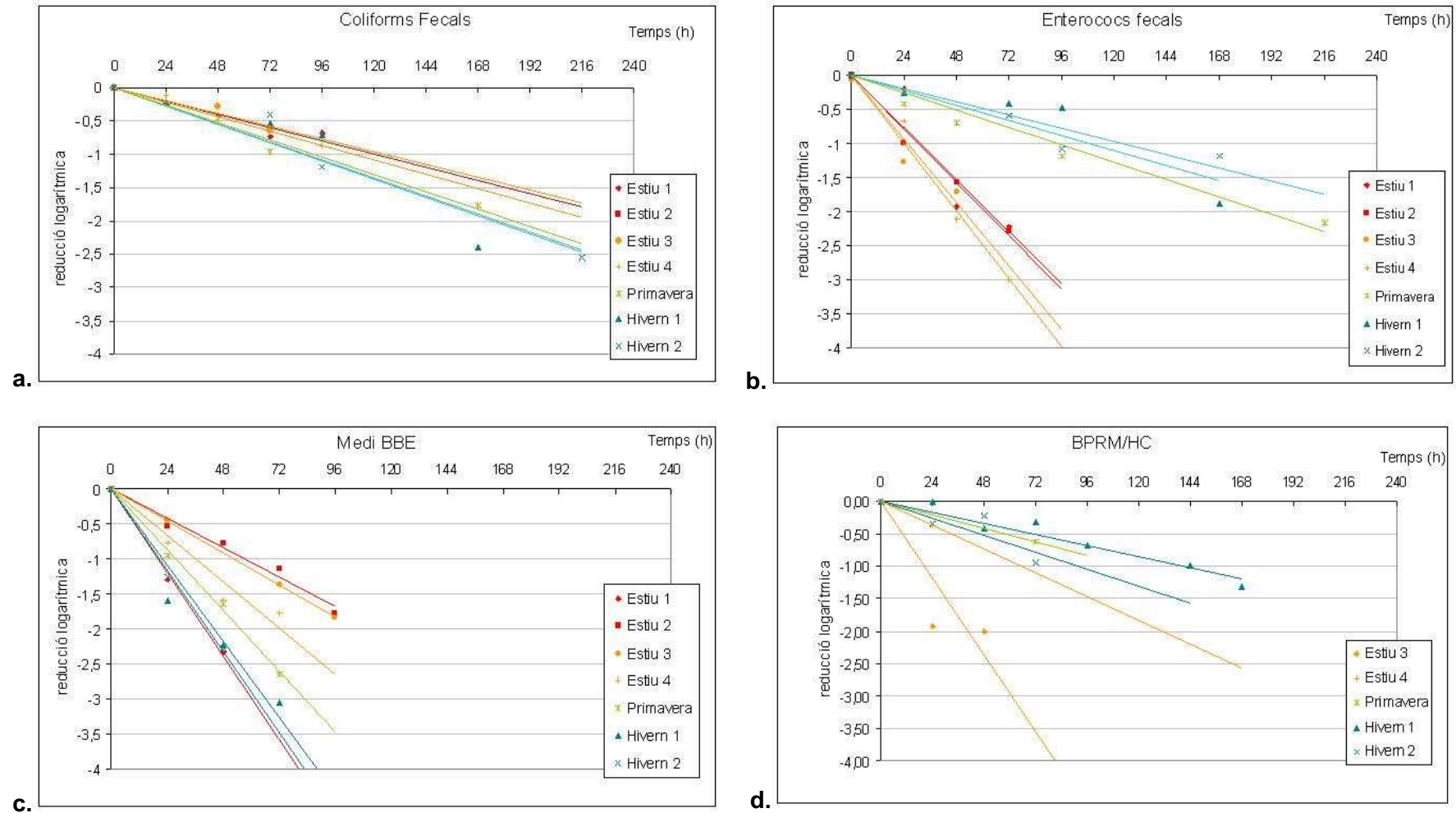
a.	Coliformes fecals						
	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	5,99	6,11	6,38	6,34	5,57	5,47	6,16
24	5,59	5,92	7,08	6,64	6,00	5,26	-
48	5,57	5,27	6,06	6,53	5,77	5,49	6,24
72	5,26	5,08	5,70	5,69	5,54	4,93	5,76
96	5,30	4,57	5,87	5,97	5,03	4,76	4,96
168	-	-	-	5,76	-	3,08	5,08
216	-	-	-	-	4,23	-	3,60

b.	Enterococs fecals						
	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	4,71	4,70	4,48	5,60	4,47	4,29	5,02
24	4,51	3,70	4,41	4,92	4,05	4,04	-
48	2,78	3,13	3,20	3,48	3,77	4,18	4,17
72	2,49	2,41	2,78	2,60	3,04	3,88	4,42
96	<2	<1	<2	2,78	3,28	3,82	3,94
168	-	-	-	<2	-	2,40	3,84
216	-	-	-	-	2,30	-	1,70

c.	BBE						
	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	5,04	4,08	4,54	4,77	5,34	5,54	5,82
24	3,74	3,56	4,10	4,00	4,39	3,95	4,56
48	2,70	3,31	n.d.	3,18	3,70	3,30	3,54
72	<3	2,93	3,18	3,00	2,70	2,48	<3
96	<3	2,30	2,70	-	<3	<3	<3
168	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

d.	BPRM/HC						
	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	-	-	6,95	6,85	6,65	6,46	7,62
24	-	-	-	6,48	6,70	6,52	-
48	-	-	6,48	-	-	6,04	7,45
72	-	-	-	6,46	-	-	-
96	-	-	6,40	-	6,08	5,78	-
168	-	-	-	-	-	5,48	6,85
216	-	-	-	-	-	5,15	-

Fig 5.10 Models lineals de les cinètiques d'inactivació de coliformes fecals (a.) enterococs fecals (b.) *Bacteroides* spp. presents a l'aigua residual en el medi BBE (c.) i en el medi BPRM amb hibridació colonial (d.).



L'enumeració inicial dels coliformes fecals basada en el creixement sobre mFC agar ha estat lleugerament superior a l'estiu que al hivern situant-se al voltant de 6,2 i de 5,7 unitats logarítmiques UFC/100ml respectivament (Taula 5.13.a). Durant els primers dies de mostreig la població es manté més o menys estable. A l'estiu, al final del mostreig la població ha disminuït menys d'1 unitat logarítmica UFC/100ml; al hivern l'experiment es va realitzar durant un període més prolongat de temps pel que es tenen més valors i s'observa una major disminució respecte la concentració inicial. A la figura 5.10.a s'observa una tendència moderadament superior a persistir durant més temps a l'estiu que no pas al hivern quan s'enumera la població en agar mFC.

L'enumeració en medi mEA mostra que la població d'enterococs fecals és, al principi del mostreig, al voltant d'1 unitat logarítmica menor que els coliformes fecals. Aquesta concentració inicial fou similar pels assaigs fets a les diferents estacions, entre 4,47 i 5,6 unitat logarítmiques UFC/100ml (Taula 5.13.b). A les 72 hores del inici de l'experiment, la reducció de la població ha estat del voltant de 2 unitats logarítmiques a l'estiu, en canvi al hivern la reducció ha estat al voltant de 0,5 unitat logarítmiques UFC/100ml. Durant la primavera la reducció ha estat d'1,43 unitat logarítmiques UFC/100ml. La cinètica d'inactivació es mostra a la figura 5.10.b i dibuixa clarament tendències diferenciades en funció de les estacions.

La població de *Bacteroides* d'origen fecal enumerada en el medi BBE és d'entrada més elevada a baixes temperatures que a altes, amb l'excepció de l'estiu 1 (Taula 5.13.c). El creixement en aquest medi sembla tenir una correlació bastant directa amb la temperatura: a les 24 hores, es mostra una disminució d'1,26 i 1,59 unitat logarítmiques UFC/100ml durant l'hivern; en canvi, els estius 2, 3 i 4 la disminució no arriba a 1 unitat logarítmica UFC/100ml. L'estiu 1 es comporta durant tot l'assaig de manera més semblant als assaigs duts a terme al hivern (Fig. 5.10.c) i per tant la reducció logarítmica és més similar (1,29 unitat logarítmiques UFC/100ml). En aquest estiu es va detectar valors d'oxigen dissolt a l'aigua més semblants als registrats durant l'hivern. Durant la primavera s'observa uns valors intermedis (0,95 unitat logarítmiques UFC/100ml).

L'enumeració amb el medi BPRM i posterior confirmació amb hibridació colonial han mostrat una presència d'1 a 2 unitat logarítmiques UFC/100ml més de *Bacteroides* spp. a les mostres analitzades (Taula 5.13.d i Fig. 4.10.d). No s'observa una estacionalitat marcada, tot i que persisteix lleument menys a l'estiu que al hivern.

Les K_s obtingudes a partir dels models lineals d'inactivació juntament amb la R^2 es mostren a la Taula 5.14, i la T_{90} a la Taula 5.15.

Taula 5.14. Valors de K_s i R^2 obtingudes a partir dels models lineals de les corbes d'inactivació de les poblacions analitzades en l'assaig 3: coliformes i enterococs fecals i *Bacteroides* spp.

K_s	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
CF	-0,008	n.d.	-0,008	-0,009	-0,011	-0,011	-0,011
	$R^2=0,91$		$R^2=0,93$	$R^2=0,98$	$R^2=0,98$	$R^2=0,81$	$R^2=0,95$
EF	-0,032	-0,033	-0,039	-0,041	-0,018	-0,009	-0,008
	$R^2=0,88$	$R^2=0,98$	$R^2=0,90$	$R^2=0,98$	$R^2=0,96$	$R^2=0,84$	$R^2=0,86$
BBE	-0,050	-0,018	-0,019	-0,028	-0,036	-0,046	-0,048
	$R^2=0,99$	$R^2=0,98$	$R^2=0,99$	$R^2=0,93$	$R^2=0,99$	$R^2=0,94$	$R^2=0,99$
BPRM/HC	n.d.	n.d.	0,008	-0,006	-0,009	-0,008	-0,006
			$R^2=0,96$	$R^2=0,45$	$R^2=0,95$	$R^2=0,98$	$R^2=0,86$

Taula 5.15. Valors de les T_{90} obtingudes a partir dels models lineals de les corbes d'inactivació de les poblacions analitzades en l'assaig 3: coliformes i enterococs fecals i *Bacteroides* spp.

	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
CF	120,48	n.d.	125	111,11	92,59	88,49	87,7
EF	31,34	30,58	25,7	24,15	54,94	108,69	123,45
BBE	20,04	57,14	52,36	36,23	27,62	21,98	20,66
BPRM/HC	n.d.	n.d.	119,05	158,73	123,56	133,33	181,82

Tant la K_s com la T_{90} , reflecteixen numèricament quina és persistència d'aquestes poblacions. La majoria de models lineals obtinguts presenten una consistència força sòlida amb una R^2 entre 0,99 i 0,81.

L'anàlisi de les T_{90} dels coliformes fecals mitjançant una regressió simple, mostra que existeix correlació entre les T_{90} obtingudes i el factor temperatura. Aquest factor explica un 83,8% del model. El test ANOVA simple, també mostra amb un P-valor de 0,0193 (nivell de confiança del 95%) que existeix diferències estadísticament significatives entre les estacions. L'anàlisi mitjançant el contrast múltiple de rang, crea dos grups diferenciats: estiu i hivern més primavera.

En els enterococs fecals, el model de regressió simple també descriu una correlació entre les T_{90} i la temperatura, que explica un 79,5% de la inactivació. L'ANOVA simple ha detectat diferències significatives entre les tres estacions estudiades: primavera, estiu i hivern (P-valor = 0,002 amb nivell de confiança del 95%).

Les T_{90} obtingudes a partir de l'anàlisi amb el medi BBE dels *Bacteroides* spp. presents a l'aigua residual mostren una correlació amb la temperatura quan no es considera l'assaig l'estiu 1. Només en aquest cas es detecta diferències significatives entre les estacions amb un P-valor de 0,0655 en una ANOVA simple (nivell de confiança del 90%). Els anàlisis estadístics han diferenciat entre dos grups: estiu i hivern més primavera. Quan s'analiza la correlació de les T_{90} amb la temperatura mitjançant un regressió simple, no s'observa diferències significatives P-valor de 0,1905). En canvi quan es correlaciona amb la concentració d'oxigen dissolt a l'aigua, s'observa un P-valor de 0,0598 el que indica que hi ha una relació estadísticament significativa entre ambdós paràmetres per un nivell de confiança del 90%.

S'han obtingut uns valors de T_{90} molt alts (entre 119,05 i 181,82 h) a partir de l'anàlisi de *Bacteroides* spp. mitjançant el creixement en BPRM i la confirmació amb hibridació colonial. L'elevat nombre de colònies amb hibridació positiva en tot moment, a partir d'un medi ric, suggereix que hi pugui haver un problema d'especificitat de la sonda Bac303.

Paral·lelament s'ha fet un seguiment de la persistència del gènere *Bacteroides* amb tècniques moleculars per tal de conèixer el seu comportament com a possible marcador molecular de l'origen de la contaminació fecal.

L'amplificació amb la PCR convencional utilitzant els iniciadors Bac32/Bac708 (Bernhard, A.E. et al, 2000b) ha donat negatiu per totes les mostres i tots els assajos realitzats de l'assaig 3.

Els resultats de la quantificació de *Bacteroides* mitjançant la PCR-Q (Layton, A. et al, 2006) es mostren a la taula 5.16. Els valors obtinguts estan prop del límit de detecció de la PCR-Q utilitzada i no s'observa una disminució de la població durant l'estiu. La situació és similar a la primavera, tot i que s'obtenen uns valors intermedis, i tampoc no s'observa una disminució. Durant l'hivern els valors inicials són més elevats, i per tant s'ha pogut observar una lleugera disminució. No obstant, a les 24 h es troben valors pròxims al límit de detecció.

Taula 5.16 Unitats logarítmiques/100 ml obtingudes mitjançant l'anàlisi amb PCR-Q específica del gènere *Bacteroides* de les mostres de l'assaig 3. A partir dels models lineals obtinguts al valorar la reducció de la població s'ha obtingut la K_s , la R^2 i la T_{90} .

	Estiu 1	Estiu 2	Estiu 3	Estiu 4	Primavera	Hivern 1	Hivern 2
0	4,03	4,44	4,58	4,19	4,53	5,10	5,52
24	4,29	4,36	5,42	5,48	4,48	-	4,86
48	4,43	5,45	5,44	4,95	4,67	4,74	4,70
72	4,72	5,38	-	-	4,45	4,78	4,42
96	4,56	-	-	-	-	4,30	3,94
168	-	-	-	-	-	4,28	-
K_s						-0,0093	-0,0165
R^2						0,8816	0,9414
T_{90} (h)						107,5	60,6

5.3.3 Inactivació natural de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* en microcosmos al laboratori

Atenent a que la temperatura té un paper destacable en la persistència de *Bacteroides* spp. en el medi ambient, es va realitzar un estudi experimental en microcosmos per a valorar el seu efecte en *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*.

5.3.3.1 Microcosmos de *Bacteroides fragilis*

Els recomptes dels diferents microcosmos de la soca de *B. fragilis* (DSM 2151^T) mostren que hi ha una diferent disminució en funció de la temperatura (Fig. 5.11). Quan els microcosmos es mantenen a baixa temperatura: 4 i 10°C, pràcticament no s'observa una disminució de la seva població durant el període de temps estudiat (Taula 5.17). A l'analitzar la persistència en el medi selectiu BBE a aquestes temperatures, tant en el microcosmos realitzat amb aigua de riu com amb aigua de riu estèril, s'observa una disminució de 0,5 unitats logarítmiques en 192 h (Taula 5.17.a i c). Quan es fa el recompte en el medi ric BPRM no es registra una disminució de la població (Taula 5.17.b i d).

A mesura que incrementa la temperatura disminueix la capacitat de persistència de la població (Fig. 5.11). En el microcosmos en aigua de riu (1.A) incubat a 22°C, la població s'ha mantingut constant més de 96 h, a partir de llavors s'ha iniciat el decreixement fins que a les 192 h s'ha registrat una disminució de 2,76 unitats logarítmiques (Taula 5.17.a). Aquesta davallada només s'ha fet palesa quan s'ha analitzat en el medi selectiu, el recompte en el medi BPRM, no mostra una disminució de la població de *B. fragilis* (Taula 5.17.b i d). En el microcosmos en aigua de riu estèril

(1.B), només es registra una disminució de la població en el medi BBE. Aquesta davallada s'inicia a les 96 h i és molt més gradual de manera que a les 192 h es registra una disminució d'1,49 unitats logarítmiques (Taula 5.17.c).

Quan el microcosmos s'ha incubat a 30°C s'ha obtingut un major decreixement de la població que s'ha manifestat fins hi tot en el medi BPRM (Fig. 5.11). Els recomptes de *B. fragilis* en el medi BBE del microcosmos 1.A, s'han mantingut constants fins a les 48 hores i a les 144 h ja ha disminuït 4,49 unitat logarítmiques. La població del microcosmos 1.B, en aquest medi, comença a créixer abans, a les 24 h, però ho fa de manera més gradual, així que a les 144 h la població ha disminuït 3,48 unitats logarítmiques. Ambdós microcosmos analitzats en el medi BPRM, mostren la mateixa tendència que amb el medi BBE: 1.A es manté constant fins a les 48 h i 1.B fins a les 24 h (Taules 5.17.a i c). La posterior disminució de la població és molt més gradual, de manera que a les 144 h ha disminuït 1,21 unitats logarítmiques el microcosmos 1.A i 0,96 unitats logarítmiques el microcosmos 1.B (Taules 5.17.b i c).

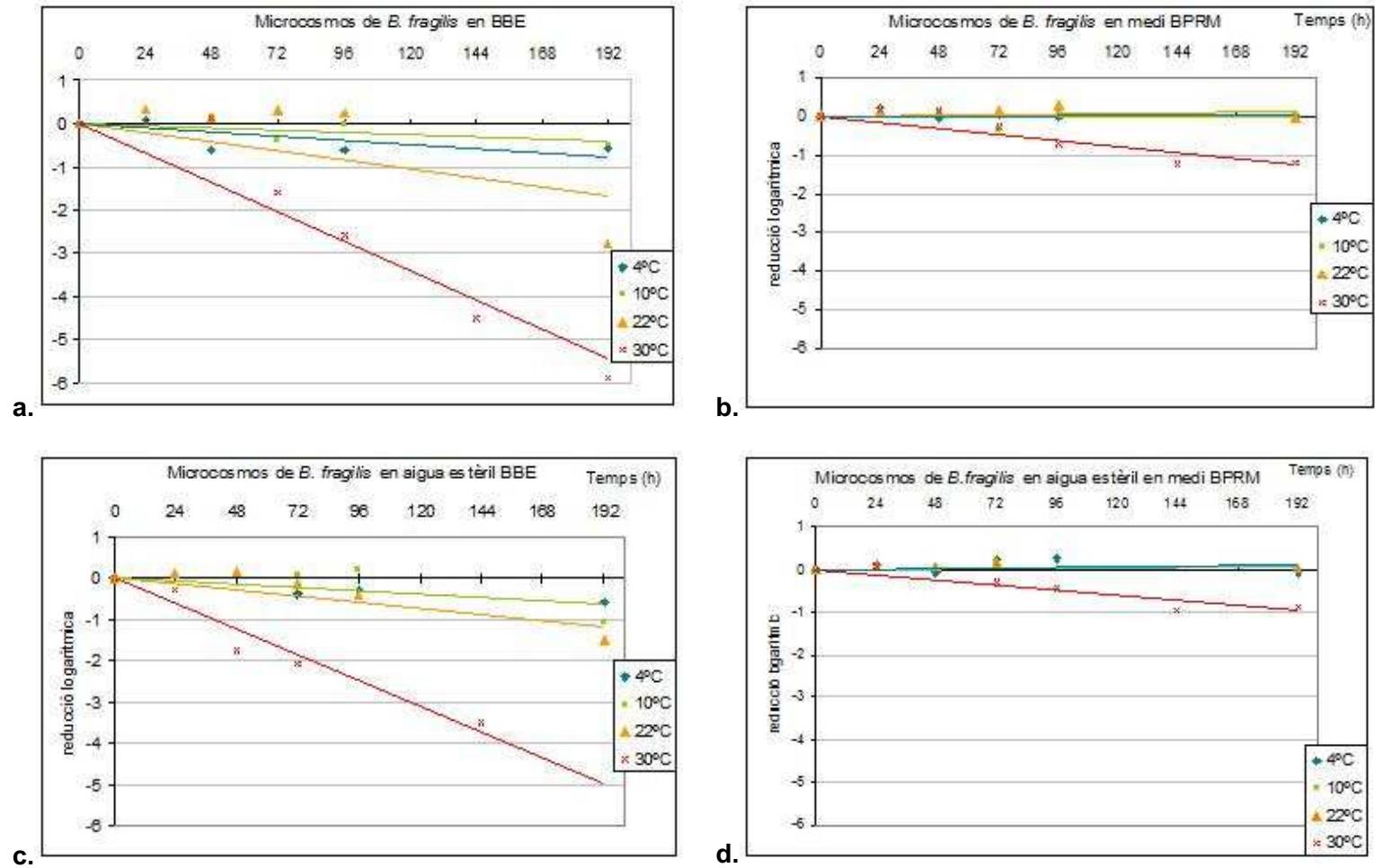
Taula 5.17. Recomptes de la població de *B. fragilis* en aigua de riu utilitzant el medi BBE (a.), BPRM (b.) i en aigua de riu estèril amb el medi BBE (c.) i el medi BPRM (d.) expressats en unitats logarítmiques/ml. Control de la microbiota autòctona de l'aigua de riu en BPRM (e).

a. Microcosmos de <i>B. fragilis</i> en BBE					b. Microcosmos de <i>B. fragilis</i> en BPRM				
	4°C	10°C	22°C	30°C		4°C	10°C	22°C	30°C
0h	7,81	7,81	7,81	7,81	0h	8,12	8,12	8,12	8,12
24h	7,89	-	8,13	7,84	24h	8,34	-	8,29	8,31
48h	7,19	7,96	7,95	7,93	48h	8,07	8,22	-	8,27
72h	6,33	7,44	8,10	6,22	72h	8,18	7,79	8,30	7,85
96h	7,20	7,81	8,06	5,22	96h	8,14	8,21	8,40	7,43
144h	-	-	-	3,32	144h	-	-	-	6,91
192h	7,25	7,31	5,05	1,94	192h	8,13	8,18	8,10	6,94

c. Microcosmos de <i>B. fragilis</i> en aigua estèril en BBE					d. Microcosmos de <i>B. fragilis</i> en aigua estèril en BPRM				
	4°C	10°C	22°C	30°C		4°C	10°C	22°C	30°C
0h	7,81	7,81	7,81	7,81	0h	8,12	8,12	8,12	8,12
24h	-	-	7,95	7,56	24h	8,23	-	8,20	9,21
48h	7,15	7,95	7,98	6,08	48h	8,05	-	8,21	7,08
72h	7,45	7,91	7,69	-	72h	8,35	8,31	8,29	7,84
96h	7,54	8,01	7,40	6,37	96h	8,37	-	7,37	7,69
144h	-	-	-	4,31	144h	-	-	-	7,15
192h	7,25	6,78	6,32	-	192h	8,06	8,13	8,13	7,26

e. Aigua de riu sense inocular			
	4°C	22°C	30°C
0 h	3,00	3,00	3,00
24 h	3,00	2,70	2,00
48 h	3,13	2,70	-
72 h	2,82	2,53	2,28
96 h	3,08	2,54	-
144 h	-	-	1,90

Figura 4.10 Gràfiques d'inactivació del microcosmos 1.A (*B. fragilis* en aigua de riu) en el medi BBE (a.) i BPRM (b.) i del microcosmos 1.B (*B. fragilis* en aigua de riu estèril) en el medi BBE (c.) i BPRM (d.)



A la taula 5.17.e es mostra els recomptes en BPRM de l'aigua de riu sense inocular. Per tal d'evitar possibles interferències amb la microbiota autòctona del riu, s'ha realitzat a la vegada el seguiment de les poblacions naturals de l'aigua de riu mantingudes també a diferents temperatures. Els recomptes realitzats en el medi BBE van ser negatius per a tots els mostreigs i totes les temperatures (es va obtenir colònies, però cap d'elles presentava la coloració negra típica de la majoria d'espècies de *Bacteroides*). Els recomptes en medi BPRM no van superar les 3,13 unitats logarítmiques/ml. Això mostra que no hi ha hagut interferències entre la microbiota autòctona del riu que hagin pogut sobreestimar la persistència de *B. fragilis*.

5.3.3.2 Microcosmos de *Bacteroides thetaiotaomicron*

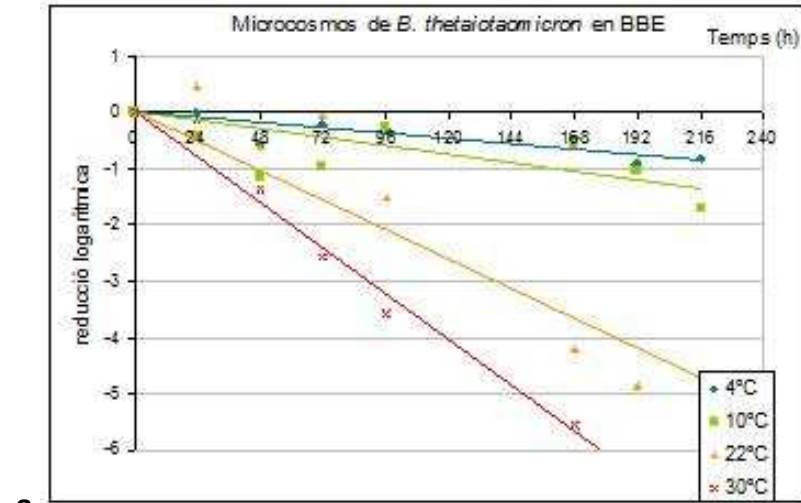
L'estudi de la soca de *B. thetaiotaomicron* (DSM 2079^T) mitjançant microcosmos, revela la mateixa tendència que *B. fragilis* però es mostra més vulnerable.

A baixes temperatures (4 i 10°C), la disminució de la població comença al inici de l'experiment, però és molt gradual en el temps (Fig. 5.12). D'aquesta manera, els recomptes en el medi BBE a les 192 h reflecteixen una disminució aproximada d'una unitat logarítmica en aquestes temperatures en el microcosmos en aigua de riu (2.A). En el microcosmos en aigua de riu estèril (2.B), la disminució és menor, registrant-se, a les 192 h un decreixement al voltant de 0,75 unitats logarítmiques. Quan es fa l'anàlisi amb el medi ric BPRM, pràcticament no s'observa una disminució de la població (Taula 5.18).

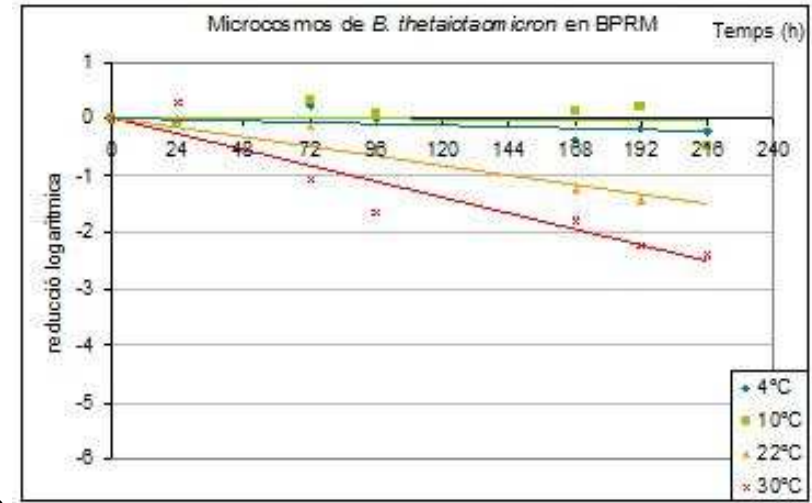
El microcosmos 2.A mantingut a 22°C de temperatura mostra una davallada de la població a partir de les 72 h; a les 192 h s'ha produït una disminució de 4,22 unitats logarítmiques (Taula 5.18.a). La disminució de la població és més suau en el microcosmos 2.B, de manera que amb el mateix temps (192 h) en el medi BBE es detecta un decreixement d'1,34 unitats logarítmiques. Quan es fa el seguiment amb el medi BPRM, la població disminueix de manera molt lenta, a les 192 h la població del microcosmos 2.A i 2.B han disminuït 1,43 i 0,42 unitats logarítmiques respectivament.

Quan es fa el seguiment amb el medi BBE de la població dels microcosmos incubats a 30°C, s'observa que la població del 2.A es manté durant les primeres 24 h a partir de les quals comença a davallar. D'aquesta manera, a les 168 h, s'han reduït 5,56 unitats logarítmiques (Taula 5.18.a). Quan s'analitza mitjançant el medi BPRM, la disminució ha estat de 1,78 unitats logarítmiques (Taula 5.18.b). El microcosmos en aigua estèril la disminució és més gradual i a les 168 h, ha minvat 1,52 unitats logarítmiques en el medi BBE i 1,24 unitats logarítmiques en BPRM (Taula 5.18.c).

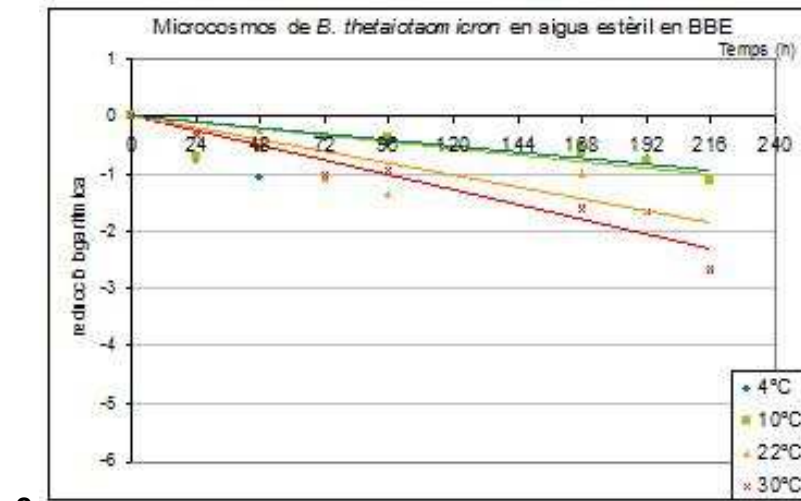
Figura 5.11 Gràfiques d'inactivació del microcosmos 2.A (*B. thetaiotaomicron* en aigua de riu) en el medi BBE (a.) i BPRM (b.) i del microcosmos 2.B (*B. thetaiotaomicron* en aigua de riu estèril) en el medi BBE (c.) i BPRM (d.)



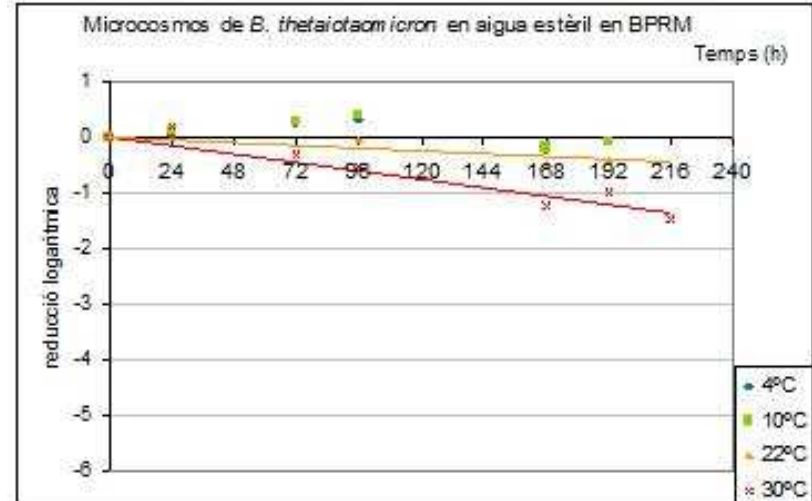
a.



b.



c.



d.

Taula 5.18. Recomptes de la població de *B. thetaiotaomicron* en aigua de riu utilitzant el medi BBE (a.), BPRM (b.) i en aigua de riu estèril amb el medi BBE (c.) i el medi BPRM (d.) expressats en unitats logarítmiques/ml. Control de la microbiota autòctona de l'aigua de riu en BPRM (e).

a. Microcosmos de <i>B. thetaiotaomicron</i> (2.A) en BBE					b. Microcosmos de <i>B. thetaiotaomicron</i> (2.A) en BPRM				
	4°C	10°C	22°C	30°C		4°C	10°C	22°C	30°C
0h	6,56	6,56	6,56	6,56	0h	7,52	7,52	7,52	7,52
24h	6,57	6,14	7,04	6,45	24h	7,51	7,43	7,55	7,84
72h	6,37	5,61	6,50	4,00	72h	7,76	7,86	7,39	6,45
96h	6,26	6,30	5,04	3,00	96h	7,53	7,61	-	5,89
168h	6,10	5,99	2,34	1,00	168h	7,17	7,65	6,28	5,74
192h	5,64	5,52	1,70	-	192h	7,35	7,75	6,09	5,30
216h	5,76	4,85	2,11	-	216h	7,32	7,04	-	5,13

c. Microcosmos de <i>B. thetaiotaomicron</i> en aigua estèril (2.B) en BBE					d. Microcosmos de <i>B. thetaiotaomicron</i> en aigua estèril (2.B) en BPRM				
	4°C	10°C	22°C	30°C		4°C	10°C	22°C	30°C
0h	6,86	6,86	6,86	6,86	0h	7,42	7,42	7,42	7,42
24h	6,13	6,16	6,43	6,52	24h	7,44	7,54	7,56	7,61
72h	6,50	5,25	6,57	5,84	72h	7,65	7,67	-	7,13
96h	6,37	6,48	6,60	5,94	96h	7,75	7,79	7,38	6,91
168h	6,34	6,23	5,78	5,24	168h	7,20	7,24	6,95	6,18
192h	6,12	6,09	5,52	5,20	192h	-	7,33	7,00	6,41
216h	-	5,73	5,87	4,20	216h	-	-	-	5,94

e. Aigua de riu sense inocular				
	4°C	10°C	22°C	30°C
0 h	2,91	2,91	2,91	2,91
24 h	2,93	2,84	2,98	2,78
48 h	2,85	-	2,85	2,36
72 h	-	2,65	2,11	2,23
96 h	2,64	2,95	2,81	-

En els estudis en microcosmos la cinètica de les poblacions es manté durant un temps determinat fins que s'inicia el decreixement. Per tant, un model lineal pot no ser el més adient per a ser aplicat en aquestes gràfiques d'inactivació. Tot i així, aquest model permet comparar les dues soques, els dos medis i les diferents temperatures assajades, així com poder relacionar-los amb els models *in situ*. Els models lineals han permès obtenir un valor numèric (la T_{90}) i quantificar la persistència de les poblacions. A la taula 5.19 es mostren les diferents T_{90} obtingudes a partir del seguiment de les poblacions de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* en el medi BBE.

L'assaig utilitzant aigua de riu sense inocular es mostra a la taula 5.18.e. Talment com s'ha vist als microcosmos de *B. fragilis* no s'ha obtingut creixement de colònies negres quan s'ha realitzat l'anàlisi mitjançant el medi BBE. Els recomptes en el medi

BPRM s'han mostrat més o menys estables en funció del temps i els valors no han superat les 2,98 unitats logarítmiques/ml que s'han considerat com a microbiota autòctona del riu. Degut a que aquesta concentració és menor a l'obtinguda quan l'aigua és inoculada amb *B. thetaiotaomicron* no hi hagut interferències amb la microbiota autòctona de l'aigua de riu.

Taula 5.19 T_{90} obtingudes a partir dels recomptes en medi BBE i en medi BPRM i hibridació colonial dels microcosmos de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*. Assaig 1.A: Microcosmos de *B. fragilis* en aigua de riu. Assaig 1.B: Microcosmos de *B. fragilis* en aigua de riu estèril. Assaig 2.A: Microcosmos de *B. thetaiotaomicron* en aigua de riu. Assaig 2.B: Microcosmos de *B. thetaiotaomicron* en aigua de riu estèril.

	T_{90} (h)	<i>B. fragilis</i>		<i>B. thetaiotaomicron</i>	
		1.A	1.B	2.A	2.B
BBE	4°C	>216	>216	>216	>216
	10°C	>216	>216	156,3	212,7
	22°C	115	166	45,5	116,3
	30°C	35	39	29,5	94,33
BPRM	4°C	>216	>216	>216	>216
	10°C	>216	>216	>216	>216
	22°C	>216	>216	142,85	>216
	30°C	156,25	200	86,2	161,3

Ambdós soques presenten una evolució de la persistència en funció de la temperatura; a mesura que incrementa la temperatura disminueix la T_{90} . *B. fragilis* presenta una T_{90} de 35 h i 115 h a 30°C i 22°C respectivament quan s'utilitza el medi BBE. Quan s'analitza la mateixa soca en aigua de riu estèril, s'obtenen uns recomptes lleugerament superiors de 39 h i 166 h. A temperatures menors, la població no ha arribat a disminuir una unitat logarítmica en el temps que ha durat l'experiment. El medi BPRM ha mostrat una major recuperació de *B. fragilis* de manera que ni a 4, ni a 10, ni a 22°C s'ha detectat una disminució d'una unitat logarítmica i a 30°C s'han registrat una T_{90} de 156,25 h en el microcosmos 1.A i 200 h en el microcosmos 1.B.

B. thetaiotaomicron presenta en tots els casos una menor persistència que *B. fragilis*. Les T_{90} obtingudes, han estat de 29,5, 45,5 i 156,3 h a 30, 22 i 10°C en els microcosmos 2.A en BBE i 94,33, 116,3 i 212,7 h a 30, 22 i 10°C en els microcosmos 2.B en BBE. Per tant, existeix una disminució de la persistència quan incrementa la temperatura i quan hi ha depredadors a l'aigua. Les T_{90} obtingudes analitzant els recomptes en el medi BPRM són més altes que les obtingudes analitzant el medi BBE i segueixen la mateixa tendència.

5.4 Discussió

Bacteroides és un dels gèneres que actualment està sent més estudiat com a possible indicador de l'origen de la contaminació fecal a l'aigua. Les tècniques moleculars han fet que anés guanyant importància fins al punt que s'han descrit varies tècniques per a poder ser utilitzat amb aquesta finalitat (Bernhard, A.E. et al, 2000b; Carson, C.A. et al, 2005; Kildare, B.J. et al, 2007; Reischer, G.H. et al, 2007; Seurinck, S. et al, 2005a). Un cop descrites les tècniques específiques per a la seva detecció i/o enumeració resten aspectes a analitzar, com poden ser la distribució geogràfica i la persistència en el medi ambient. Un dels aspectes que cal tenir en compte, alhora de proposar el gènere com a indicador, és conèixer el seu comportament quan són abocats al medi juntament amb les femtes. El principal objectiu d'aquest capítol, ha estat fer un estudi de la supervivència del gènere *Bacteroides* en les condicions ambientals que es troba quan arriba al medi ambient, per tal de conèixer la seva persistència com a indicador de la contaminació fecal. Per aquest propòsit s'han utilitzat tant tècniques moleculars com de cultiu. Els mètodes de cultiu permeten fer un seguiment de les cèl·lules cultivables i poder determinar quins factors afecten la seva viabilitat. Tot i així, la majoria de mètodes de detecció de *Bacteroides* com a indicador de MST són tècniques moleculars i per tant, a la vegada s'ha estudiat el temps durant el qual es pot detectar la presència d'àcids nucleics a l'aigua.

5.4.1 Valoració de la recuperació en BBE i BPRM/HC

Per al seguiment de les cèl·lules cultivables, s'ha utilitzat dos medis de cultiu: el BBE, selectiu i diferencial pel gènere, i el medi ric BPRM, confirmant els possibles *Bacteroides* mitjançant hibridació amb la sonda Bac303. El medi BBE conté substàncies inhibidores del creixement com són la bilis i la gentamicina, això pot fer que no totes les espècies *Bacteroides* puguin ser aïllades. *B. vulgatus* i *B. uniformis* són dos de les principals espècies de l'aparell digestiu humà (Kuritzin, A.P. et al, 1986), la primera espècie no degrada l'esculina (Jeffrey Smith, C. et al, 2006) i per tant pot créixer en el medi però no mostra la coloració negrosa típica del gènere *Bacteroides* i la segona creix molt lentament de manera que a les 48 h en que es realitza la lectura pot no ser detectada. Les substàncies inhibidores que incorporen aquest medi, poden dificultar el creixement de les cèl·lules danyades sobretot quan aquestes arriben al medi ambient i estan sotmeses a diferents factors ambientals estressants. A la vegada,

tot i ser un medi selectiu i dificultar el creixement d'algunes espècies, hi poden créixer altres bacils gram negatius com *Fusobacterium mortiferum* i *Bilophila* spp. (Jeffrey Smith, C. et al, 2006). La recuperació en un medi ric que permet el bon creixement de *Bacteroides*, com és el BPRM, i la confirmació amb una sonda específica permeten pal·liar aquestes limitacions tècniques, tot i que podrien resultar menys selectius.

Quan s'analitza una mostra ambiental utilitzant ambdós mètodes, s'observa diferències entre els recomptes efectuats; es recupera una unitat logarítmica més de presumptes *Bacteroides* amb BPRM/HC que no pas amb el medi selectiu BBE. I quan s'analitza un cultiu envellit de *B. fragilis* s'observa una recuperació d'un 74% més de cèl·lules amb el medi ric (en aquest cas no s'ha aplicat la HC sobre BPRM perquè es tracta d'un cultiu pur i no ha calgut confirmar les colònies crescudes com a presumptes *Bacteroides*).

Per tant, la utilització del medi ric BBE amb substàncies inhibidores del creixement, fa que es recuperin un número menor de *Bacteroides* que en un medi sense inhibidors.

5.4.2 *Persistència de les diferents poblacions microbianes en aigua de riu "in situ"*

S'ha realitzat anàlisis per a avaluar la persistència *in situ* per tal de tenir en compte els diversos factors ambientals que intervenen en la inactivació de les poblacions bacterianes en ambients aquàtics. S'han utilitzat bosses de diàlisi que permeten el intercanvi amb l'exterior de soluts però no de les cèl·lules. Els assaigs realitzats amb tubs de diàlisi mantinguts en un ramal d'aigua que entra la planta potabilitzadora del riu Llobregat ha permès valorar conjuntament els diferents factors ambientals i fisicoquímics a que estan sotmeses les poblacions bacterianes estudiades en l'aigua del riu.

El model experimental aplicat no ha estat planejat per a valorar les variacions diàries i per tant, les dades obtingudes no tenen en compte les oscil·lacions diàries ha que han estat sotmeses, com la diferència de temperatura dia/nit. Tot i així, els resultats permeten l'estudi de la cinètica d'eliminació dins del període d'estudi, i comparar-los entre les diferents estacions (estiu – hivern) que s'han realitzat. Es poden distingir quatre temporades diferents de mostreig segons aquestes condicions:

→ Estiu 1 i 2 amb una temperatura ambiental molt elevada de 30°C i unes condicions d'oxigen dissolt a l'aigua molt variables, entre 5 i 9,4 ppm.

- Estiu 3 i 4 amb una temperatura més moderada, al voltant de 22°C i una baixa concentració d'oxigen dissolt a l'aigua entre 3,1 i 4 ppm.
- Primavera amb una temperatura al voltant de 14°C i una concentració d'oxigen dissolt a l'aigua entre 7 i 7,8 ppm.
- Hivern 1 i 2 amb temperatures baixes entre 5 i 9°C i amb una elevada concentració d'oxigen dissolt a l'aigua entre 8,4 i 8,9 ppm.

5.4.2.1 Persistència de cèl·lules cultivables de *Bacteroides fragilis*

La T_{90} és un valor numèric que s'ha calculat a partir d'un model lineal, però cal tenir en compte que diferents poblacions, diferents assaigs i diferents mètodes de detecció poden mostrar diferents cinètiques d'inactivació més properes a models exponencials o sigmoïdals que no pas a lineals. S'ha escollit aquest model per tal d'obtenir una eina de comparació entre tots els estudis realitzats.

En els assaigs realitzats en els quals no s'ha eliminat els depredadors de l'aigua mostren que la temperatura és un factor que condiciona la supervivència de *B. fragilis* (DSM 2151^T). La inactivació de la soca de *B. fragilis* és diferent en funció de la temporada en que s'ha realitzat l'experiment (Taula 5.6). S'observa un increment de la T_{90} a mesura que disminueix la temperatura (d'una mitjana de 13,5 h durant els estius 1 i 2 a 24,9 h al hivern). Els anàlisis estadístics utilitzats revelen diferències significatives entre les diferents estacions quan es realitzen els recomptes amb el medi BBE.

Els recomptes amb BPRM/HC mostren, també, aquesta tendència, amb excepció de la T_{90} observada durant l'hivern 2 que es desvia totalment de la resta (Taula 5.10). Tot i així, els elevats valors obtinguts durant l'hivern 1 i la primavera (169,49 h i 129,87 h) fan pensar en possibles problemes de inespecificitat de la sonda. La hibridació colonial utilitzada per a confirmar com a *Bacteroides* spp. les colònies que creixen en BPRM podria ser una tècnica no suficientment robusta.

Els valors de T_{90} obtinguts quan s'utilitza aigua de riu esterilitzada són majors que quan no s'han eliminat els depredadors al medi (Taula 5.10). Per tant, a l'aigua de riu hi ha la presència de microorganismes depredadors de *B. fragilis* que intervenen en la disminució de la seva persistència. Els anàlisis estadístics pertinents mostren que existeixen diferències significatives entre la persistència de la soca de *B. fragilis* incubada en aigua de riu o en aigua de riu que ha estat prèviament esterilitzada.

La importància del paper dels microorganismes depredadors en la disminució de la supervivència de *B. fragilis* al medi s'ha confirmat en un altre estudi en el qual, es va analitzar la persistència de *B. fragilis* en microcosmos a 10°C. En aquest estudi, es va detectar cèl·lules cultivables durant 264 h quan s'analitzava aigua de riu no filtrada; i durant les 384 h que va durar l'experiment quan s'utilitzava aigua de riu esterilitzada per filtració (Okabe, S. et al, 2007b).

La relació obtinguda entre un increment de temperatura i una menor persistència de *B. fragilis* no s'observa a tots els assaigs realitzats. Quan es realitza l'experiment *in situ* utilitzant aigua de riu estèril (tant utilitzant el medi BBE com BPRM/HC), la T_{90} obtinguda als estius 3 i 4 incrementa fins a assolir les T_{90} obtingudes a més baixes temperatures (Taula 5.10). Els anàlisis estadístics no detecten diferències significatives en cap de les dos metodologies utilitzades entre les diferents estacions. Aquest fet, pot suggerir, com han indicat altres autors (Kreader, C.A., 1998; Okabe, S. et al, 2007b), que les variacions estacionals de temperatura afectin l'activitat dels depredadors, que seran menys actius com més baixa sigui aquesta.

La T_{90} obtinguda en l'assaig 2 en medi BBE durant l'estiu 1 (Taula 5.10) i la tendència que s'ha registrat a l'estiu 2 (Taula 5.11.a) mostren una més baixa persistència en aquests assajos que a l'estiu 3 i 4. Aquesta més baixa persistència, casualment, coincideix amb uns valors alts de temperatura i oxigen dissolt a l'aigua. Ni la temperatura ni l'oxigen dissolt han semblat influir en els valors de la T_{90} quan s'analitzen per separat mitjançant una regressió lineal. En canvi l'anàlisi d'ambdós factors conjuntament mitjançant una regressió lineal múltiple, mostra com s'ajusten a un model (Eq 5.1). L'equació obtinguda indica com, tant un increment de la temperatura com de l'oxigen dissolt intervenen negativament en la persistència de *B. fragilis*, sent aquest últim factor el que més hi influeix (el seu valor es veu multiplicat per 1,64786, en canvi la temperatura per 0,477789).

L'efecte d'aquests dos paràmetres no s'observa en l'estudi de la persistència en l'assaig 1.a, ja que l'efecte dels depredadors és molt important i en aquest cas emmascara els efectes dels factors fisicoquímics.

Els valors de T_{90} obtinguts mitjançant el cultiu en el medi ric BPRM/HC són significativament més grans que amb el medi BBE; per tant, el medi ric afavoreix la recuperació d'un número més elevat de cèl·lules que el medi selectiu. No obstant, la hibridació colonial pot no ser un mètode prou robust per a la confirmació dels presumptes *Bacteroides* spp. La inespecificitat de la sonda es fa palesa quan s'observa que les enumeracions obtingudes a l'analitzar aigua sense esterilitzar són

més grans que quan s'han eliminat els depredadors del medi. Per tant, podria haver-hi interferències amb la microbiota autòctona del medi que fan sobreestimar la quantitat de *Bacteroides* spp.

5.4.2.2 Persistència de cèl·lules cultivables de *Bacteroides thetaiotaomicron*

B. thetaiotaomicron en els experiments *in situ* també presenta una diferent supervivència en funció de l'estació en que s'ha realitzat els assaigs, però al contrari del que passava amb *B. fragilis* la recuperació en el medi BBE, és menor com més baixa és la temperatura. Al hivern s'ha obtingut una T_{90} de 7,6 h molt més baixa que durant l'estiu (17,3 i 18,1 h). Aquestes diferències són estadísticament significatives quan s'analitzen mitjançant una ANOVA simple.

Quan es fa el seguiment amb el medi BPRM/HC dels assaigs *in situ*, també s'obté una correlació entre la temperatura i la persistència, tot i que les T_{90} obtingudes durant l'hivern són força més variables (18, 25 al hivern 1 i 8,98 al hivern 2). En aquest cas, s'esperava que l'estiu influís negativament en la seva supervivència, tal i com s'ha vist en els assajos per a *B. fragilis*; però diferents espècies d'un mateix gènere es poden comportar de manera diferent. Cal tenir en compte que al hivern incrementa la concentració d'oxigen dissolt a l'aigua i que per tant, aquest factor pot afectar la persistència de *B. thetaiotaomicron* que és una espècie anaeròbia. *B. fragilis* també presenta una fisiologia anaeròbia però té dos enzims de protecció en front de l'oxigen: la superòxid dismutasa i la catalasa, en canvi *B. thetaiotaomicron* només presenta la catalasa. Anteriorment ja s'havia descrit *B. fragilis* com una de les espècies anaeròbies més aerotolerants capaç de sobreviure 48-72 h en presència d'oxigen atmosfèric (Rocha, E.R. et al, 1996).

La major concentració d'oxigen a l'aigua, és per tant un factor estressant pel que també pot afectar la recuperació en el medi selectiu BBE. Els inhibidors de creixement que incorpora aquest medi poden afectar més *B. thetaiotaomicron* en situació d'estrès que no pas a *B. fragilis*. Per tant, aquest factor pot ser que afecti la cultivabilitat de les cèl·lules més que no pas a la viabilitat, i que per tant siguin més difícils de recuperar amb el medi BBE durant l'hivern però si que es pugui en un medi ric sense inhibidors.

No s'ha valorat en aquest cas el possible efecte de la presència de depredadors a l'aigua sobre la persistència de *B. thetaiotaomicron*.

5.4.2.3 Persistència de *Bacteroides* spp., coliformes i enterococs fecals d'aigua residual d'EDAR en aigua de riu "in situ"

Tal com s'ha vist en l'anàlisi de la persistència de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*, no totes les espècies de *Bacteroides* presenten el mateix comportament quan arriben al medi ambient. Aquesta diferent cinètica pot ser més acusada quan es compara espècies ambientals amb soques tipus de laboratori. S'ha descrit que soques del laboratori o soques clíniques són més resistents a la presència d'oxigen a l'aigua. Per això en aquest estudi s'ha avaluat la persistència de soques ambientals provinents de l'aigua residual i s'han comparat amb les soques tipus *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron*. A la vegada, també s'ha fet el seguiment dels indicadors clàssics de la contaminació fecal: coliformes i enterococs fecals.

La recuperació de *Bacteroides* spp. mitjançant el medi selectiu BBE mostra una major capacitat de supervivència a l'estiu que no pas al hivern (taula 5.15). Aquesta mateixa tendència s'havia observat en *B. thetaiotaomicron* i el contrari en *B. fragilis* (Taula 5.10). Durant l'estiu s'han obtingut uns valors de T_{90} entre 57,14 i 36,23 h, amb excepció de l'estiu 1 que presenta un valor més pròxim als obtinguts durant l'hivern (T_{90} de l'estiu 1 = 20,04 h; T_{90} de l'hivern = 21,98 i 20,66 h). En l'assaig realitzat a l'estiu 1, es va registrar unes concentracions d'oxigen dissolt entre 6,2 i 9,4 ppm (Taula 5.6). Aquest valors són més pròxims als obtinguts durant l'hivern que no a temperatures més càlides com les dels estius 3 i 4. Per tant, la concentració d'oxigen dissolt a l'aigua podria ser un factor que pot condicionar de manera important la inactivació de *Bacteroides* spp. Aquesta afirmació es veu confirmada mitjançant una recta de regressió lineal que correlaciona negativament una major presència d'oxigen a l'aigua amb una menor T_{90} (P-valor 0,0598).

Quan es compara les diferents espècies de *Bacteroides* estudiades s'observa que:

→ durant l'estiu les soques ambientals de *Bacteroides* spp. són les que presenten una major persistència (quan s'avalua en el medi BBE i amb excepció d'estiu 1), seguides de les soques tipus de *B. fragilis* en aigua estèril, de *B. thetaiotaomicron* i de *B. fragilis*.

→ en canvi durant l'hivern, les soques tipus de *B. fragilis* tant en aigua autoclavada com sense autoclavar, perdura més que no pas les soques ambientals, i aquestes que *B. thetaiotaomicron*.

Aquests resultats difereixen d'un dels pocs estudis que avaluen la persistència de soques de *Bacteroides* spp. aïllades de femtes paral·lelament amb *B. fragilis*. L'estudi es va realitzar analitzant la seva persistència en l'aigua de beguda (ambient oligotròfic) a diferents temperatures; i el mètode utilitzat fou la tinció de cèl·lules viables i no viables amb el mètode SYTOX[®] Green i detecció de *Bacteroides* amb la tècnica FISH. Per tant, el disseny de l'experiment i la metodologia han estat diferents a les utilitzades en aquest estudi. Van obtenir que en ambdós casos les poblacions eren inactivades més ràpidament com més alta era la temperatura, però es podien detectar cèl·lules viables de *B. fragilis* durant més temps: 48 h. En canvi, es detectava *Bacteroides* spp. d'origen ambiental només, durant les primeres 4 h (Savichtcheva, O. et al, 2005). Anteriorment ja s'havia descrit una major capacitat de resistència a l'oxigen de les soques clíniques en front de les soques d'origen fecal (Rolfe, R.D. et al, 1978).

Sembla doncs, que la persistència de *Bacteroides* spp. hauria de ser menor a l'obtinguda amb la soca tipus de *B. fragilis*. Aquests resultats es comporten així durant l'hivern, però no a l'estiu ni a la primavera. Aquest fet es pot deure tan a l'actuació d'altres factors ambientals com a interferències de la microbiota de l'aigua residual que pugui créixer en el medi BBE, o algunes espècies del gènere *Bacteroides* que no puguin fer-ho.

La major persistència durant l'estiu i la primavera de les soques ambientals, també es podria explicar com una millor adaptació d'aquestes soques a una temperatura elevada i a la presència de depredadors al medi. Els depredadors són més actius a elevades temperatures i les soques tipus serien més vulnerables a ser depredades. Ara bé, a partir d'una determinada temperatura, podria augmentar substancialment l'activitat fotosintètica, i així incrementar la concentració d'oxigen produint-se aleshores un ambient menys adient pel gènere *Bacteroides*.

Quan s'analitza el creixement de *Bacteroides* amb la tècnica BPRM/HC, s'obté uns valors de les enumeracions i de les T_{90} força elevats (entre 119,05 i 181,82 h) que s'allunyen dels valors obtinguts mitjançant el medi BBE (Taula 5.15) i la PCR-Q (Taula 5.16). Aquestes observacions confirmarien la hibridació colonial com a tècnica poc robusta per a la detecció de *Bacteroides* spp. El BPRM sense l'addició d'antibiòtics és un medi ric en el qual hi pot créixer una gran diversitat de microorganismes anaerobis i aerobis facultatius presents a l'aigua residual i en l'aigua de riu on s'havia diluït. Per tant, pot haver-hi interferències de la població acompanyant que emmascarin els resultats de *Bacteroides*.

En aquest estudi els coliformes fecals, enumerats en el medi agar mFC, persisteixen més a l'estiu que no pas al hivern. Durant l'estiu els recomptes es mantenen més o menys constants durant les 168h que s'ha realitzat l'experiment, fins hi tot, s'observa un increment dels valors en alguns casos (Taula 5.13.a), obtenint-se una T_{90} mitjana de 118,9 h. Per contra, durant l'hivern la població va disminuint de forma lenta i gradual (T_{90} mitjana de 88,1 h) i a la primavera s'obté un valor de T_{90} intermedi entre les dos anteriors estacions (T_{90} de 92,6 h).

En un estudi anterior del grup dut a terme, també, a la planta potabilitzadora d'Abrera en les mateixes condicions, es va registrar una T_{90} a l'estiu de 90,5-94,3 h i al hivern de 112,5 h (Bonjoch, X., 2004a). Resultats semblants es van obtenir en un altre estudi en que a una temperatura de 15-20°C es va calcular una T_{90} de 82,3 h i a 8-10°C de 115 h (Sinton, L.W. et al, 1994). En un estudi en mesocosmos realitzats en clima subtropical (temperatura ambiental de 20-30°C) es va calcular una T_{90} de 88,8 h (Anderson, K.L. et al, 2005). Un altre estudi realitzat analitzant la persistència en microcosmos al laboratori a 4, 10, 20 i 30°C, va mostrar una persistència més gran dels coliformes fecals quan es mantenien a 10°C, mentre que a 4°C persistien menys que a 20 i 30°C (Okabe, S. et al, 2007b).

Quan s'observa els resultats mostrats a la taula 5.13.a s'observa que a les 24 h de l'estiu 3 i 4 el recompte és superior que al temps 0, el que podria fer suposar que existís un possible creixement. Aquest fet ja ha estat descrit en certs ambients tropicals i subtropicals (Carrillo, M. et al, 1985; Desmarais, T.R. et al, 2002). Ara bé, aquest increment dels valors cal associar-lo més a una baixa especificitat del medi mFC quan la temperatura del medi és elevada. Varis estudis han descrit que aquest medi en ambients tropicals i subtropicals presenten una elevada recuperació d'altres microorganismes sent un dels medis menys selectius per aquest fi (Chao, K.K. et al, 2003; Santiago-Mercado, J. et al, 1987; Schraft, H. et al, 2005).

Els enterococs fecals presenten una major persistència al hivern (T_{90} 108,7-123,3 h) que a l'estiu (T_{90} 24,1-31,3 h) i a la primavera s'observa una T_{90} intermèdia (54,94 h). Aquests resultats estan més d'acord amb els obtinguts anteriorment pel grup quan es va observar una T_{90} entre 125-151,5h al hivern i al voltant de les 37 h a l'estiu (Bonjoch, X., 2004a). També s'havia observat que durant l'hivern la reducció dels coliformes fecals i enterococs és més o menys similar. Alguns autors han indicat que durant l'estiu els enterococs s'inactiven molt més ràpidament (Anderson, K.L. et al, 2005; Sinton, L.W. et al, 2002). La situació canvia quan es parla de la persistència en aigua de mar, llavors els enterococs persisteixen més que no ho fan els coliformes fecals, ja que presenten una major tolerància a la concentració de sals (Noble, R.T. et

al, 2004; Sinton, L.W. et al, 2002) i probablement espècies que puguin interferir en l'agar mFC estiguin inhibides per l'elevada concentració salina.

5.4.2.4 Persistència al medi de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* com a marcadors moleculars de la contaminació fecal a l'aigua

Diferents espècies de *Bacteroides* poden presentar un comportament fisiològic diferent ja que poden presentar diferent vulnerabilitat als factors ambientals. La degradació del material genètic, però, presenta un comportament més similar. S'ha detectat el material genètic de les soques tipus de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* de les diferents mostres obtingudes dels experiments *in situ* (assaig 1.a, 1.b i 2) mitjançant una PCR amb els iniciadors Bac32/708 (Bernhard, A.E. et al, 2000a). A la taula 4.20 es mostra les hores durant les quals s'ha detectat aquestes espècies.

Taula 5.20 Període de temps (h) durant el qual s'ha detectat les poblacions dels assaigs 1 i 2 mitjançant una PCR amb els iniciadors Bac32/Bac708

	Estiu 1 i 2	Estiu 3 i 4	Primavera	Hivern
<i>B. thetaiotaomicron</i>	12-48 h	24 h	48 h	>216 h
<i>B. fragilis</i>	48 h	72 h	72 h	>216 h
<i>B. fragilis</i> en aigua estèril	48 h	72-48 h	>216 h	>192 h

A més elevada temperatura, l'ADN es degrada més fàcilment. Així durant l'estiu 1 i 2 (excepte *B. thetaiotaomicron* a l'estiu 1), amb una temperatura al voltant dels 30°C, es pot detectar durant menys temps que a l'estiu 3 i 4, en que s'ha registrat una temperatura al voltant de 22°C. A la primavera es comporta de manera més semblant a l'estiu que no pas al hivern. El fet que els assaigs es realitzin en aigua estèril no afecta la degradació de l'ADN amb l'excepció de la primavera que en aquest cas es pot detectar el material genètic durant tota la durada de l'experiment, igual que l'hivern.

La detecció de *P. distasonis* provinents de femtes va mostrar un temps de detecció semblant a l'obtingut en aquest estudi per *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* (Kreader, C.A., 1998). En aquest cas es va realitzar l'experiment *in situ* en càmeres de difusió amb porus de 45 µm i la tècnica de detecció va ser una PCR amb iniciadors específics i confirmació de l'amplificat amb una sonda també específica. Es va detectar el material amplificat durant 24-48 h quan la temperatura era de 26-28°C, durant 48 h quan era de 22-24°C i 96-120 h quan era 14°C. Si la persistència s'avaluava en

microcosmos al laboratori es podia detectar la presència de l'ADN durant més temps (24 h a 30°C, 24-48 h a 24°C, 144 h a 14°C i 336 h a 4°C) (Kreader, C.A., 1998).

La detecció mitjançant una PCR-Q a temps real permet detectar i a la vegada quantificar, la persistència de l'ADN. D'aquesta manera es pot conèixer la concentració inicial d'ADN i la seva dinàmica de degradació. La PCR-Q detecta aproximadament el mateix nombre inicial d'UFC/100ml que mitjançant els recomptes en els medis BBE i BPRM (Taules 5.7 i 5.8).

El límit de quantificació de la PCR-Q és de 4,75 unitats logarítmiques d'UFC/100ml, tot i que una unitat logarítmica menys pot ser detectada però la seva quantificació queda compromesa per estar fora dels límits de quantificació. Els valors obtinguts a l'estiu a partir de les 48 h estan per sota del límit de detecció així que la quantificació obtinguda a partir de llavors no es pot considerar com a correcta.

Durant l'estiu s'obté una T_{90} mitjana de *B. fragilis* obtinguda mitjançant PCR-Q de 11,2 h i de 12 h per *B. thetaiotaomicron*. Quan es realitza l'anàlisi de *B. fragilis* en aigua estèril s'obté una T_{90} mitjana lleugerament superior a 15,2 h. Durant l'hivern s'obté una T_{90} de 42 h en *B. fragilis*, de 66,6 h quan s'utilitza aigua estèril i 47,3 h en *B. thetaiotaomicron*. La temperatura registrada al hivern 2 és lleugerament més alta que al hivern 1 i s'obtenen unes T_{90} una mica més baixes (taula 5.10). Per tant, la degradació de l'ADN està relacionat amb la temperatura del medi i no depèn de la fisiologia de l'espècie. La presència de depredadors juga un paper discret en aquest cas, ja que en l'assaig 2 (aigua estèril) s'obté una T_{90} mitjana lleugerament més alta que en l'assaig 1.a (aigua de riu).

També s'han realitzat estudis per altres autors avaluant la persistència de *Bacteroides* spp. mitjançant la PCR-Q a temps real. Tot i que el disseny dels experiments és molt diferent del realitzat en aquest estudi, també, observen un increment del temps de detecció de marcadors moleculars per *Bacteroides* spp. a mesura que disminueix la temperatura. S'ha analitzat el grup *Bacteroides-Prevotella* utilitzant una PCR-Q amb el fluoròfor SYBR-Green. El inòcul inicial ha consistit en femtes resuspeses en aigua de riu i l'experiment es va realitzar en microcosmos al laboratori a diferents temperatures, per tant, avaluant solament el factor temperatura. Les T_{90} obtingudes foren de 33,8 h a 30°C, de 40,6 h a 20°C, 99,8 h a 10°C i 398 h a 4°C el que mostra una relació inversament proporcional amb la temperatura. Un segon estudi, va avaluar el marcador HF183, indicadors de contaminació fecal humana (Bernhard, A.E. et al, 2000b), avaluant una dilució d'aigua residual en aigua de riu,

també en microcosmos a diferents temperatures (Seurinck, S. et al, 2005a). Es va detectar el marcadors durant un temps molt elevat: 192 h a 28°C i 576 h a 12 i 4°C.

En aquest estudi, l'anàlisi de soques ambientals de *Bacteroides* avaluades en l'assaig 3 (dilució de l'aigua residual) va donar negatiu per totes les mostres analitzades mitjançant la PCR convencional. Per tant, o la tècnica no és suficientment sensible per a detectar la concentració d'ADN de *Bacteroides* o bé la presència d'inhibidors de la PCR ha inhibit la reacció. La quantificació de l'ADN del gènere *Bacteroides* mitjançant la PCR-Q en les mostres de l'assaig 3 ha permès detectar inicialment una concentració que correspon a 4-4,6 unitats logarítmiques de UFC/100 ml durant l'estiu i 5,1-5,5 unitats logarítmiques de UFC/100 ml al hivern. Per tant la quantitat d'ADN dels *Bacteroides* spp. de l'aigua residual està entre els límits de la tècnica. Durant l'hivern la PCR-Q detecta una disminució gradual de l'ADN de les mostres de l'assaig 3 (Taula 5.16). En canvi durant l'estiu la quantitat d'ADN detectada incrementa de manera suau fins a assolir al final de l'experiment un increment de 2 unitats logarítmiques més. Això fa pensar en una possible inespecificitat de la PCR-Q i que durant l'estiu pugui haver-hi microbiota autòctona o al·lòctona del riu que pugui interferir. Tot i que un estudi s'ha descrit creixement de *Bacteroides* spp. a l'aigua durant les primeres 24 h d'arribar al medi aquàtic (Walters, S.P. et al, 2006), caldria confirmar aquestes observacions ja que les condicions ambientals no faciliten el recreixement de *Bacteroides* spp.

5.4.3 *Persistència de B. fragilis i B. thetaiotaomicron en microcosmos al laboratori*

Els mètodes d'estudi de la persistència *in situ* permeten la reproducció de les condicions a que està sotmès un microorganisme quan arriba al medi. Al medi ambient, però, hi intervenen factors complexos que s'interelacionen entre ells i per tant és difícil poder valorar quin és el seu efecte en la persistència de les poblacions. La temperatura s'ha descrit com un dels factors més influents en la inactivació dels microorganismes. Els assaig *in situ* han confirmat la importància de la temperatura i de l'oxigen dissolt a l'aigua en la persistència de *Bacteroides* spp., per tant, s'ha volgut valorar l'efecte de la temperatura prescindint de la resta de factors. Per això s'ha avaluat la supervivència de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* en microcosmos en condicions controlades al laboratori.

Els assaigs realitzats en microcosmos permeten analitzar les diferències de persistència entre temperatures. Aquests assaigs mostren en el cas de *B. fragilis* una menor persistència a 30°C que a 22°C, les temperatures més baixes presenten una T₉₀

molt elevada que supera el temps que ha durat l'experiment (216 h). Els microcosmos mantinguts al laboratori permeten a les poblacions sobreviure més que no pas els experiments *in situ* ja que no hi existeix ni el flux hidràulic del riu, ni la radiació ni els canvis d'oxigen dissolt a l'aigua i altres factors ambientals que poden afectar la supervivència (McFeters, G.A. et al, 1982).

S'ha realitzat microcosmos utilitzant aigua de riu i aigua de riu esterilitzada per tal de poder avaluar també, l'efecte dels depredadors. La major persistència de *B. fragilis* observada en els assaigs *in situ* quan s'utilitza aigua a la que s'han eliminat els depredadors també s'observa als microcosmos experimentals. Per tant la depredació, com la temperatura afecta la persistència de *B. fragilis* quan arriba al medi ambient.

Els experiments realitzats per a estudiar la persistència de *B. thetaiotaomicron* en microcosmos mostren un comportament diferent a l'observat en els assaigs realitzats *in situ*. El factor temperatura afecta per si sol la persistència de *B. thetaiotaomicron* de la mateixa manera que afecta a *B. fragilis* (a major temperatura hi ha una menor persistència de les poblacions), tot i que perduren menys temps respecte *B. fragilis*. Quan els microorganismes arriben al medi ambient hi intervenen molts altres factors que poden emascarar els possibles efectes de la temperatura com per exemple la concentració d'oxigen dissolt. Per tant, tot i que en condicions controlades al laboratori diferents espècies poden presentar comportaments similars, quan arriben al medi es poden comportar de forma diferent.

En el cas de *B. thetaiotaomicron*, no es va avaluar la presència/absència de depredadors en els assaigs *in situ* però sí que s'ha tingut en compte en els microcosmos. En els assajos en condicions controlades al laboratori, existeix un efecte important de la depredació, ja que quan es realitzen utilitzant aigua estèril, la població triga aproximadament 3 dies més a disminuir el 90% del seu número inicial de cèl·lules.

Els microcosmos experimentals mantinguts a diferents temperatures al laboratori confirmen la importància del factor temperatura en la persistència de les poblacions del gènere *Bacteroides* que s'ha observat en els experiments *in situ*. La supervivència de les poblacions disminueix a mesura que incrementa la temperatura del medi.

Els experiments realitzats *in situ* mostren com la influència d'altres factors, principalment la concentració d'oxigen dissolt a l'aigua poden modular i fins hi tot alterar la persistència al medi. El comportament de *B. thetaiotaomicron* en els anàlisis

in situ difereixen de l'observat mitjançant els microcosmos. En aquest cas la supervivència és menor al hivern que a l'estiu. L'hivern coincideix amb una major concentració d'oxigen dissolt a l'aigua a la que *B. thetaiotaomicron* és més vulnerable que *B. fragilis*.

La importància de l'oxigen dissolt a l'aigua és fa palesa a l'assaig 2 on s'ha eliminat els depredadors del medi i per tant només modularan la supervivència els factors fisicoquímics. Una regressió lineal múltiple mostra com els dos factors conjuntament (oxigen dissolt i temperatura) influeixen significativament en la inactivació. Un increment dels dos factors (principalment l'oxigen dissolt) augmenten el decreixement de les poblacions.

Els depredadors també juguen un paper força important en la inactivació de *Bacteroides* spp. Tant els assaigs en microcosmos com *in situ* constaten aquest fet. L'activitat dels depredadors té una major incidència a l'estiu que al hivern quan en aquest últim cas una disminució de la temperatura disminueix la seva activitat.

Diferents soques (*B. fragilis* (DSM 2151^T), *B. thetaiotaomicron* (DSM 2079^T) i soques de *Bacteroides* spp. ambientals) poden presentar diferent comportament un cop arriben al medi ambient segons el grau d'adaptació a la concentració d'oxigen del medi, a diferents temperatures o la presència de depredadors.

Tant les metodologies de cultiu com moleculars poden presentar algunes limitacions alhora d'estudiar les poblacions. La selectivitat del medi BBE pot dificultar en condicions d'estrès la recuperació de determinades espècies el que pot portar a subestimar el seu número. La recuperació en un medi ric i la posterior confirmació de les colònies amb una sonda específica pot portar sobreestimar el número de la població degut a interferències amb la microbiota acompanyant. Finalment la tècnica de la PCR-Q mostra uns bons resultats quan existeix un elevat número de *Bacteroides* spp. al medi. Tot i així en el bloc 3 on s'analitza una dilució 1:50 de l'aigua residual el número de microorganismes es troba al voltant del límit de detecció de la tècnica, fet que cal tenir en compte quan s'estudia mostres ambientals.

Conclusions

1. L'aplicació individual o combinada dels marcadors moleculars utilitzats que es basen en la detecció per PCR no permeten discriminar totalment l'origen de la contaminació fecal a l'aigua.
2. Els marcadors basats en la detecció de *Bif. adolescentis*, d'ADN mitocondrial de porcins, humans i bovins, i de *Bif. dentium*, en aquest ordre, són els que presenten una major sensibilitat. Presenten, també, una bona especificitat exceptuant el marcador d'ADN mitocondrial humà que pot presentar falsos positius per la possibilitat de contaminació de les mostres.
3. L'aplicació de models numèrics mostra un 79,5% de probabilitat d'encert per a detectar l'origen de la contaminació fecal entre diversos orígens quan s'utilitza el mètode lineal LDA implicant 7 marcadors moleculars. La utilització d'un arbre de decisió que considera els casos perduts disminueix l'encert a un 74,3%, però utilitza tan sols 3 marcadors.
4. És possible la discriminació entre contaminació fecal humana i no humana amb un encert del 90,1% quan s'utilitzen 5 marcadors moleculars (mètode quadràtic QDA) o a 85,3% utilitzant dos marcadors amb l'arbre de decisió que considera els casos perduts.
5. S'ha diferenciat diferents comunitats de bifidobacteris que habiten a les aigües residuals d'origen humà, boví, porcí i avícola, presentant diferents perfils de bandes per la tècnica de DGGE.
6. El perfil de DGGE que de manera majoritària es troba en la comunitat de bifidobacteris en aigües residuals urbanes, està constituït principalment per les espècies *Bif. adolescentis*, *Bif. longum* i dues espècies no cultivades.
7. Només s'ha pogut detectar una sola banda de DGGE en les aigües residuals provinents d'escorxadors d'aus que presenta una elevada similitud amb *Bif. saeculare* per comparació de les seqüències del gen del 16S ARNr.
8. Existeix una heterogeneïtat en els perfils de bandes de DGGE observats en les comunitats de bifidobacteris d'origen porcí, el que ens indica una elevada diversitat d'espècies. Algunes de les espècies identificades més destacables són: *Bif. minimum*, *Bif. longum*, *Bif. thermophilum* i *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum*, *Bif. merycicum*. A més a més, dues espècies addicionals no han presentat similitud

amb cap de les espècies dipositades a les bases de dades de seqüències d'àcids nucleics.

9. Les comunitats de bifidobacteris d'origen boví també presenten una elevada heterogeneïtat de perfils de bandes de DGGE. Les espècies identificades associades a les bandes majoritàries són: *Bif. ruminantium*, *Bif. adolescentis*, *Bif. merycicum*, *Bif. pseudolongum*, *Bif. thermophilum* i *Bif. thermacidophilum* ssp. *porcinum*.
10. Algunes de les espècies detectades per la DGGE resulten ser de difícil detecció per aïllament en medis de cultiu. Aquesta desviació ens confirma les diferències que es poden obtenir quan s'estudia la diversitat microbiana per tècniques moleculars o per tècniques dependents de cultiu.
11. És possible associar determinats patrons o bandes de DGGE a orígens específics de contaminació fecal.
12. S'ha establert que la PCR-Q descrita per Layton i col·laboradors (2006) es mostra una bona eina per a la quantificació del gènere *Bacteroides*, presentant un límit de quantificació de 2,21 còpies del 16S ARNr/ μ l o de $2,79 \cdot 10^1$ UFC/ml utilitzant patrons experimentals. No obstant, el límit de detecció per mostres ambientals està molt per sobre del límit de quantificació ($2,79 \cdot 10^4$ UFC/ml). Una millora de la detecció estaria associada a la millora de l'eficiència del kit d'extracció utilitzat.
13. La presència de depredadors a l'aigua és un dels factors que més intervé a la disminució de la persistència de les soques tipus de *B. fragilis* i *B. thetaiotaomicron* en condicions *in situ*. La inactivació per depredació és més alta quan incrementa la temperatura.
14. La presència d'una elevada concentració d'oxigen a l'aigua i una elevada temperatura actuen conjuntament disminuint la persistència de soques de *B. fragilis* cultivables a l'aigua.
15. La persistència de soques cultivables de *B. thetaiotaomicron* en condicions *in situ*, es veu més afectada per la presència d'una elevada concentració d'oxigen a l'aigua (més elevada durant l'hivern) que no pas per la temperatura. Tot i així l'estudi de la persistència d'aquesta soca en microcosmos a diferents temperatures mostra que la temperatura també és un factor determinant.

16. Les soques ambientals de *Bacteroides* presenten una major sensibilitat a una elevada concentració d'oxigen a l'aigua. Això permet recuperar-les per cultiu durant un període més prolongat de temps a l'estiu que al hivern.
17. La persistència de l'ADN de *Bacteroides* spp. a l'estiu és més curta (24-72 h) que al hivern (192-216 h) independentment de la soca o de l'espècie analitzada.

Bibliografia

- Ahmed, W., Stewart, J., Gardner, T., Powell, D., Brooks, P., Sullivan, D., i Tindale, N.** 2007. Sourcing faecal pollution: a combination of library-dependent and library-independent methods to identify human faecal pollution in non-sewered catchments. *Water Res.* **41**:3771-3779.
- Ahmed, W., Stewart, J., Powell, D., i Gardner, T.** 2008. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**:237-242.
- Allsop, K. i Stickler, D. J.** 1984. The enumeration of *Bacteroides fragilis* group organisms from sewage and natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* **56**:15-24.
- Allsop, K. i Stickler, D. J.** 1985. An assessment of *Bacteroides fragilis* group organisms as indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* **58**:95-99.
- Altschul, S. F., Boguski, M. S., Gish, W., i Wootton, J. C.** 1994. Issues in searching molecular sequence databases. *Nat. Genet.* **6**:119-129.
- Anderson, K. L., Whitlock, J. E., i Harwood, V. J.** 2005. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3041-3048.
- Anònim.** 1998. Directriu 98/83/CE del Consell de 3 de novembre de 1998 relativa a la qualitat de les aigües destinades al consum humà. L 330/32-L 330/54.
- Anònim.** 2003. Reial Decret 140/2003 de 7 de febrer, pel qual s'estableixen els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà. 7228-7245.
- Anònim.** 2006a. Directriu 2006/7/CE del Parlament Europeu i del Consell de 15 de febrer de 2006 relativa a la qualitat de les aigües de bany i es deroga la Directiva 76/160/CEE.L 64/37-L 64/51.
- Anònim.** 2006b. *Microbial Aspects.* **3**:121-144.
- Anònim.** 2007a. Reial Decret 1341/2007, de 11 d'octubre, sobre la gestió de la qualitat de les aigües de bany.
- Anònim.** 2007b. Reial Decret 1620/2007, de 7 de desembre, sobre el règim jurídic de la reutilització de les aigües depurades.
- Applied Biosystem.** 2002. TaqMan Universal PCR Mater Mix. Protocol Applied Biosystem.
- Arnold, C., Metherell, L., Willshaw, G., Maggs, A., i Stanley, J.** 1999. Predictive fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli*: high-resolution typing method with phylogenetic significance. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1274-1279.
- Atlas, R. i Bartha, R.** 2001. *Ecologia Microbiana y Ambiental.* **1**
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schloter, M., i Munch, J. C.** 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J. Microbiol. Methods.* **49**:235-245.
- Barcina, I., Lebaron, P., i Vives-Rego, J.** 1997. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *Fems Microbiology Ecology.* **23**:1-9.
- Bartram, J.** 2002. *Water and Health in Europe. WHO Regional Publications European Series, No 93*

- Baughn, A. D. i Malamy, M. H.** 2004. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature*. **427**:441-444.
- Beerens, H.** 1991. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2418-2419.
- Beerens, H.** 1998. Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. **40**:203-207.
- Ben Abdallah, F., Lagha, R., i Bakhrouf, A.** 2007. Resuscitation and morphological alterations of *Salmonella bovismorbificans* cells under starvation in soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Bernhard, A. E. i Field, K. G.** 2000a. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1587-1594.
- Bernhard, A. E. i Field, K. G.** 2000b. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4571-4574.
- Besnard, V., Federighi, M., i Cappelier, J. M.** 2000. Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**:77-81.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., i Bottazzi, V.** 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*. **50**:117-131.
- Biavati, B. i Mattarelli, P.** 2006. The Family Bifidobacteriaceae. 322-382.
- Blanch, A. R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G., Taylor, H. D., Wallis, J., i Jofre, J.** 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *J. Water Health*. **2**:249-260.
- Blanch, A. R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G. T., Taylor, H., Wallis, J., i Jofre, J.** 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5915-5926.
- Boehm, A. B., Fuhrman, J. A., Mrse, R. D., i Grant, S. B.** 2003. Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. *Environ. Sci. Technol.* **37**:673-680.
- Bonjoch, X.** 2004a. Inactivació natural "in situ" de diferents poblacions bacterianes en aigua de riu: avaluació mitjançant diferents tècniques metodològiques. 149-208.
- Bonjoch, X.** 2004b. Anàlisi del gen del 16S rRNA mitjançant PCR múltiple amb iniciadors específics de *Bifidobacterium* spp. per a la identificació de l'origen de la contaminació fecal. 81-116.
- Bonjoch, X., Balleste, E., i Blanch, A. R.** 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3171-3175.
- Bower, P. A., Scopel, C. O., Jensen, E. T., Depas, M. M., i McLellan, S. L.** 2005. Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in Lake Michigan and determination of their

- relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods. Appl. Environ. Microbiol. **71**:8305-8313.
- Brownell, M. J., Harwood, V. J., Kurz, R. C., McQuaig, S. M., Lukasik, J., i Scott, T. M.** 2007. Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. Water Res. **41**:3747-3757.
- Caldwell, J. M., Raley, M. E., i Levine, J. F.** 2007. Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. Environ. Sci. Technol. **41**:3277-3283.
- Candela, M., Vitali, B., Matteuzzi, D., i Brigidi, P.** 2004. Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. Lett. Appl. Microbiol. **38**:229-232.
- Carraro, E., Bonnetta, S., Palumbo, F., i Gilli, G.** 2004. Microbiological risk associated with consumption of drinking water in developed countries. Ann Ist Super Sanita. **40**:117-140.
- Carrillo, M., Estrada, E., i Hazen, T. C.** 1985. Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. Appl. Environ. Microbiol. **50**:468-476.
- Carson, C. A., Shear, B. L., Eilersieck, M. R., i Asfaw, A.** 2001. Identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals by ribotyping. Appl. Environ. Microbiol. **67**:1503-1507.
- Carson, C. A., Christiansen, J. M., Yampara-Iquise, H., Benson, V. W., Baffaut, C., Davis, J. V., Broz, R. R., Kurtz, W. B., Rogers, W. M., i Fales, W. H.** 2005. Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces. Appl. Environ. Microbiol. **71**:4945-4949.
- Castillo Gómez, M. S.** 2006. Development of gut microbiota in the pig: modulation of bacterial communities by different feeding strategies. Tesi doctoral UAB.
- Cerdeno-Tarraga, A. M., Patrick, S., Crossman, L. C., Blakely, G., Abratt, V., Lennard, N., Poxton, I., Duerden, B., Harris, B., Quail, M. A., Barron, A., Clark, L., Corton, C., Doggett, J., Holden, M. T., Larke, N., Line, A., Lord, A., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Rabbinowitsch, E., Woodward, J., Barrell, B., i Parkhill, J.** 2005. Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression. Science. **307**:1463-1465.
- Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Grim, C., Maugel, T., Huq, A., i Colwell, R. R.** 2007. Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Environ. Microbiol. **9**:393-402.
- Chan, P. C. K. i Porschen, R. K.** 1977. Evaluation of Kanamycin-Esculin Bile Agar for isolation and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. Journal of Clinical Microbiology. **6**:528-529.
- Chao, K. K., Chao, C. C., i Chao, W. L.** 2003. Suitability of the traditional microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal pollution of subtropical freshwater environments. J. Microbiol. Immunol. Infect. **36**:288-293.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., i Collins, J. K.** 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. International Journal of Food Microbiology. **35**:1-27.
- Chevalier, P., Roy, D., i Savoie, L.** 1991. X-Alpha-Gal-based medium for simultaneous enumeration of Bifidobacteria and lactic-acid bacteria in milk. Journal of Microbiological Methods. **13**:75-83.

- Choi, S., Chu, W., Brown, J., Becker, S. J., Harwood, V. J., i Jiang, S. C.** 2003. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. *Mar. Pollut. Bull.* **46**:748-755.
- Cimenti, M., Hubberstey, A., Bewtra, J. K., i Biswas, N.** 2007. Alternative methods in tracking sources of microbial contamination in waters. *Water Sa.* **33**:183-194.
- Clesceri, L. S.** 1998. Standard methods for examination of water and wastewater.
- Close, M., Hodgson, L., i Tod, G.** 1989. Field evaluation of fluorescence whitening agents and sodium tripolyphosphate as indicators of septic tank contamination in domestic wells. *NZ H Mar Freshw Res.* **32**:323-348.
- Cole, D., Long, S. C., i Sobsey, M. D.** 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl. and Environ. Microbiol.* **69**:6507-6514.
- Colwell, R. R.** 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science.* **274**:2025-2031.
- Costa, J.** 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**:299-304.
- Craig, D. L., Fallowfield, H. J., i Cromar, N. J.** 2004. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *J. Appl. Microbiol.* **96**:922-930.
- D'Elia, T. V., Cooper, C. R., i Johnston, C. G.** 2007. Source tracking of *Escherichia coli* by 16S-23S intergenic spacer region denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of the *rrnB* ribosomal operon. *Can. J. Microbiol.* **53**:1174-1184.
- Davies-Colley, R. J., Bell, R. G., i Donnison, A. M.** 1994. Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2049-2058.
- Delcenserie, V., Bechoux, N., China, B., Daube, G., i Gavini, F.** 2005. A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods. *J. Microbiol. Methods.* **61**:55-67.
- Desmarais, T. R., Solo-Gabriele, H. M., i Palmer, C. J.** 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1165-1172.
- Dethlefsen, L., Eckburg, P. B., Bik, E. M., i Relman, D. A.** 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* **21**:517-523.
- Dick, L. K. i Field, K. G.** 2004. Rapid estimation of numbers of fecal Bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl. and Environ. Microb.* **70**:5695-5697.
- Dick, L. K., Bernhard, A. E., Brodeur, T. J., Domingo, J. W. S., Simpson, J. M., Walters, S. P., i Field, K. G.** 2005. Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. and Environ. Microbiol.* **71**:3184-3191.
- Dicuonzo, G., Gherardi, G., Lorino, G., Angeletti, S., Battistoni, F., Bertuccini, L., Creti, R., Di Rosa, R., Venditti, M., i Baldassarri, L.** 2001. Antibiotic resistance and genotypic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. *Fems Microbiology Letters.* **201**:205-211.
- Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., Robinson, K. G., i Sayler, G. S.** 2003. Power analysis for real-time PCR quantification of genes in

- activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6597-6604.
- Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., i Sadowsky, M. J.** 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR To differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2572-2577.
- Dong, X. Z., Xin, Y. H., Jian, W. Y., Liu, X. L., i Ling, D. W.** 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **50**:119-125.
- Donskey, C. J., Hujer, A. M., Das, S. M., Pultz, N. J., Bonomo, R. A., i Rice, L. B.** 2003. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J. Microbiol. Methods.* **54**:249-256.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., i Relman, D. A.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* **308**:1635-1638.
- EPA.** 2005. Microbial Source tracking ghide. Document EPA/600/R-05/064.
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., i Torriani, S.** 2003. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology.* **82**:59-70.
- Favier, C. F., de Vos, W. M., i Akkermans, A. D.** 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe.* **9**:219-229.
- Feachem, R. G.** 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res.* **9**:689-690.
- Field, K. G., Bernhard, A. E., i Brodeur, T. J.** 2003. Molecular approaches to microbiological monitoring: Fecal source detection. *Environmental Monitoring and Assessment.* **81**:313-326.
- Field, K. G.** 2005. Faecal Source Identification. 349-366.
- Figueras, M. J., Inza, I., Polo, F., i Guarro, J.** 1998. Evaluation of the oxolinic acid--esculin--azide medium for the isolation and enumeration of faecal streptococci in a routine monitoring programme for bathing waters. *Can. J. Microbiol.* **44**:998-1002.
- Fiksdal, L., Maki, J. S., LaCroix, S. J., i Staley, J. T.** 1985. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:148-150.
- Flint, K. P.** 1987. The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J. Appl. Bacteriol.* **63**:261-270.
- Fogarty, L. R. i Voytek, M. A.** 2005. Comparison of *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for fecal samples from different animal species. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5999-6007.
- Foppen, J. W. i Schijven, J. F.** 2006. Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions. *Water Res.* **40**:401-426.
- Fujimoto, C., Maeda, H., Kokeguchi, S., Takashiba, S., Nishimura, F., Arai, H., Fukui, K., i Murayama, Y.** 2003. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque. *J. Periodontal Res.* **38**:440-445.
- Furuse, K., Osawa, S., Kawashiro, J., Tanaka, R., Ozawa, A., Sawamura, S., Yanagawa, Y., Nagao, T., i Watanabe, I.** 1983. Bacteriophage distribution in human feces - continuous

survey of healthy-subjects and patients with internal and leukemic diseases. *Journal of General Virology*. **64**:2039-2043.

Garcia-Aljaro, C. 2004. Detección del gen *stx2* en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad.

Gardner-Outlaw, T. i Engelman, R. 1997. Sustaining water, easing scarcity.

Gavini, F., Pourcher, A. M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C., i Izard, D. 1991. Phenotypic differentiation of *Bifidobacteria* of human and animal origins. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **41**:548-557.

Gavini, F., VanEsbroeck, M., Touzel, J. P., Fourment, A., i Goossens, H. 1996. Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the bifid-shunt, in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe*. **2**:191-193.

Gavini, F., Delcenserie, V., Kopeinig, K., Pollinger, S., Beerens, H., Bonaparte, C., i Upmann, M. 2006. *Bifidobacterium* species isolated from animal feces and from beef and pork meat. *Journal of Food Protection*. **69**:871-877.

Gawler, A. H., Beecher, J. E., Brandao, J., Carroll, N. M., Falcao, L., Gourmelon, M., Masterson, B., Nunes, B., Porter, J., Rince, A., Rodrigues, R., Thorp, M., Walters, J. M., i Meijer, W. G. 2007. Validation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res.* **41**:3780-3784.

Geldreich, E. E. i Kenner, B. A. 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *Journal Water Pollution Control Federation*. **41**:R336.

Gilpin, B., James, T., Nourozi, F., Saunders, D., Scholes, P., i Savill, M. 2003. The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification. *Water Science and Technology*. **47**:39-43.

Ginzinger, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* **30**:503-512.

Gong, J., Yu, H., Liu, T., Gill, J. J., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., i Sabour, P. M. 2008. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. *J. Appl. Microbiol.* **104**:1372-82

Gonzalez, J. M., Iriberry, J., Egea, L., i Barcina, I. 1992. Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:998-1004.

Gordon, D. M. 2001. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. *Microbiology*. **147**:1079-1085.

Gourmelon, M., Cillard, J., i Pommepuy, M. 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol.* **77**:105-112.

Gourmelon, M., Caprais, M. P., Segura, R., Le, M. C., Lozach, S., Piriou, J. Y., i Rince, A. 2007. Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4857-4866.

Grabow, W. O., Taylor, M. B., i de Villiers, J. C. 2001. New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines. *Water Sci. Technol.* **43**:1-8.

Griffith, J. F., Weisberg, S. B., i McGee, C. D. 2003. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *J. Water Health*. **1**:141-151.

- Guan, S., Xu, R., Chen, S., Odumeru, J., i Gyles, C.** 2002. Development of a procedure for discriminating among *Escherichia coli* isolates from animal and human sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2690-2698.
- Guarner, F. i Malagelada, J. R.** 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet.* **361**:512-519.
- Gueimonde, M., Tolkko, S., Korpimaki, T., i Salminen, S.** 2004. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl. and Environ. Microbiol.* **70**:4165-4169.
- Haarman, M. i Knol, J.** 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2318-2324.
- Hagedorn, C., Crozier, J. B., Mentz, K. A., Booth, A. M., Graves, A. K., Nelson, N. J., i Reneau, R. B.** 2003. Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *J. of Appl. Microbiol.* **94**:792-799.
- Hagedorn, C., Robinson, S. L., Filtz, J. R., Grubbs, S. M., Angier, T. A., i Reneau, R. B.** 1999. Determining sources of fecal pollution in a rural virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci. *Appl. and Environ. Microbiol.* **65**:5522-5531.
- Hall, T. A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. *Nucleic Acids Symposium Series.*
- Hammerum, A. M. i Jensen, L. B.** 2002. Prevalence of *esp*, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4396
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., i Welling, G. W.** 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**:61-67.
- Hartel, P. G., Summer, J. D., Hill, J. L., Collins, J. V., Entry, J. A., i Segars, W. I.** 2002. Geographic variability of *Escherichia coli* ribotypes from animals in Idaho and Georgia. *Journal of Environmental Quality.* **31**:1273-1278.
- Hartel, P. G., Hagedorn, C., McDonald, J. L., Fisher, J. A., Saluta, M. A., Jr, J. W. D., Gentil, L. C., Smith, S. L., Mantriprayada, N. S., Ritter, K. J., i Belcher, C. N.** 2007. Exposing water samples to ultraviolet light improves fluorometry for detecting human fecal contamination. *Water Research.* **41**:3629-3642.
- Havelaar, A. H., Furuse, K., i Hogeboom, W. M.** 1986. Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal feces. *Journal of Applied Bacteriology.* **60**:255-262.
- Hayashi, Y., Managaki, S., i Takada, H.** 2002. Fluorescent whitening agents in Tokyo Bay and adjacent rivers: Their application as anthropogenic molecular markers in coastal environments. *Environ. Sci. Technol.* **36**:3556-3563.
- Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., i Benno, Y.** 2003. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol. Immunol.* **47**:557-570.
- Hoefel, D., Grooby, W. L., Monis, P. T., Andrews, S., i Saint, C. P.** 2003. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J. Microbiol. Methods.* **55**:585-597.

- Hold, G. L., Pryde, S. E., Russell, V. J., Furrrie, E., i Flint, H. J.** 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *Fems Microbiology Ecology*. **39**:33-39.
- Holdeman, L. V., Good, I. J., i Moore, W. E. C.** 1976. Human fecal flora - variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl. and Environ. Microbiol.* **31**:359-375.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., i Gelfand, D. H.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:7276-7280.
- Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V., i Gordon, J. I.** 2003. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* **4**:269-273.
- Hopkins, M. J., Sharp, R., i Macfarlane, G. T.** 2002. Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig. Liver Dis.* **34 Suppl 2**:S12-S18.
- Hsu, F. C., Shieh, Y. S. C., Vanduin, J., Beekwilder, M. J., i Sobsey, M. D.** 1995. Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3960-3966.
- Isobe, K. O., Tarao, M., Zakaria, M. P., Chiem, N. H., Minh, L. Y., i Takada, H.** 2002. Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography-mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environ. Sci. Technol.* **36**:4497-4507.
- Jagals, P. i Grabow, W. O. K.** 1996. An evaluation of sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution of environmental water. *Water Sa.* **22**:235-238.
- Jamieson, R., Gordon, R., Joy, D., i Lee, H.** 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters. A review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management.* **70**:1-17.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., i Kersters, K.** 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology.* **142**:1881-1893.
- Jeffrey Smith, C., Rocha, E. R., i Paster, B. J.** 2006. The medically important *Bacteroides* spp. in health and disease. 381-427.
- Jenkins, M. B., Hartel, P. G., Olexa, T. J., i Stuedemann, J. A.** 2003. Putative temporal variability of *Escherichia coli* ribotypes from yearling steers. *J. of Environ. Quality.* **32**:305-309.
- Jenkins, M. J., Scott, T. M., Morgan, M. R., i Rose, J. B.** 2005. Occurrence of alternative fecal indicators and enteric viruses in Michigan rivers. *Journal of Great Lakes Research.* **31**:22-31.
- Jimenez-Clavero, M. A., Fernandez, C., Ortiz, J. A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J. V., Roblas, N., i Ley, V.** 2003. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. *Appl. and Environ. Microbiol.* **69**:6311-6315.
- Kaneko, T. i Kurihara, H.** 1997. Digoxigenin-labeled deoxyribonucleic acid probes for the enumeration of bifidobacteria in fecal samples. *J. Dairy Sci.* **80**:1254-1259.
- Kaufmann, P., Pfefferkorn, A., Teuber, M., i Meile, L.** 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1268-1273.

- Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., i Barer, M. R.** 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **73**:169-187.
- Kellogg, D. E., Sninsky, J. J., i Kwok, S.** 1990. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the Polymerase Chain-Reaction. *Analytical Biochemistry*. **189**:202-208.
- Khatib, L. A., Tsai, Y. L., i Olson, B. H.** 2002. A biomarker for the identification of cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **59**:97-104.
- Khatib, L. A., Tsai, Y. L., i Olson, B. H.** 2003. A biomarker for the identification of swine fecal pollution in water, using the STII toxin gene from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **63**:231-238.
- Kildare, B. J., Leutenegger, C. M., McSwain, B. S., Bambic, D. G., Rajal, V. B., i Wuertz, S.** 2007. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach. *Water Research*. **41**:3701-3715.
- King, E. L., Bachoon, D. S., i Gates, K. W.** 2007. Rapid detection of human fecal contamination in estuarine environments by PCR targeting of *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Microbiol. Methods*. **68**:76-81.
- Kocherginskaya, S. A., Aminov, R. I., i White, B. A.** 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe*. **7**:119-134.
- Koeth, T., Versalovic, J., i Lupski, J. R.** 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* Box Elements in Diverse Bacteria. *Genome Research*. **5**:408-418.
- Kreder, C. A.** 1995. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1171-1179.
- Kreder, C. A.** 1998. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4103-4105.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., i Zoric, N.** 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* **27**:95-125.
- Kuritz, A. P., Shaughnessy, P., i Salyers, A. A.** 1986. Enumeration of polysaccharide-degrading *Bacteroides* species in human feces by using species-specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:385-390.
- Kuwahara, T., Yamashita, A., Hirakawa, H., Nakayama, H., Toh, H., Okada, N., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T., i Ohnishi, Y.** 2004. Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**:14919-14924.
- Labrenz, M., Brettar, I., Christen, R., Flavier, S., Botel, J., i Hofle, M. G.** 2004. Development and application of a real-time PCR approach for quantification of uncultured bacteria in the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4971-4979.
- Lamandella, R., Santo Domingo, J. W., Oerther, D. B., Vogel, J. R., i Stoeckel, D. M.** 2007. Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of Bacteroidetes 16S rRNA gene. *Fems Microbiology Ecology*. **59**:651-660.

- Lamendella, R., Santo Domingo, J. W., Kelty, C., i Oerther, D. B.** 2008. Bifidobacteria in feces and environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:575-584.
- Lan, P. T., Hayashi, H., Sakamoto, M., i Benno, Y.** 2002. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiol. Immunol.* **46**:371-382.
- Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H. F., i Welling, G. W.** 1995. Quantitative Fluorescence *In situ* Hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S ribosomal-RNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3069-3075.
- Lay, C., Rigottier-Gois, L., Holmstrom, K., Rajilic, M., Vaughan, E. E., de Vos, W. M., Collins, M. D., Thiel, R., Namsolleck, P., Blaut, M., i Dore, J.** 2005. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4153-4155.
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R., i Sayler, G.** 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:4214-4224.
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., i van Sinderen, D.** 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology.* **98**:1303-1315.
- Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N., i Nichols, P.** 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research.* **30**:2893-2900.
- Lemarchand, K., Masson, L., i Brousseau, R.** 2004. Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Crit Rev. Microbiol.* **30**:145-172.
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., i Moller, K.** 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:673-690.
- Leung, K. T., Mackereth, R., Tien, Y. C., i Topp, E.** 2004. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *Fems Microbiology Ecology.* **47**:111-119.
- Ley, V., Higgins, J., i Fayer, R.** 2002. Bovine enteroviruses as indicators of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3455-3461.
- Li, Z., He, L., i Miao, X.** 2007. Cultivable bacterial community from South China Sea sponge as revealed by DGGE fingerprinting and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Curr. Microbiol.* **55**:465-472.
- Livingston, S. J., Kominos, S. D., i Yee, R. B.** 1978. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *J. Clin. Microbiol.* **7**:448-453.
- Lupski, J. R. i Weinstock, G. M.** 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174**:4525-4529.
- Lynch, P. A., Gilpin, B. J., Sinton, L. W., i Savill, M. G.** 2002. The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *Journal of Applied Microbiology.* **92**:526-533.
- Lyznicki, J. M., Busch, E. L., i Blazevic, D. J.** 1982. Medium for selective isolation and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *J. Clin. Microbiol.* **15**:123-129.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., i Parker, J.** 1998. *Microbiología de los microorganismos.* **8**
- Maier, R. M., Pepper, I. L., i Gerba, C. P.** 2000. *Environmental Microbiology.*

- Malakoff, D.** 2002. Water quality. Microbiologists on the trail of polluting bacteria. *Science*. **295**:2352-2353.
- Maluquer de, M. C., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Martin, M., i Girones, R.** 2004. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:1448-1454.
- Manero, A. i Blanch, A. R.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4425-4430.
- Mangin, I., Bourget, N., Simonet, J. M., i Decaris, B.** 1995. Selection of species-specific DNA probes which detect strain restriction polymorphism in four *Bifidobacterium* species. *Res Microbiol.* **146**:59-71.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., i Schleifer, K. H.** 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *cytophaga-flavobacter-bacteroides* in the natural environment. *Microbiology*. **142**:1097-1106.
- Mara, D. D. i Oragui, J. I.** 1981. Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in feces, sewage, and freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:1037-1042.
- Mara, D. D. i Oragui, J. I.** 1983. Sorbitol-fermenting *Bifidobacteria* as specific indicators of human fecal pollution. *Journal of Applied Bacteriology*. **55**:349-357.
- Mara, D. D. i Oragui, J.** 1985. Bacteriological methods for distinguishing between human and animal faecal pollution of water: results of fieldwork in Nigeria and Zimbabwe. *Bull. World Health Organ.* **63**:773-783.
- Martellini, A., Payment, P., i Villemur, R.** 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research*. **39**:541-548.
- Masco, L., Huys, G., Gevers, D., Verbrugghen, L., i Swings, J.** 2003. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:557-563.
- Masco, L., Huys, G., De, B. E., Temmerman, R., i Swings, J.** 2005. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **102**:221-230.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., i Oyaizu, H.** 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4506-4512.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., i Tanaka, R.** 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5445-5451.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., i Tanaka, R.** 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:167-173.
- McDonald, J. L., Hartel, P. G., Gentit, L. C., Belcher, C. N., Gates, K. W., Rodgers, K., Fisher, J. A., Smith, K. A., i Payne, K. A.** 2006. Identifying sources of fecal contamination inexpensively with targeted sampling and bacterial source tracking. *Journal of Environmental Quality*. **35**:889-897.

- McFeters, G. A., Cameron, S. C., i LeChevallier, M. W.** 1982. Influence of diluents, media, and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**:97-103.
- McLellan, S. L., Daniels, A. D., i Salmore, A. K.** 2003. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2587-2594.
- McQuaig, S. M., Scott, T. M., Harwood, V. J., Farrah, S. R., i Lukasik, J. O.** 2006. Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7567-7574.
- Menon, P., Billen, G., i Servais, P.** 2003. Mortality rates of autochthonous and fecal bacteria in natural aquatic ecosystems. *Water Res.* **37**:4151-4158.
- Molbak, L., Thomsen, L. E., Jensen, T. K., Bach Knudsen, K. E., i Boye, M.** 2007. Increased amount of *Bifidobacterium thermacidophilum* and *Megasphaera elsdenii* in the colonic microbiota of pigs fed a swine dysentery preventive diet containing chicory roots and sweet lupine. *J. Appl. Microbiol.* **103**:1853-1867.
- Muñoz, F. J. i Pares, R.** 1988. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1715-1718.
- Murray, A. P., Gibbs, C. F., i Kavanagh, P. E.** 1987. Linear Alkyl Benzenes (Labs) in sediments of Port Phillip Bay (Australia). *Marine Environmental Research.* **23**:65-76.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., i Uitterlinden, A. G.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
- Muyzer, G., Hootenträger, S., Teske, A., i Wawer, C.** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual.* **3.4.4**:1-23.
- Muyzer, G. i Smalla, K.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **73**:127-141.
- Myers, R. M., Fisher, S. G., Lerman, L. S., i Maniatis, T.** 1985a. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **13**:3131-3145.
- Myers, R. M., Fisher, S. G., Maniatis, T., i Lerman, L. S.** 1985b. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **19**:3111-3129.
- Myers, R. M., Maniatis, T., i Lerman, L. S.** 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **155**:501-527.
- Myoda, S. P., Carson, C. A., Fuhrmann, J. J., Hahm, B. K., Hartel, P. G., Yampara-Lquise, H., Johnson, L., Kuntz, R. L., Nakatsu, C. H., Sadowsky, M. J., i Samadpour, M.** 2003. Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host origin database. *J. Water Health.* **1**:167-180.
- Nagashima, K., Hisada, T., Sato, M., i Mochizuki, J.** 2003. Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1251-1262.

- Nakatsu, C. H.** 2007. Soil microbial community analysis using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*. **71**:562-571.
- Nasser, A. M., Tchorch, Y., i Fattal, B.** 1993. Comparative survival of *E. coli*, F+bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Water Science and Technology*. **27**:401-407.
- Nebra, Y. i Blanch, A. R.** 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5173-5176.
- Nebra, Y., Jofre, J., i Blanch, A. R.** 2002. The effect of reducing agents on the recovery of injured *Bifidobacterium* cells. *Journal of Microbiological Methods*. **49**:247-254.
- Nebra, Y., Bonjoch, X., i Blanch, A. R.** 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2651-2656.
- Nielsen, D. S., Moller, P. L., Rosenfeldt, V., Paerregaard, A., Michaelsen, K. F., i Jakobsen, M.** 2003. Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species, and other lactic acid bacteria in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7545-7548.
- Noble, R. T., Allen, S. M., Blackwood, A. D., Chu, W., Jiang, S. C., Lovelace, G. L., Sobsey, M. D., Stewart, J. R., i Wait, D. A.** 2003. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. *J. Water Health*. **1**:195-207.
- Noble, R. T., Lee, I. M., i Schiff, K. C.** 2004. Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol.* **96**:464-472.
- Noble, R. T., Griffith, J. F., Blackwood, A. D., Fuhrman, J. A., Gregory, J. B., Hernandez, X., Liang, X., Bera, A. A., i Schiff, K.** 2006. Multitiered approach using quantitative PCR to track sources of fecal pollution affecting Santa Monica Bay, California. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1604-1612.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W., i Backhaus, H.** 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**:5636-5643.
- Okabe, S., Okayama, N., Savichtcheva, O., i Ito, T.** 2007a. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:890-901.
- Okabe, S. i Shimazu, Y.** 2007b. Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:935-944.
- Oragui, J. I. i Mara, D. D.** 1983. Investigation of the survival characteristics of *Rhodococcus coprophilus* and certain fecal indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:356-360.
- Oshrio, R. K. i Olson, B. H.** 1997. Occurrence of *STh* toxin gene in wastewater. **255-259**.
- Pan, N. i Imlay, J. A.** 2001. How does oxygen inhibit central metabolism in the obligate anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Mol. Microbiol.* **39**:1562-1571.
- Parveen, S., Murphree, R. L., Edmiston, L., Kaspar, C. W., Portier, K. M., i Tamplin, M. L.** 1997. Association of multiple-antibiotic-resistance profiles with point and nonpoint sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2607-2612.

- Parveen, S., Portier, K. M., Robinson, K., Edmiston, L., i Tamplin, M. L.** 1999. Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3142-3147.
- Parveen, S., Lukasik, J., Scott, T. M., Tamplin, M. L., Portier, K. M., Sheperd, S., Braun, K., i Farrah, S. R.** 2006. Geographical variation in antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from swine, poultry, beef and dairy cattle farm water retention ponds in Florida. *J. Appl. Microbiol.* **100**:50-57.
- Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G. T., Blanch, A. R., Lucena, F., Jofre, J., i Muniesa, M.** 2005. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5659-5662.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., i Girones, R.** 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3376-3382.
- Pisz, J. M., Lawrence, J. R., Schafer, A. N., i Siciliano, S. D.** 2007. Differentiation of genes extracted from non-viable versus viable micro-organisms in environmental samples using ethidium monoazide bromide. *J. Microbiol. Methods.* **71**:312-318.
- Ramsak, A., Peterka, M., Tajima, K., Martin, J. C., Wood, J., Johnston, M. E. A., Aminov, R. I., Flint, H. J., i Avgustin, G.** 2000. Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *Fems Microbiology Ecology.* **33**:69-79.
- Ray, B.** 1989. Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Foods, Water and Feeds.
- Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Mach, R. L., i Farnleitner, A. H.** 2006. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5610-5614.
- Reischer, G. H., Kasper, D. C., Steinborn, R., Farnleitner, A. H., i Mach, R. L.** 2007. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. *Letters in Applied Microbiology.* **44**:351-356.
- Resnick, I. G. i Levin, M. A.** 1981. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:433-438.
- Reysenbach, A. L., Giver, L. J., Wickham, G. S., i Pace, N. R.** 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3417-3418.
- Rhodes, M. W. i Kator, J.** 1999. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *Journal of Applied Microbiology.* **87**:528-535.
- Rocha, E. R., Selby, T., Coleman, J. P., i Smith, C. J.** 1996. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **178**:6895-6903.
- Rolfe, R. D., Hentges, D. J., Campbell, B. J., i Barrett, J. T.** 1978. Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:306-313.
- Roslev, P., Bjergbaek, L. A., i Hesselsoe, M.** 2004. Effect of oxygen on survival of faecal pollution indicators in drinking water. *J. Appl. Microbiol.* **96**:938-945.
- Rowan, N. J.** 2004. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: *Quo Vadis?* *Trends in Food Science and Technology.* **15**:462-467.

- Rowbotham, T. J. i Cross, T.** 1977. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *Journal of General Microbiology*. **100**:231-240.
- Rozen, Y. i Belkin, S.** 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:513-529.
- Sakamoto, M. i Benno, Y.** 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1599-1605.
- Sakata, S., Tonooka, T., Ishizeki, S., Takada, M., Sakamoto, M., Fukuyama, M., i Benno, Y.** 2005. Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**:417-423.
- Sambrook, J. i Russell, D.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sanger, F., Nicklen, S., i Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:5463-5467.
- Sankararamkrishnan, N. i Guo, Q. Z.** 2005. Chemical tracers as indicator of human fecal coliforms at storm water outfalls. *Environment International*. **31**:1133-1140.
- Santiago-Mercado, J. i Hazen, T. C.** 1987. Comparison of four membrane filter methods for fecal coliform enumeration in tropical waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2922-2928.
- Santo Domingo, J. W., Bambic, D. G., Edge, T. A., i Wuertz, S.** 2007. *Quo vadis* source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. *Water Res.* **41**:3539-3552.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M., i de Vos, W. M.** 2001a. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:504-513.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M., i de Vos, W. M.** 2001b. Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal bifidobacterium populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**:227-231.
- Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Favier, C. F., Dore, J., Edwards, C., i de Vos, W. M.** 2002. Diversity of *Bi.dobacterium* and *Lactobacillus* spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. *Microbial Ecology in Health and Disease*. **14**:97-105.
- Savichtcheva, O., Okayama, N., Ito, T., i Okabe, S.** 2005. Application of a direct fluorescence-based live/dead staining combined with fluorescence in situ hybridization for assessment of survival rate of *Bacteroides* spp. in drinking water. *Biotechnol. Bioeng.* **92**:356-363.
- Savichtcheva, O., Okayama, N., i Okabe, S.** 2007. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Res.* **41**:3615-3628.
- Savill, M. G., Murray, S. R., Scholes, P., Maas, E. W., McCormick, R. E., Moore, E. B., i Gilpin, B. J.** 2001. Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan (TM) PCR techniques to the detection and identification of *Rhodococcus coprophilus* in faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*. **47**:355-368.
- Scardovi, V. i Trovatelli, L. D.** 1965. The Fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Micr.* **15**:19-29.

- Schaper, M. i Jofre, J.** 2000. Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *Journal of Virological Methods*. **89**:1-10.
- Schaper, M., Duran, A. E., i Jofre, J.** 2002. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3702-3707.
- Schraft, H. i Watterworth, L. A.** 2005. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M Petrifilm plates with standard plating procedures. *J. Microbiol. Methods*. **60**:335-342.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., i Lukasik, J.** 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5796-5803.
- Scott, T. M., Parveen, S., Portier, K. M., Rose, J. B., Tamplin, M. L., Farrah, S. R., Koo, A., i Lukasik, J.** 2003. Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1089-1092.
- Scott, T. M., Jenkins, T. M., Lukasik, J., i Rose, J. B.** 2005. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ. Sci. Technol.* **39**:283-287.
- Seiler, R. L., Zaugg, S. D., Thomas, J. M., i Howcroft, D. L.** 1999. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. *Ground Water*. **37**:405-410.
- Seurinck, S., Defoirdt, T., Verstraete, W., i Siciliano, S. D.** 2005a. Detection and quantification of the human-specific HF183 *Bacteroides* 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. *Environmental Microbiology*. **7**:249-259.
- Seurinck, S., Verstraete, W., Sciciliano, i S.D.** 2005b. Microbial source tracking for identification of fecal pollution. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. **4**:19-37.
- Shanks, O. C., Nietch, C., Simonich, M., Younger, M., Reynolds, D., i Field, K. G.** 2006. Basin-wide analysis of the dynamics of fecal contamination and fecal source identification in Tillamook Bay, Oregon. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:5537-5546.
- Shanks, O. C., Atikovic, E., Blackwood, A. D., Lu, J., Noble, R. T., Domingo, J. S., Seifring, S., Sivaganesan, M., i Haugland, R. A.** 2008. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:745-752.
- Siefering, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L., i Haugland, R. A.** 2008. Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *Journal of Water and Health*. **6**:225-237.
- Silvi, S., Rumney, C. J., i Rowland, I. R.** 1996. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J. Appl. Bacteriol.* **81**:561-564.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., White, B. A., Gaskins, H. R., i Mackie, R. I.** 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microbiol. Methods*. **36**:167-179.
- Simpson, J. M., McCracken, V. J., Gaskins, H. R., i Mackie, R. I.** 2000. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4705-4714.

- Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., i Ross, R. P.** 2003. Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *J. Bacteriol.* **185**:2571-2581.
- Simpson, P. J., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., i Stanton, C.** 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:401-406.
- Singh, A., Pyle, B. H., i McFeters, G. A.** 1989. Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. *J. Microbiol. Methods.* **10**:91-101.
- Sinton, L. W., Finlay, R. K., i Hannah, D. J.** 1998. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research.* **32**:323-348.
- Sinton, L. W., Finlay, R. K., i Lynch, P. A.** 1999. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3605-3613.
- Sinton, L. W., Hall, C. H., Lynch, P. A., i vies-Colley, R. J.** 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1122-1131.
- Sinton, L. W., vies-Colley, R. J., i Bell, R. G.** 1994. Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2040-2048.
- Sipos, R., Szekely, A. J., Palatinszky, M., Revesz, S., Marialigeti, K., i Nikolausz, M.** 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**:341-350.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baumgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., i Tebbe, C. C.** 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results? *J. Microbiol. Methods.* **69**:470-479.
- Staley, J. T. i Konopka, A.** 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology.* **39**:321-346.
- Stewart, J. R., Ellender, R. D., Gooch, J. A., Jiang, S., Myoda, S. P., i Weisberg, S. B.** 2003. Recommendations for microbial source tracking: lessons from a methods comparison study. *J. Water Health.* **1**:225-231.
- Stoeckel, D. M. i Harwood, V. J.** 2007. Performance, Design, and Analysis in Microbial Source Tracking Studies. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Stoeckel, D. M., Mathes, M. V., Hyer, K. E., Hagedorn, C., Kator, H., Lukasik, J., O'Brien, T. L., Fenger, T. W., Samadpour, M., Strickler, K. M., i Wiggins, B. A.** 2004. Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* **38**:6109-6117.
- Stratagene.** 2004. Introduction to Quantitative PCR Methods and Application Guide.
- Stricker, A. R., Wilhartitz, I., Farnleitner, A. H., i Mach, R. L.** 2008. Development of a Scorpion probe-based real-time PCR for the sensitive quantification of *Bacteroides* sp. ribosomal DNA from human and cattle origin and evaluation in spring water matrices. *Microbiol. Res.*
- Stults, J. R., Snoeyenbos-West, O., Methe, B., Lovley, D. R., i Chandler, D. P.** 2001. Application of the 5' fluorogenic exonuclease assay (TaqMan) for quantitative ribosomal DNA and rRNA analysis in sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2781-2789.

- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., i Dore, J.** 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4799-4807.
- Summanen, P. H., Baron, E. J., Citron, D. M., Strong, C., Wexler, H. M., i Finegold, S. M.** 1993. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*.
- Suzuki, M. T. i Giovannoni, S. J.** 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:625-630.
- Tabak, K. H., Bloomhuff, i Bunch, R. L.** 1972. Coprastonol: a positive tracer or fecal pollution. *Dev. Ind. Microbiol.* **13**:296-307.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., i Benno, Y.** 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Fems Microbiology Ecology.* **29**:159-169.
- Takada, T., Matsumoto, K., i Nomoto, K.** 2004. Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *J. Microbiol. Methods.* **58**:413-421.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., i Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596-1599.
- Tartera, C. i Jofre, J.** 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1632-1637.
- Tartera, C., Araujo, R., Michel, T., i Jofre, J.** 1992. Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting *Bacteroides fragilis* in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2670-2673.
- Temmerman, R., Masco, L., Vanhoutte, T., Huys, G., i Swings, J.** 2003. Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6380-6385.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., i Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel-Electrophoresis - criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology.* **33**:2233-2239.
- Theunissen, J., Britz, T. J., Torriani, S., i Witthuhn, R. C.** 2005. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **98**:11-21.
- Torsvik, V., Ovreas, L., i Thingstad, T. F.** 2002. Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science.* **296**:1064-1066.
- Toze, S.** 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research.* **33**:3545-3556.
- Trovatelli, L. D., Crociani, F., Pedinotti, M., i Scardovi, V.** 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Arch. Microbiol.* **98**:187-198.
- Tsai, Y. L., Sobsey, M. D., Sangermano, L. R., i Palmer, C. J.** 1993. Simple method of concentrating enteroviruses and Hepatitis-A virus from sewage and ocean water for rapid detection by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain-Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3488-3491.
- Tyagi, S. i Kramer, F. R.** 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**:303-308.

- Tzortzis, G., Goulas, A. L., Gee, J. M., i Gibson, G. R.** 2005. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous *in vitro* fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs *in vivo*. *Journal of Nutrition*. **135**:1726-1731.
- Ufnar, J. A., Ufnar, D. F., Wang, S. Y., i Ellender, R. D.** 2007a. Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5209-5217.
- Ufnar, J. A., Wang, S. Y., Ufnar, D. F., i Ellender, R. D.** 2007b. *Methanobrevibacter ruminantium* as an indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:7118-7121.
- van der Wielen, P. W., Keuzenkamp, D. A., Lipman, L. J., Van, K. F., i Biesterveld, S.** 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. *Microb. Ecol.* **44**:286-293.
- van Tongeren, S. P., Slaets, J. P., Harmsen, H. J., i Welling, G. W.** 2005. Fecal microbiota composition and frailty. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6438-6442.
- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., i Swings, J.** 2004. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *Fems Microbiology Ecology*. **48**:437-446.
- Vaughan, E. E., Schut, F., Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., i Akkermans, A. D.** 2000. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **1**:1-12.
- Ventura, M., Elli, M., Reniero, R., i Zink, R.** 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**:113-121.
- Ventura, M., Meylan, V., i Zink, R.** 2003. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4296-4301.
- Ventura, M., van, S. D., Fitzgerald, G. F., i Zink, R.** 2004. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **86**:205-223.
- Versalovic, J., Koeuth, T., McCabe, E. R. B., i Lupski, J. R.** 1991. Use of the Polymerase Chain-Reaction for Physical Mapping of Escherichia-Coli Genes. *Journal of Bacteriology*. **173**:5253-5255.
- Viñas, M., Sabate, J., Guasp, C., Lalucat, J., i Solanas, A. M.** 2005. Culture-dependent and -independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium. *Can. J. Microbiol.* **51**:897-909.
- Vitali, B., Candela, M., Matteuzzi, D., i Brigidi, P.** 2003. Quantitative detection of probiotic *Bifidobacterium* strains in bacterial mixtures by using real-time PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:269-276.
- von Wintzingerode, F., Gobel, U. B., i Stackebrandt, E.** 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229.
- Wai, S. N., Moriya, T., Kondo, K., Misumi, H., i Amako, K.** 1996. Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**:187-191.

- Wallis, J. L. i Taylor, H. D.** 2003. Phenotypic population characteristics of the enterococci in wastewater and animal faeces: implications for the new European directive on the quality of bathing waters. *Water Sci. Technol.* **47**:27-32.
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., i Hammes, W. P.** 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2578-2585.
- Walters, S. P. i Field, K. G.** 2006. Persistence and growth of fecal Bacteroidales assessed by bromodeoxyuridine immunocapture. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:4532-4539.
- Wang, G., Whittam, T. S., Berg, C. M., i Berg, D. E.** 1993. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res.* **21**:5930-5933.
- Wang, G. C. i Wang, Y.** 1995. Rapid differentiation of bacterial species with multiple probes of different lengths in a single slot blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4269-4273.
- Wang, G. C. i Wang, Y.** 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4645-4650.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., i Cole, J. R.** 2007. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5261-5267.
- Wang, X., Heazlewood, S. P., Krause, D. O., i Florin, T. H. J.** 2003. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *Journal of Applied Microbiology.* **95**:508-520.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., i Lane, D. J.** 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
- Wexler, H. M.** 2007. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:593-621.
- Whitford, M. F., Forster, R. J., Beard, C. E., Gong, J. H., i Teather, R. M.** 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe.* **4**:153-163.
- Whitman, R. L., Przybyla-Kelly, K., Shively, D. A., i Byappanahalli, M. N.** 2007. Incidence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in human and animal fecal sources. *Environmental Science & Technology.* **41**:6090-6095.
- Wiggins, B. A.** 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3997-4002.
- Wiggins, B. A., Cash, P. W., Creamer, W. S., Dart, S. E., Garcia, P. P., Gerecke, T. M., Han, J., Henry, B. L., Hoover, K. B., Johnson, E. L., Jones, K. C., McCarthy, J. G., McDonough, J. A., Mercer, S. A., Noto, M. J., Park, H., Phillips, M. S., Purner, S. M., Smith, B. M., Stevens, E. N., i Varner, A. K.** 2003. Use of antibiotic resistance analysis for representativeness testing of multiwatershed libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3399-3405.
- Wilkins, T. D., Wagner, D. L., Veltri, B. J., Jr., i Gregory, E. M.** 1978. Factors affecting production of catalase by *Bacteroides*. *J. Clin. Microbiol.* **8**:553-557.

- Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C., Hooper, L. V., i Gordon, J. I. 2003. A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science*. **299**:2074-2076.
- Xu, J., Mahowald, M. A., Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Martens, E. C., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Minx, P., Latreille, P., Cordum, H., Van, B. A., Kim, K., Fulton, R. S., Fulton, L. A., Clifton, S. W., Wilson, R. K., Knight, R. D., i Gordon, J. I. 2007. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol*. **5**:e156-
- Youn, S. Y., Seo, J. M., i Ji, G. E. 2008. Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium* species. *Lett. Appl. Microbiol*. **46**:7-13.
- Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y., i Joerger, R. D. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol*. **68**:124-137.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., i Vitzthum, F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. **32**:e103-
- Zocco, M. A., Ainora, M. E., Gasbarrini, G., i Gasbarrini, A. 2007. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects of their interaction. *Dig. Liver Dis*. **39**:707-712.
- Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D., i de Vos, W. M. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. **64**:3854-3859.
- Zoetendal, E. G., Collier, C. T., Koike, S., Mackie, R. I., i Gaskins, H. R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *Journal of Nutrition*. **134**:465-472.

Annex I

Determinacions bacteriològiques

Medis i solucions utilitzades per al cultiu i determinació d'espècies del gènere *Bacteroides*

Medi *Bacteroides fragilis* Bilis Esculina (BBE)

Medi descrit per l'aïllament selectiu i diferencial de microorganismes del grup de *B. fragilis* (Livingston et al. 1978).

Oxgall (B3883-500G, Sigma)	20 g
Medi Trypticase soy agar (TSA) (1068.00, Conda, Madrid)	40 g
Esculina (E8250, Sigma)	1 g
Citrat amònic fèrric (F-5879, Sigma)	0,5 g
Solució estoc d'hemina	2 ml
Gentamicina (40 mg/ml) (653364.2, Schering-Plough)	2,5 ml
Aigua destil·lada	1000 ml

Barrejar tots els components excepte la solució estoc d'hemina i la gentamicina i esterilitzar a l'autoclau a $121\pm 3^\circ\text{C}$ durant 15 min. Un cop s'ha refredat el medi a 55°C s'afegeix la solució d'hemina i la gentamicina. Finalment s'ajusta el medi a un pH de 7.0 en condicions d'esterilitat.

Medi *Bacteroides* phages Recovery Medium Agar (BPRM)

Medi descrit per a la recuperació de fags de *Bacteroides*. És un medi ric que permet el bon creixement de *Bacteroides* spp. (Tartera, et al 1992).

BPRM brou Base (02-409, Scharlau)	29,42 g
Solució estoc CaCl_2	0,1 ml
Agar	15 g
Solució estoc d'hemina	10 ml
Solució estoc Na_2CO_3	25 ml
Aigua destil·lada	1000 ml

Barrejar tots els components excepte les solucions estoc d'hemina i de Na_2CO_3 . Un cop dissoltes esterilitzar a l'autoclau a $121\pm 3^\circ\text{C}$ durant 15 min. Quan el medi s'ha refredat a 55°C s'afegeix la solució d'hemina i de Na_2CO_3 . Finalment s'ajusta el medi a un pH de $6,8 \pm 0,5$ amb HCl en condicions d'esterilitat.

Brou *Bacteroides* phages Recovery Medium (BPRM) (100 ml)

BPRM Brou Base	2,94 g
Solució estoc CaCl_2	10 μl
Solució estoc d'hemina	1 ml
Solució estoc Na_2CO_3	2,5 ml

Aigua destil·lada	100 ml
-------------------	--------

Barrejar tots els components excepte les solucions estoc d'hemina i de Na_2CO_3 . Un cop dissoltes esterilitzar a l'autoclau a $121\pm 3^\circ\text{C}$ durant 15 min. S'afegeix la solució d'hemina i de Na_2CO_3 al moment de ser utilitzada. Finalment s'ajusta el medi a un pH de $6,8 \pm 0,5$ amb HCl en condicions d'esterilitat. La solució és estable a $5\pm 3^\circ\text{C}$ durant 30 dies.

Solucions complementaries:

- Solució estoc d'hemina (5 mg/ml)

Hemina (H-5533, Sigma)	0,05 g
NaOH 1M	10 ml

Enrasar l'ampolla fins a 100 ml amb aigua destil·lada i dissoldre els elements amb un agitador magnètic durant 30-60 min. Esterilitzar per filtració mitjançant un filtre amb un porus de $0,2 \mu\text{m}$. Mantenir a temperatura ambient no més de 6 mesos.

- Solució estoc de clorur càlcic

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g
Aigua destil·lada	100 ml

Esterilitzar per filtració mitjançant un filtre amb un porus de $0,2 \mu\text{m}$. Mantenir a temperatura ambient no més de 6 mesos. Mantenir en foscors a $4\pm 1^\circ\text{C}$ no més de 6 mesos.

- Solució estoc de Na_2CO_3

Na_2CO_3	10,6 g
Aigua destil·lada	100 ml

Esterilitzar per filtració mitjançant un filtre amb un porus de $0,2 \mu\text{m}$. Mantenir a temperatura ambient no més de 6 mesos.

Crioprotector per a la conservació per congelació de soques de *Bacteroides*

Albúmina de sèrum boví	10 g
Sacarosa (5476. Merck)	20 g
Aigua destil·lada	100 ml

Dissoldre els diferents components en aigua per agitació durant 1 h. Esterilitzar per filtració per amb un filtre de $0,22 \mu\text{m}$. Utilitzar immediatament

Medis i solucions utilitzades per al cultiu i determinació d'espècies del gènere *Bifidobacterium*

Medi Columbia Blood Agar suplementat

Medi ric utilitzat per al creixement de microorganismes anaerobis

Medi Columbia Blood Agar (270240, Difco)	44 g
Glucosa	5 g
L-cisteïna-HCl (1028390025, VWR)	0,5 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Barrejar tots els components i esterilitzar a l'autoclau a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 15 min.

Medi Beerens Agar

Medi descrit per l'aïllament selectiu del gènere *Bifidobacterium* (Beerens, 1990)

Medi Columbia Blood Agar	44 g
Glucosa	5 g
L-cisteïna-HCl	0,5 g
Àcid propiònic (99%) (P-1386, Sigma)	5 ml
Aigua desil·lada	1000 ml

Barrejar tots els components, excepte l'àcid propiònic, i esterilitzar a l'autoclau a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 15 min. Un cop refredat a 55°C , afegir l'àcid propiònic i ajustar el pH del medi a 5,0 amb NaOH.

Medi Human *Bifidobacterium* Sorbitol Agar (HBSA)

Medi selectiu per a la recuperació de *Bifidobacterium* i diferencial per les soques fermentadores del sorbitol (Mara i Oragui 1983).

Sorbitol (S-1876, Sigma)	10 g
Polipetona (211910, BBL)	10 g
Extracte de llevat	20 g
Casaminoàcids (223120, Difco)	8 g
Clorur de sodi	3,2 g
Bromocresol porpra (1.03025.0005, Merck)	0,1 g
L-Cisteïna-HCl	0,40 g
Solució estoc d'àcid nalidíxic	1 ml
Agar	15 g
Solució estoc de sulfat de kanamicina	10 ml
Solució estoc de Polimixina B	1 ml

Barrejar el sorbitol, la polipetona, l'extracte de llevat els casaminoàcids els clorur de sòdic i el bromocresol porpra en 1 l d'aigua destil·lada. Bullir la barreja durant 10 min. Afegir l'àcid

nalidíxic i la cisteïna. Ajustar el pH a 6,9 amb NaOH. Afegir l'agar i esterilitzar a l'autoclau a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 15 min. Un cop esterilitzar i refredat a 55°C afegir la polimixina B i el sulfat de kanamicina en condicions estèrils.

Solució estoc d'àcid nalidíxic

Àcid nalidíxic (N-4382, Sigma)	30 mg
Aigua destil·lada estèril	10 ml

Dissoldre per agitació. Esterilitzar per filtració mitjançant un filtre de $0,22\ \mu\text{m}$. Guardar a $-20\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Solució estoc de Polimixina B

Polimixina B	17,7 mg
Aigua destil·lada estèril	10 ml

Dissoldre per agitació. Esterilitzar per filtració mitjançant un filtre de $0,22\ \mu\text{m}$. Guardar a $-20\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Solució estoc de sulfat de kanamicina

Sulfat de Kanamicina (K4000, Sigma)	50 mg
Aigua destil·lada estèril	10 ml

Dissoldre per agitació. Esterilitzar per filtració mitjançant un filtre de $0,22\ \mu\text{m}$. Guardar a $-20\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Brou Reinforced Clostridium Medium (RCM) (100 ml)

Medi utilitzar per al creixement en medi líquid de soques de *Bifidobacterium* spp.

RCM (CM0149, Oxoid)	3 g
Aigua destil·lada	100 ml

Dissoldre per agitació i esterilitzar amb l'autoclau a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 15 min. La solució és estable a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 30 dies.

Altres medis i solucions

Brou LB ("Luria-Bertani") (100 ml)

Clorur sòdic	1 g
Extracte de llevat	0,5 g
Bacto-Triptona	1 g
Aigua destil·lada	100 ml

Ajustar el pH a 7,5 afegint NaOH. Esterilitzar a 121°C durant 20 min.

TSB (Tryptic Soy Broth) (100 ml)

TSB (1224.00, Conda)	0,5 g
Aigua destil·lada	100 ml

Esterilitzar a 121°C durant 20 min.

medi mFC (“modified Fecal Coliform”)

mFC Agar (Difco) (267720, Difco)	52 g
Solució d'àcid rosòlic 1%	10 ml
Aigua destil·lada	1000 ml

Dissoldre el medi mFC agitant i escalfant-lo fins a l'ebullició. Un cop dissolt, afegir la solució d'àcid rosòlic. Mantenir en ebullició i sense parar d'agitar durant 1 min. Si és necessari ajustar el pH amb HCl. El medi és estable a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 30 dies.

Solució d'àcid rosòlic 1%

Àcid rosòlic (232281, Difco)	0,1 g
NaOH 0,2 M	10 ml

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

medi Enterococcus Agar (mEA)

mEA (0746-17, Difco)	42 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Dissoldre el medi mEA per agitació i escalfant-lo fins a l'ebullició. Mantenir l'ebullició durant 1 min. Refredar ràpidament fins a uns 50°C i dispensar immediatament en les plaques. Aquest medi és estable a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 30 dies.

Agar Bilis Esculina

Bile Esculin Agar (01-265-500, Scharlab)	64 g
Aigua destil·lada	1000 ml

Dissoldre per agitació i esterilitzar-lo a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 15 min. Aquest medi és estable a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 30 dies.

Ringer $\frac{1}{4}$

Ringer (BR52, Oxoid)	2 pastilles
Aigua destil·lada	1000 ml

Dissoldre per agitació i esterilitzar-lo a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 15 min. La solució és estable a temperatura ambient durant 6 mesos.

Annex II

Mètodes generals, reactius
i solucions

Extracció d'ADN de soques de *Bifidobacterium*

Centrifugar 1 ml de cultiu crescut en medi RCM a 4000 rpm durant 3 min.

- Un cop abocat el sobrenedant, rentat de les cèl·lules amb aigua destil·lada estèril i centrifugar a 14000 rpm 3 min.
- Repetir el pas anterior.
- Resuspendre les cèl·lules en 0,2 ml de solució A i 0,2 ml de solució B.
- Afegir proteinasa K (Merck, Darmstadt, Ale.) fins a una concentració final de 120 µg/ml.
- Incubar 1 h a 55°C.
- Afegir 0,2 ml de Matriu d'InstaGene (Bio-Rad) i incubar durant 15 min a 55°C.
- Inactivació de la proteïnasa K mitjançant un xoc tèrmic a 100°C durant 8 min.
- Centrifugar la suspensió 3 min a 14000 rpm per a fer precipitar les partícules de la Matriu d'InstaGene.

Solució A (pH 8,3):

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

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

Solució B (pH 8,3):

MgCl ₂	2,5 mM
Tris-HCl	10 mM
Tween-20 (82218405, VWR)	1 %
Nonidet P40 (74385, Sigma)	40 %

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

Extracció d'ADN de soques tipus del gènere *Bacteroides*

- A partir d'un cultiu líquid en brou BPRM, centrifugar 1 ml del cultiu a 13000 rpm durant 5 min.
- Abocar sobrenedant i afegir 200 µl de tampó TE
- Centrifugar a 13000 rpm durant 3-4 min
- Abocar sobrenedant i resuspendre en 200 µl de tampó TE.
- Bullir durant 10 min.
- Centrifugar de 3-5 min.

Tampó TE (Tris-EDTA)

Tris-HCl (pH=8)	10 mM
EDTA	1 mM

Ajustar el pH a 8,0. Esterilitzar 20 min a 121±3°C. Conservar a temperatura ambient.

Anàlisi de l'ADN mitjançant electroforesi en gels d'agarosa

Per a la preparació dels gels d'agarosa, dissoldre la quantitat necessària d'agarosa en TBE 1x (p:v) en una ampolla de vidre. Agitar i dissoldre l'agarosa mitjançant calor utilitzant un forn microones fins que la solució sigui transparent i sense grumolls. Deixar refredar l'agarosa fins uns 50-55°C i dipositar-la a la cubeta d'electroforesi.

Gel agarosa (0,8%, 1,5%, 2% i 3%)

agarosa (GK-AME-250, Genotek)	0,8; 1,5; 2 o 3 g respectivament (en funció de la concentració del gel)
TBE 1x	100 ml

TBE (Tris Borat EDTA) 10x

Tris base (648310, VWR)	109 g
àcid bòric (A2940.1000, Applichem)	55,6 g
EDTA (1.08418.1000, Merck)	9,2 g
Aigua bidestil·lada	1000 ml

Dissoldre per agitació. Ajustar el pH a 8,3 amb NaOH i enrasar el volum final amb aigua destil·lada. Esterilitzar 20 min a 121±3°C. Conservar a temperatura ambient.

TBE 1x

Fer una dilució 1/10 (v:v) a partir de la solució concentrada TBE 10x en aigua bidestil·lada estèril. Barrejar per agitació.

Marcadors de pes molecular

Marcador PhiX174 *Hae* III (de 72 a 1353 pb) (G1761, Promega).

Marcador Lambda *Eco*RI/*Hind*III (de 831 21.200 pb) (G1731, Promega).

Solució de tinció de Bromur d'etidi

Solució estoc de bromur d'etidi	125 µl
Aigua destil·lada	500 ml

Barrejar per agitació. Mantenir a temperatura ambient guardat de la llum fins que disminueix l'efectivitat de la tinció. És un producte potencialment cancerigen pel que ha de manipular-se sempre amb guants.

Solució estoc de Bromur d'etidi al 1%

Bromur d'etidi (A1151, AppliChem)	1 g
Aigua destil·lada	100 ml

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

Anàlisi de l'ADN mitjançant electroforesi en gels de gradient desnaturalitzant (DGGE)

- Rentar els vidres, la pinta i els plàstics espaiadors amb etanol.
- Muntar els vidres dins els quals es formarà el gel utilitzant el suport vertical de l'equip de Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, EUA).
- Muntar la bomba peristàtica (Amersham Pharmacia Biotech), amb la cubeta formadora de gradients lineals (CBS Scientific Company, EUA) i el tub que fa circular l'acrilamida. Posar l'extrem del tub que conté una l'agulla, al mig dels dos vidres que sostindran el gel. Connectar l'altre extrem del tub a les cubetes formadores del gradient sobre un agitador que permet la barreja de les dues acrilamides amb diferent concentració de substàncies desnaturalitzants.
- Preparació de les solucions d'acrilamida al 8% (solució A i B). S'ha de mantenir les solucions en gel per tal d'evitar que polimeritzin. Barrejar-ho per agitació. L'APS s'afegeix just abans de posar l'acrilamida a la cubeta de formació del gradient per tal d'evitar la polimerització.
- Afegir 100 µl de tampó de càrrega (5x GLB) a l'acrilamida més concentrada, per tal de verificar visualment la correcta formació del gradient, ja mostrarà un gradient de color al gel.
- Afegir la solució d'acrilamida més concentrada a la cambra que surt primer de la cubeta formadora de gradients. Obrir la vàlvula que connecta ambdós cambres de la cubeta de

manera que s'ompli el conducte d'unió entre ambdós cambres i així evitar la formació de bombolles d'aire entre les dos cambres.

- Abocar la solució d'acrilamida menys concentrada a la segona cubeta.
- Obrir les vàlvules que connecten les dos cambres i la de sortida de la cubeta. Engegar la bomba peristàltica amb un flux de 4 ml/min. Un agitador a la cambra de l'acrilamida més concentrada ha de permetre que es vagin barrejant l'acrilamida A i B.
- Preparar l'acrilamida 0% per a fer una capa sobre el gel de gradient i permetre la correcta formació dels pouets ben fets. Un cop s'ha afegit l'acrilamida al 0% a la part superior del gel, afegir la tinta per a formar els pouets.
- Deixar polimeritzar el gel durant unes 2 hores. El gels es poden mantenir a 4°C durant alguns dies.
- Rentar bé amb aigua les cubetes formadores del gradient i la bomba per tal d'evitar que hi quedi restes d'acrilamida polimeritzada.
- Posar el gel dins la cubeta d'electroforesi amb tampó TAE 1x a 60°C.
- Carregar les mostres d'ADN amb una proporció 1:4 de loading Buffer 5xGLB.
- Connectar la font i córrer el gel durant 16 h a 85V i a una temperatura del tampó de 60°C.
- Un cop acabada l'electroforesi, separar els vidres vigilat de no trencar el gel i tallar la part superior del gel on hi ha els pouets.
- Tenyir el gel amb 20 ml de tampó TNE 1x amb 4 µl de SYBRGold utilitzant una xeringa. Mantenir el gel durant 45 minuts en fosc per tal de permetre la tinció de l'ADN.
- Banyar el gel amb 500 ml de TNE1 per a rentar l'excés de SYBRGold. Procurar separar el gel del vidre. Cal tocar sempre el gel amb guants mullats de tampó.
- Cobrir el gel amb un paper de filtre de la mateixa mida i fer que s'hi enganxi per tal de traslladar-l'ho per ser analitzat mitjançant un escanner, fer una fotografia amb l'ImageMaster o tallar les bandes en un transil·luminador. Per tal de desunir el paper del gel, cal mullar-lo amb aigua destil·lada.

Solucions estoc d'acrilamida al 8%

- Solució 1 (Acrilamida amb un 0% de substàncies desnaturalitzants):

Acrilamida (30% acrilamida/Bis 37.5/1) (Bio-Rad)	20 ml
TAE 20x	5 ml
Aigua destil·lada	75 ml

Dissoldre la solució mitjançant agitació i conservar a 5±3°C guardat de la llum.

- Solució 2 (Acrilamida amb un 80% de substàncies desnaturalitzants):

Acrilamida (30% acrilamida/Bis 37.5/1) (Bio-Rad)	20 ml
TAE 20x	5 ml
Urea 7M (5146, Sigma)	33'6 g
formamida deionitzada 40% (47671, Sigma)	32 ml

Enrasar amb aigua fins a 100 ml. Dissoldre la solució mitjançant agitació i conservar a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ guardat de la llum.

Tampó d'electroforesi TAE 20x

Tris Base	96'8 g
Àcid acètic glacial	22'84 ml
EDTA 0'5 M	40 ml

Barrejar per agitació. Ajustar el pH a 7'4 i enrasar a un volum de 1000 ml amb aigua destil·lada. Esterilitzar 20 min a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$. Conservar a temperatura ambient.

TAE 1x

Fer una dilució 1/20 (v:v) a partir de la solució concentrada TAE 10x en aigua bidestil·lada estèril. Barrejar per agitació.

TNE 10x

Tris Base	12'1 g
NaCl	58'4 g
EDTA	3 g

Barreja per agitació. Ajustar el pH a 7'4 i enrasar a un volum de 1000 ml amb aigua destil·lada. Esterilitzar 20 min a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$. Conservar a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

TNE 1x

Fer una dilució 1/10 (v:v) a partir de la solució concentrada TNE 10x en aigua bidestil·lada estèril. Barrejar per agitació.

APS (10%)

Persulfat amònic (161-0700, Bio-Rad)	100 mg
Aigua destil·lada	1 ml

Dissoldre per agitació i mantenir a $-20\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Tampó de càrrega

Ficoll (pot ser substituït per sacarosa, glucosa o glicerol)	2'5 g
Tris 1M pH 8	0'5 ml
EDTA 5mM	0'2 ml
20x SDS	0'5 ml
Blau de bromofenol 8% (es pot substituir per orange G)	0'25 ml
Xilen cianol 8%	0'25 ml

Enrasar amb aigua fins a 20 ml. Dissoldre per agitació. Mantenir a la nevera o congelat.

Hibridació colonial mitjançant una sonda específica pels gèneres *Bifidobacterium* i *Bacteroides*

Procés de lisis cel·lular en la hibridació colonial pel gènere *Bifidobacterium*

- Transferència de les colònies crescudes en el medi corresponent sobre la membrana de niló. Es col·loca la membrana sobre paper Whatman 3 MM saturat amb solució de lisi amb lisozima (Merck, Darmstadt, Alemanya) en una concentració 5 mg/ml. Incubació durant 1h a 37°C.
- Transferència de la membrana sobre un nou paper Whatman 3 MM saturat amb solució desnaturalitzant. Incubació durant 10 min a temperatura ambient.
- Transferència de la membrana sobre un nou paper Whatman 3 MM saturat amb solució neutralitzant. S'ha incubat 2 h a temperatura ambient.
- S'ha rentat les restes cel·lulars amb solució 2x SSC amb 0,1% SDS incubant a temperatura ambient durant 4 min.
- S'ha assecat la membrana en un forn a 80°C durant 10 min.
- Fixació de l'ADN mitjançant una làmpada de llum ultraviolada (UV) durant 4 min per la cara de les cèl·lules i 2 min per la cara reversa. Un cop fixat l'ADN es pot procedir amb el procés d'hibridació o guardar la membrana a 4°C embolcallada amb film transparent fins al moment de fer-ho.

Procés de lisis cel·lular en la hibridació colonial pel gènere *Bacteroides*

- S'han transferit les colònies sobre una membrana de niló. S'ha col·locat la membrana sobre paper Whatman 3 MM saturat amb solució desnaturalitzant i s'ha incubat durant 4 min a temperatura ambient. A continuació s'ha incubat 4 min més amb la mateixa solució a 80°C.
- S'ha transferit la membrana sobre un nou paper Whatman 3 MM saturat amb solució neutralitzant i s'ha incubat durant 4 min a temperatura ambient.
- S'ha transferit la membrana sobre un nou paper Whatman 3 MM saturat de solució amb Proteïnasa K. La membrana s'ha incubat durant 30 min a 37°C sobre paper Whatman 3 MM saturat amb la solució.
- S'ha assecat la membrana en un forn a 80°C durant 10 min.
- Fixació de l'ADN mitjançant una làmpada de llum ultraviolada (UV) durant 4 min per la cara de les cèl·lules i 2 min per la cara reversa. Un cop fixat l'ADN es pot procedir amb el

procés d'hibridació o guardar la membrana a 4°C embolcallada amb film transparent fins al moment de fer-ho.

Reacció d'hibridació

- Dos rentats a 68°C durant 45 min en una solució 3x SSC amb un 0,1% de SDS. Fer pressió sobre la membrana dipositada entre dos fulls de paper Whatman 3 MM per tal d'eliminar les restes cel·lulars.
- Prehibridació de la membrana amb solució d'hibridació. Incubar en un forn d'hibridació en agitació durant 2-3 h a 60°C.
- Substituir la solució per 10 ml de solució d'hibridació que conté 25 ng/ml de la sonda marcada amb digoxigenina. Incubació al forn d'hibridació en agitació durant tota la nit a una temperatura adequada segons la temperatura d'hibridació de la sonda.

Detecció de la sonda marcada

- Dos rentats un primer de 15 min i un segon de 30 min amb solució 5x SSC amb SDS 0,1% a la mateixa temperatura en que s'ha dut a terme la hibridació. A continuació s'ha fet dos nous rentats, un de 15 min i un segon de 30 min amb 2x SSC amb SDS 0,1% a temperatura ambient en agitació.
- S'ha realitzat un rentat de la membrana durant 5 min amb solució de rentat a temperatura ambient i en agitació.
- Incubació de la membrana durant 30 min en tampó 2, a temperatura ambient i en agitació.
- Incubació durant 30 min en les mateixes condicions i amb tampó 2 al que s'ha afegit una concentració 1:10.000 d'anticòs antidigoxigenina conjugat amb la fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics).
- Per a eliminar l'excés d'anticòs s'ha realitzat dos rentats de 15 min en solució de rentat a temperatura ambient i agitació.
- S'ha equilibrat la membrana durant 5 min en tampó 3 en agitació a temperatura ambient.
- Finalment s'ha incubat la membrana en una dilució 1:50 del substrat colorimètric de la fosfatasa alcalina, NBT/BCIP (Roche Diagnostics) o amb una dilució 1:100 del substrat luminescent CSPD (Roche Diagnostics) en tampó 3.
- Quan s'ha utilitzat els substrat colorimètric, s'ha incubat a temperatura ambient i en condicions d'obscuritat un mínim de 30 min. S'ha aturat la reacció afegint aigua sobre la membrana.
- Quan s'ha utilitzat el substrat luminescent, s'ha incubat la membrana entre dos films a temperatura ambient durant 5 min. S'ha col·locat la membrana en una bossa de plàstic

segellada i dins un cassette autoradiogràfic. El conjunt ja s'ha incubat 10 min a 37°C. Per captar la senyal lumínica del substrat s'ha exposat la membrana a un film de radiografia un mínim de 60 min. S'ha revelat del film radiogràfic amb solucions de revelat i fixació fotogràfiques.

Solució de lisi utilitzada en la HC de *Bifidobacterium* spp.

Tris-HCl	10 mM
Sacarosa	250 mM

S'afegeix el Tris-HCl i la sacarosa i és dissolt mitjançant agitació. Ajustar el pH a 7,5. Esterilitzar a 121±3°C durant 20 min. La solució és estable a temperatura ambient. Just abans de ser utilitzada afegir:

Lisozima (10581, Merck)	5 mg/ml
-------------------------	---------

Solució desnaturalitzant utilitzada en la HC de *Bifidobacterium* spp.

NaOH	0,1 M
------	-------

Dissoldre per agitació. Esterilitzar a 121±3°C durant 20 min. La solució és estable a temperatura ambient.

Solució neutralitzant utilitzada en la HC de *Bifidobacterium* spp.

Acetat sòdic	0,1 M
--------------	-------

Ajustar el pH a 6. Dissoldre per agitació. Esterilitzar a 121±3°C durant 20 min. La solució és estable a temperatura ambient.

Solució desnaturalitzant utilitzada en la HC de *Bacteroides* spp.

NaOH	0,5 N
NaCl	1,5 M

Dissoldre per agitació. Esterilitzar a 121±3°C durant 20 min. La solució és estable a temperatura ambient.

Solució neutralitzant utilitzada en la HC de *Bacteroides* spp.

Tris-HCl (pH=7,4)	1 M
NaCl	1,5 M

Dissoldre per agitació. Esterilitzar a 121±3°C durant 20 min. La solució és estable a temperatura ambient.

Solució de la proteïnasa K utilitzada en la HC de *Bacteroides* spp.

Tris-HCl (pH=8,5)	50 mM
EDTA	50 mM
NaCl	100 mM
Na-laurilsarcosina	1% (p/v)
Proteïnasa K (3115879, Roche)	250 µg/ml

Es prepara just abans de ser utilitzada. Barrejar per agitació

Na-laurilsarcosina 10% (p/v)

Na-laurilsarcosina	10 g
Aigua bidestil·lada	100 ml

Dissoldre per agitació. Esterilitzar per filtració mitjançant un filtre de 0,22 µm. Guardar a temperatura ambient.

SSC 20x

NaCl	3 M
Citrat sòdic	0,3 M

Dissoldre per agitació. Ajustar el p a 7,0 i enrasar el volum. Esterilitzar a 121±3°C durant 20 min. La solució és estable a temperatura ambient.

SSC 5x, SDS 0,1% (p/v)

20x SSC	125 ml
SDS 10% (p/v)	5 ml
Aigua bidestil·lada estèril	370 ml

Preparar estèril i guardar a temperatura ambient.

SSC 3x, SDS 0,1% (p/v)

20x SSC	75 ml
SDS 10% (p/v)	5 ml
Aigua bidestil·lada estèril	420 ml

Preparar estèril i guardar a temperatura ambient.

SSC 2x, SDS 0,1% (p/v)

20x SSC	50 ml
SDS 10% (p/v)	5 ml
Aigua bidestil·lada estèril	445 ml

Preparar estèril i guardar a temperatura ambient.

SDS 10% (p/v)

Sodium dodecyl sulfat (822050, Merck)	100 g
Aigua bidestil·lada	1000 ml

Dissoldre per agitació i esterilitzar a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 20 min. La solució és estable a temperatura ambient.

Solució d'hibridació

SSC 20x	62,5 ml
Agent bloquejant 10% (p/v) (Roche)	50 ml
Na-laurilsarcosina 10% (p/v)	2,5 ml
SDS 10% (p/v)	0,5 ml
Aigua bidestil·lada estèril	134,5 ml

Preparar amb material estèril. Mantenir a $-20\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Agent bloquejant 10% (p/v)

Agent bloquejant	10 g
Tampó 1	100 ml

Esterilitzar $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 20 min. Mantenir a $-20\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Tampó 1

Àcid maleic	100 mM
NaCl	150 mM

Ajustar el pH a 7,5 amb patilles de NaOH i esterilitzar a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 20 min. Guardar a $4\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Tampó de rentat

Tampó 1	1000 ml
Tween 20	3 g

Esterilitzar a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 20 min. Guardar a $4\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Tampó 2

Tampó 1	450 ml
Agent bloquejant	50 ml

Preparar utilitzant material estèril. És estable durant 2 setmanes a $4\pm 3^{\circ}\text{C}$. Es pot mantenir a $-20\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Tampó 3

Tris-HCl 1 M pH 9,5	50 ml
NaCl 5M	10 ml
Aigua bidestil·lada estèril	440 ml

Preparar utilitzant material estèril. Guardar a $4\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Tris-HCl 1 M (pH 9,6)

Tris base	60,57 g
Aigua bidestil·lada	500 ml

Ajustar el pH a 9,6 utilitzant HCl. Dissoldre per agitació i esterilitzar a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 15 min. Guardar a temperatura ambient.

Preparació de les membranes de diàlisi per avaluar la persistència de *Bacteroides in situ*

- Les membranes s'han bullit durant 10 min en una solució de rentat de bicarbonat sòdic al 2% i EDTA 1 mM pH 8.
- Posteriorment s'han rentat amb aigua bidestil·lada.
- Finalment s'han bullit durant 10 min en una solució d'EDTA 1 mM i pH 8. S'han mantingut en aquesta dilució a 4°C fins al moment de ser utilitzades (un temps màxim de 6 mesos).

Solució de rentat de bicarbonat sòdic al 2% i EDTA 1 mM pH 8

Bicarbonat sòdic	20 g
EDTA	0,37 g

Ajustar el pH a 8 i enrasar a 1000 ml. Esterilitzar a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 20 min. Mantenir a temperatura ambient.

Solució d'EDTA 1 mM i pH 8

EDTA	0,37 g
------	--------

Ajustar el pH a 8 i enrasar a 1000 ml. Esterilitzar a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durant 20 min. Mantenir a temperatura ambient.