



Universidad de Barcelona
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

Vº Bº del Director de la tesis

Dr. Joan Jofre Torroella

Memoria presentada por
M^a Teresa Muniesa Pérez
para optar al grado de
Doctor en Biología

Barcelona, Julio de 1998

Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio: 94-96

2.3.2.- Estudio de las secuencias de los amplímeros obtenidos

2.3.2.1.- Comparación de los fragmentos del gen de Stx 2 obtenidos por PCR anidada

Se secuenciaron 20 amplímeros, 15 correspondientes a las muestras de aguas residuales de distintas procedencias y cinco muestras de Barcelona. El tamaño del fragmento secuenciado fue de aproximadamente 150 pb (Tabla 2.2). La longitud de cada una de las secuencias estudiadas presentó ligeras variaciones como ya se indicó en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo.

Se cotejaron las secuencias estudiadas con la secuencia descrita en el banco genético de la EMBL del gen de la Stx 2 del bacteriófago 933 W (código EMBL X07865). y se identificaron los nucleótidos que presentaron diferencias respecto a la secuencia de la Stx 2.

Las posiciones de los nucleótidos se representan en la siguiente figura (Figura 2.1), donde se muestra el alineamiento realizado con el programa Pile Up (Devereux y col., 1984).

Figura 2.1.- Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas de las muestras positivas para el gen de la Stx 2. Comparación con la secuencia del gen de la Stx 2 del bacteriófagos 933 W (código EMBL X07865).

	1				50
A1	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
A2	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
O2	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
F1	AATA T TTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTT CT CA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
F3	~~TACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTT T CA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
F4	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
F5	~~~~~TCT	ACCGTTTTTC	AGATTT T CA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
F6	~~~~CTTTCT	AC AG A A TTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCA T	TGCCCGGTGT
F9	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
I2	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
E3	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
SA1	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
SA4	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
NZ2	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
NZ3	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
BCN1	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
BCN2	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
BCN3	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
BCN4	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
BCN5	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT
Stx2	AATACTTTCT	ACCGTTTTTC	AGATTTTACA	CATATATCAG	TGCCCGGTGT



Secuencia del gen de la toxina Stx 2 (EMBL X07865)



Nucleótidos diferentes respecto a la secuencia del gen de la Stx 2 .

A1	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
A2	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
O2	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
F1	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	T CTGCAACGTG
F3	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
F4	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
F5	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
F6	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
F9	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
I2	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
E3	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
SA1	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
SA4	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
NZ2	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
NZ3	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
BCN1	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
BCN2	GACAAC G ATT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
BCN3	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
BCN4	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
BCN5	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATAACCACT	CTGCAACGTG
<u>Stx2</u>	<u>GACAACGGTT</u>	<u>TCCATGACAA</u>	<u>CGGACAGCAG</u>	<u>TTATAACCACT</u>	<u>CTGCAACGTG</u>



Secuencia del gen de la toxina Stx 2 (EMBL X07865)



Nucleótidos diferentes respecto a la secuencia del gen de la Stx 2 .

101

150

A1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
A2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
O2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F3	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F4	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F5	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F6	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F9	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
I2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
E3	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
SA1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
SA4	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
NZ2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
NZ3	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
BCN1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
BCN2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
BCN3	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
BCN4	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
BCN5	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Stx2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT



Secuencia del gen de la toxina Stx 2 (EMBL X07865)



Nucleótidos diferentes respecto a la secuencia del gen de la Stx 2 .

	151	160
A1	TCATCA~~~~	
A2	TCATCA~~~~	
O2	TCATCA~~~~	
F1	TCAT~~~~~	
F3	TCATC~~~~	
F4	TCATCA~~~~	
F5	TCATCA~~~~	
F6	TCATC~~~~	
F9	TCATCA~~~~	
I2	TCATCA~~~~	
E3	TCATCA~~~~	
SA1	TCATCA~~~~	
SA4	TCATCA~~~~	
NZ2	TCAT~~~~~	
NZ3	TCATCA~~~~	
BCN1	TCATCA~~~~	
BCN2	TCA~~~~~	
BCN3	TCATCA~~~~	
BCN4	T~~~~~	
BCN5	TCAT~~~~~	
<u>Stx2</u>	<u>TCATCATATC</u>	

X

Secuencia del gen de la toxina Stx 2 (EMBL X07865)



Nucleótidos diferentes respecto a la secuencia del gen de la Stx 2 .

Como se puede observar en la Figura 2.1, si bien la mayoría de las secuencias fueron idénticas en el fragmento secuenciado al gen de la Stx 2, en un 25 % de las secuencias estudiadas se detectaron diferencias de algunos nucleótidos. Atendiendo a estas diferencias, se calcularon los porcentajes de homología de cada secuencia con el gen de la Stx 2 para el fragmento secuenciado (Tabla 2.2). Asimismo se identificaron los nucleótidos que variaron en las secuencias estudiadas (nucleótido en la secuencia estudiada → nucleótido en el gen de la Stx2).

Tabla 2.2.- Porcentaje de homología y diferencias encontradas entre las secuencias estudiadas y la secuencia del gen Stx 2 incorporado en el bacteriófago 933 W (código EMBL X07865).

Alemania

Muestras	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
A1	156	-	100 %	-
A2	156	-	100 %	-

Austria

Muestra	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
O2	156	-	100 %	-

Francia				
Muestras	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
F1	154	4	97,4 %	T→C C→T T→A T→C
F3	153	1	99.3 %	T→A
F4	156	-	100 %	-
F5	149	1	99.3 %	T→A
F6	151	3	98.0 %	A→C A→T T→G
F9	156	-	100 %	-
Irlanda				
Muestra	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
I2	156	-	100 %	-

España				
Muestra	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
E3	156	-	100 %	-
Sudáfrica				
Muestra	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
SA1	156	-	100 %	-
SA4	156	-	100 %	-
Nueva Zelanda				
Muestra	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
NZ2	154	-	100 %	-
NZ3	156	-	100 %	-
(a) Número de nucleótidos presentes en las secuencias estudiadas que son diferentes respecto a la secuencia del gen de la Stx 2.				

A continuación se presentan los resultados de las secuenciaciones de los productos amplificados correspondientes a cinco series de cultivos de enriquecimiento realizadas con agua residual de la zona urbana de Barcelona, que fueron positivas para el gen de la Stx 2 (Tabla 2.3) y que fueron analizadas en los estudios que se describen en el capítulo 1 de esta memoria.

Tabla 2.3.- Comparación entre las secuencias de los amplímeros obtenidos en muestras del área urbana de Barcelona y la secuencia del gen de la Stx 2.

Muestras	Longitud del fragmento secuenciado	Número de nucleótidos diferentes ^(a)	% homología con Stx2	Tipo de nucleótido cambiado
BCN1	156	-	100 %	-
BCN2	153	1	99.3 %	A → G
BCN3	156	-	100 %	-
BCN4	151	-	100 %	-
BCN5	154	-	100 %	-

(a) Número de nucleótidos presentes en las secuencias estudiadas que son diferentes respecto a la secuencia del gen de la Stx 2.

2.3.2.2.- Comparación con variantes de la toxina Stx2

Como ya se indicó en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo, en primer lugar se realizó una comparación de las secuencias de las variantes de la Stx 2 existentes en los bancos genéticos (Ver Tabla 2.2 del apartado de Materiales y Métodos de este capítulo), con la secuencia del gen de la Stx 2 inserto en el fago 933 W, en el fragmento correspondiente a las muestras estudiadas (Tabla 2.4).

Tabla 2.4.- Porcentaje de homología de las secuencias de las variantes de la toxina Stx 2 depositadas en los bancos genéticos de la EMBL y el GenBank con la secuencia de la toxina Stx 2 en el fragmento de 160 pb estudiado.

Tipo de variante	Código EMBL	Código utilizado	Nucleótidos no coincidentes con el gen de la Stx 2	% de homología con el gen de la Stx 2
Stx 2v	L11078	V1	0	100 %
Stx 2v	L11079	V2	0	100 %
Stx 2v	X65949	V3	0	100 %
Stx 2v ^(a)	M21534	V4	6	96,2 %
Stx 2a	M29153	Va	36	77,5 %
Stx 2c	M59432	Vc1	0	100 %
Stx 2vhc	X61283	Vc2	0	100 %
Stx 2c	X67514	Vcf	0	100 %
Stx 2e	X81418	Ve1	6	96,2 %
Stx 2e	X81417	Ve2	7	95,6 %
Stx 2e	X81416	Ve3	7	95,6 %
Stx 2e	X81415	Ve4	7	95,6 %
Stx 2e	U72191	Ve5	8	95,0 %
Stx 2	Z50754	Enc	0	100 %

(a) Posteriormente descrita como Stx 2e (ver Introducción de este capítulo).

Se puede observar que la mayoría de las variantes estudiadas presentan una secuencia en el fragmento estudiado (160 pb), idéntica a la del gen de la toxina Stx 2. Sin embargo, las secuencias de las variantes V4, Va y Ve1, 2, 3, 4 y 5 (códigos EMBL M21534, M29153, X81418, X81417, X81416, X81415 y U72191 respectivamente), presentan variaciones respecto al gen de la Stx 2 (código EMBL X07865) en el fragmento estudiado.

A continuación se incorporaron al estudio las cinco secuencias que presentaron diferencias con el gen de la Stx 2 en el fragmento estudiado, las correspondientes a las muestras F1, F3, F5, F6 y BCN 2, (ver apartado 2.3.2.1, Tabla 2.2) y se compararon con las secuencias de todas las variantes. Para ello se procedió de manera idéntica a la ya descrita, mediante un alineamiento múltiple de las secuencias que presentaron variación respecto a la Stx 2 con las secuencias de las variantes de la Stx 2 (Figura 2.2).

Figura 2.2.- Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas de las muestras positivas y el gen de la Stx 2 por PCR anidada que presentan diferencias con el gen de la Stx2. Comparación con las secuencias de los genes de variantes de la Stx2.

1	50
F1	AATA T TTTCT ACCGTTTTTC AGATTT C TCA CATATATCAG TGCCCGGTGT
F3	~~TACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTT T CA CATATATCAG TGCCCGGTGT
F5	~~~~~TCT ACCGTTTTTC AGATTTT T CA CATATATCAG TGCCCGGTGT
F6	~~~~CTTTCT AC A GA T TTTTC AGATTTTACA CATATATCA T TGCCCGGTGT
BCN2	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
Stx2	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
V1	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
V2	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
V3	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
V4	AATACTTTCT AC A GA T TTTTC AGATTTT G CA CATATATCA T TGCCCGGTGT
Va	AATA T C T TTT AC A GA T T T TC C GATTT C TCA CATAT T TCAG TGCC T GATGT
Vc1	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
Vc2	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
Vcf	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT
Ve1	AATACTTTCT AC A GA T TTTTC AGATTTT G CA CATATATCA T TGCCCGGTGT
Ve2	AATACTT C CT AC A GA T TTTTC AGATTTT G CA CATATATCA T TGCCCGGTGT
Ve3	AATACTT C CT AC A GA T TTTTC AGATTTT G CA CATATATCA T TGCCCGGTGT
Ve4	AATACTT C CT AC A GA T TTTTC AGATTTT G CA CATATATCA T TGCCCGGTGT
Ve5	AATACTTTCT AC A GA T TTTTC AGATTTT G CA CATATATCA T TGCC T GGTGT
Enc	AATACTTTCT ACCGTTTTTC AGATTTTACA CATATATCAG TGCCCGGTGT

X Secuencia de la Stx 2 (EMBL X07865)

■ Nucleótidos coincidentes con la secuencia Va

■ Nucleótidos coincidentes con la secuencia V4

■ Nucleótidos coincidentes con la secuencia Ve1

Ve2, Ve3, Ve4 y Ve5

X Nucleótidos en Va diferentes a Stx2

X Nucleótidos en V4 diferentes a Stx2

X Nucleótidos en Ve1, Ve2, Ve3, Ve4

y Ve5 diferentes a Stx2

F1	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	T TGCAACGTG
F3	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
F5	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
F6	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
BCN2	GACAAC G ATT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
<u>Stx2</u>	<u>GACAACGGTT</u>	<u>TCCATGACAA</u>	<u>CGGACAGCAG</u>	<u>TTATACCACT</u>	<u>CTGCAACGTG</u>
V1	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
V2	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
V3	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
V4	GACAAC TA TT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Va	<u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>T</u> T	TCCATGAC <u>G</u> A	CGGACAGCAG	TTAT <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u>	T <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u>
Vc1	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Vc2	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Vcf	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Ve1	GACAAC T ATT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Ve2	GACAAC T ATT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Ve3	GACAAC T ATT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Ve4	GACAAC T ATT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Ve5	GACAAC T ATT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG
Enc	GACAACGGTT	TCCATGACAA	CGGACAGCAG	TTATACCACT	CTGCAACGTG

X	Secuencia de la Stx 2 (EMBL X07865)	
■	Nucleótidos coincidentes con la secuencia Va	X Nucleótidos en Va diferentes a Stx2
■	Nucleótidos coincidentes con la secuencia V4	X Nucleótidos en V4 diferentes a Stx2
■	Nucleótidos coincidentes con la secuencia Ve1	X Nucleótidos en Ve1, Ve2, Ve3, Ve4 y Ve5 diferentes a Stx2
	Ve2, Ve3, Ve4 y Ve5.	

101

150

F1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F3	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F5	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
F6	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
BCN2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Stx2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
V1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
V2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
V3	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
V4	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Va	TCGCAG <u>AT</u> CT	GGAACG <u>TACA</u>	GGGATGC <u>AGA</u>	<u>TTGGG</u> CGTCA	<u>TT</u> CACTGGTT
Vc1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Vc2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Vcf	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Ve1	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Ve2	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Ve3	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Ve4	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Ve5	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT
Enc	TCGCAGCGCT	GGAACGTTCC	GGAATGCAAA	TCAGTCGTCA	CTCACTGGTT

X Secuencia de la Stx 2 (EMBL X07865)

 Nucleótidos coincidentes con la secuencia Va

X Nucleótidos en Va diferentes a Stx2

 Nucleótidos coincidentes con la secuencia V4

X Nucleótidos en V4 diferentes a Stx2

 Nucleótidos coincidentes con la secuencia Ve1
Ve2, Ve3, Ve4 y Ve5

X Nucleótidos en Ve1, Ve2, Ve3, Ve4
y Ve5 diferentes a Stx2

	151	160
F1	TCAT~~~~~	
F3	TCATC~~~~	
F5	TCATCA~~~~	
F6	TCATC~~~~	
BCN2	TCA~~~~~	
<u>Stx2</u>	<u>TCATCATATC</u>	
V1	TCATCATATC	
V2	TCATCATATC	
V3	TCATCATATC	
V4	TCATCATATC	
Va	<u>GGTTCATATC</u>	
Vc1	TCATCATATC	
Vc2	TCATCATATC	
Vcf	TCATCATATC	
Ve1	TCATCATATC	
Ve2	TCATCATATC	
Ve3	TCATCATATC	
Ve4	TCATCATATC	
Ve5	TCATCGTATC	
Enc	TCATCATATC	

X Secuencia de la Stx 2 (EMBL X07865)



Nucleótidos coincidentes con la secuencia Va

X Nucleótidos en Va diferentes a Stx2



Nucleótidos coincidentes con la secuencia V4

X Nucleótidos en V4 diferentes a Stx2



Nucleótidos coincidentes con la secuencia Ve1
Ve2, Ve3, Ve4 y Ve5

X Nucleótidos en Ve1, Ve2, Ve3, Ve4
y Ve5 diferentes a Stx2

Tabla 2.6.- Porcentaje de homología de la secuencias estudiadas con la secuencia del gen de la Stx 2 y de siete de sus variantes en el fragmento estudiado (160 pb).

Muestras	% de homología con el gen de la Stx 2 y sus variantes					
	Stx 2	V4 ^(a)	Va	Ve 1	Ve 2, Ve 3 y Ve 4 ^(b)	Ve 5
F1	97,4 %	94,1 %	79,2 %	94,1 %	93,5 %	93,5 %
F3	99,3 %	96,1 %	77,1 %	96,1 %	95,4 %	95,4 %
F5	99,3 %	96,0 %	77,8 %	96,0 %	95,3 %	94,6 %
F6	98,0 %	98,0 %	76,8 %	98,0 %	97,3 %	97,3 %
BCN2	99,3 %	96,7 %	75,8 %	96,7 %	96,1 %	96,1 %

(a) Definida en el banco genético como Stx 2v, posteriormente clasificada como Stx 2e.

(b) Estas tres variantes presentan la misma secuencia en el fragmento estudiado (Figura 2.2), por lo que las homologías de las secuencias estudiadas con las secuencias de estas variantes se han analizado conjuntamente

Una de las secuencias, la correspondiente a la muestra F6, presentó idéntica homología entre las secuencias de la Stx 2, de la variante V4 (posteriormente Stx 2e) y de la Stx 2e descrita por Franke y col. (Ve 1). Las otras secuencias, presentaron una homología menor con las secuencias de las variantes de la toxina de la que presentaron con el gen de la Stx 2, aunque se pudieron observar homologías muy altas.

Con los resultados obtenidos no se intenta identificar las secuencias estudiadas, dado que somos conscientes de la escasa longitud de la cadena secuenciada, que fue además inicialmente elegida por ser una zona muy conservada. Sin embargo, este estudio pretende señalar que no todos los bacteriófagos que se detectaron el método descrito transportan genes exactamente iguales en cuanto a secuencia. Esta observación indica que tanto la Stx 2 como sus variantes puedan ser transportadas insertas en el genoma de bacteriófagos purificados del agua residual.

Capítulo 2

2.4.- Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales es un hecho bastante general que se da en zonas geográficas muy alejadas y que por tanto no es exclusivo de la zona de Barcelona. Aunque sólo se analizó una muestra de cada origen, se puede tener una idea de que no se está observando un hecho aislado, sino que se repite con relativa frecuencia.

Dado que sólo se analizó una muestra de cada origen, no se pudo, en esta ocasión, estimar el número de fagos portadores del gen de la Stx 2, tal como se hizo en el capítulo 1 para las muestras de aguas residuales de Barcelona. No obstante, los resultados obtenidos mediante la técnica de enriquecimientos utilizada permiten tener una idea aproximada de la cantidad de estos fagos según el volumen mínimo en que se detectan.

No parece existir ninguna distribución geográfica en los fagos portadores del gen de la Stx 2, sino que los resultados obtenidos indicaron una incidencia generalizada. Esto está en concordancia con la amplia distribución geográfica de las epidemias producidas por *E. coli* O157:H7 y otros serotipos de *E. coli* productores de la Stx 2, tal y como se ha comentado en la introducción de este capítulo.

Por los resultados obtenidos, se puede afirmar que la cantidad de fagos que transportan el gen de la Stx 2 no es una variable directamente relacionada con el número de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7, sino que las proporciones de estos fagos en la población total de fagos que infectan a O157:H7 es variable según la muestra. Se han estudiado muestras que presentan un número de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 relativamente bajo donde, sin embargo, se detecta la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2. Por el contrario, se observaron otras muestras con un número de fagos infecciosos para O157:H7 relativamente elevado donde no se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2. En muestras con niveles extremadamente bajos de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 (por ejemplo muestras de Suecia, muestra número 7 en Francia, número 1 en Nueva Zelanda o número 5 en Sudáfrica) no se detectó nunca la presencia de fagos portadores del gen de la toxina.

En las muestras analizadas de la zona de Barcelona descritas en el capítulo 1, se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en todas las muestras estudiadas. Sin embargo, en las muestras geográficamente alejadas analizadas en este capítulo no siempre se obtuvieron resultados positivos. Hay dos explicaciones plausibles para este hecho. Una es de tipo técnico puesto que, como se indicó en el apartado de Materiales y Métodos de este capítulo, las muestras estuvieron sometidas a diferentes condiciones durante el transporte, lo cual implica una posible inactivación de los fagos presentes en estas aguas. Por el contrario, las muestras que se estudiaron provenientes del área de Barcelona siempre fueron analizadas el mismo día del muestreo.

La segunda explicación viene dada teniendo en cuenta la relación entre las muestras de agua residual y el número de habitantes correspondientes a cada muestra. Las aguas residuales de Barcelona provenían de una zona con un elevado número de habitantes (1.400.000 en la planta 1 y 400.000 en la planta 2, como se comentó en el apartado de Materiales y Métodos del capítulo 1). Sin embargo, las muestras provenientes de otras zonas fueron, en su mayoría, correspondientes a zonas urbanas con un número de habitantes muy inferior. Si sólo hay una fracción de la población total excretando bacteriófagos, se reduce la probabilidad de encontrar fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas residuales.

De todas las muestras analizadas, cuatro correspondían a aguas residuales con contaminación de origen animal. En una de estas muestras se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2. Por lo tanto, la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 no es exclusiva de la contaminación fecal humana. Esta presencia también se observó en las muestras de agua residual procedentes de matadero estudiadas en el capítulo 1. Estos resultados presentan concordancia con el hecho de que diversas cepas portadoras del gen de la Stx 2 se han aislado a partir de heces de origen animal (Celemin y col., 1994; Samadpour y col., 1994; Wang y col., 1996; Beutin y col., 1997), y de que la contaminación de alimentos de origen animal son uno de los principales vehículos de transmisión de la O157:H7 (Blanco y col., 1995; Faith y col., 1996).

Al igual que en alguna de las muestras estudiadas en el capítulo 1, también se observó en algunas de las series de cultivos de enriquecimiento analizadas en este capítulo que, en los volúmenes mayores de una muestra analizados, no se detectó la presencia de fagos portadores del gen de la toxina, mientras que sí fueron detectados en volúmenes inferiores de la misma muestra. Como ya se ha indicado en el apartado de discusión del capítulo 1, hay dos explicaciones a este hecho. En primer lugar, la

existencia de otros fagos con mayor capacidad lítica que los fagos portadores del gen de la Stx 2; en segundo lugar la probabilidad estadística de que los fagos portadores del gen de la Stx 2 se hallen presentes en los volúmenes estudiados.

Los resultados de la secuenciación de los amplímeros obtenidos por PCR anidada, indicaron, con un alto porcentaje de homología, que el amplímero obtenido por PCR anidada se correspondió exactamente con la secuencia del gen de la Stx 2 inserta en el fago 933 W. Sin embargo, cinco de los amplímeros secuenciados presentaron pequeñas variaciones con respecto al gen de la Stx 2.

Como se ha descrito en la introducción de este capítulo, existen numerosas variantes de la toxina Stx 2 y, posiblemente, existan otras variantes que aún no se han descrito y que no se conocerán hasta que se vayan estudiando nuevas secuencias. Algunas de las secuencias de las variantes coinciden completamente en el fragmento estudiado con el gen de la Stx 2. Otras, en cambio, presentan ciertas diferencias.

Los cebadores utilizados para la PCR anidada estaban inicialmente diseñados para la detección del gen de la Stx 2, por ello en algún caso no son totalmente óptimos para amplificar secuencias correspondientes a las variantes de la Stx 2 (por ejemplo la Stx 2a). No obstante, dado que los cebadores se sitúan en una zona conservada del gen, en la mayoría de los casos presentan total homología con las secuencias de las variantes y muestran una elevada especificidad.

La comparación de las cinco secuencias estudiadas que diferían del gen de la Stx 2 con las secuencias de algunas de las variantes que también diferían del gen de la Stx 2 permitió observar que existía cierta coincidencia entre las diferencias presentes en las muestras estudiadas y las diferencias presentes en las secuencias de las variantes de la Stx 2.

Cuando se calculó la homología, se observó que una de las secuencias estudiadas (correspondiente a la muestra F6) presentó idéntica homología con el gen de la Stx 2 y con las secuencias de dos de las variantes de la Stx 2. Estas variantes son la Stx 2v (V4), posteriormente descrita como Stx 2e (Johnson y col., 1990), y con la Stx 2e (Ve1) (Franke y col. 1995). Sin embargo, la comparación realizada no pretende identificar las secuencias estudiadas. Dada la escasa longitud de la secuencia estudiada y la utilización de unos cebadores menos específicos, consideramos que no se puede afirmar que se han detectado fagos portadores del gen de la variante Stx 2e.

Aunque ninguna de las secuencias estudiadas sea idéntica a alguna de las variantes descritas, hay una cierta variación entre ellas. Esto indica claramente que los fagos transportan diferentes secuencias y no se puede excluir la posibilidad de que, en ocasiones, pudieran transportar los genes que codifican para alguna de las variantes de la Stx 2. En efecto, parece lógica la posibilidad de que al igual que sucede con el gen de la Stx 2 y el fago 933 W (O'Brien y col. 1984) o con el gen de la Stx 1 y el fago 933 J (Jackson y col., 1987), los genes que codifican para sus variantes sean también transportadas por bacteriófagos.

Algunos autores señalan que los genes de algunas variantes no están transportados por bacteriófagos (Yee y col, 1993, Marques y col., 1987), sino que son cromosómicos. Sin poner en duda estas afirmaciones, cabe destacar que algunos de estos mismos autores detectan un incremento importante en la producción de estas variantes de la Stx 2 al tratar el cultivo con Mitomicina C (Yee y col., 1993). La Mitomicina C es un inductor de lisogenia. Se ha descrito que en presencia de Mitomicina C se produce un incremento del número de fagos en el sobrenadante de los cultivos. Esto se corresponde con un aumento en el número de copias del gen de la toxina y, consecuentemente, en un aumento en la producción de toxina en los cultivos tratados (Mühldorfer y col., 1996). En vista de estos datos, cabe la posibilidad de que las afirmaciones respecto a la posición cromosómica de los genes de las variantes de la Stx 2, estén basadas en que aún no se ha podido demostrar la existencia de fagos portadores de los genes que codifican para las variantes de la Stx 2.

En esta misma línea, algunos autores sugieren la posibilidad de que algunas variantes estén englobadas en el genoma de bacteriófagos que aún no se hayan aislado, como es el caso de la Stx 2c (Schmitt y col., 1991). Si los genes de las variantes son o no transportados en el genoma de bacteriófagos, es un tema pendiente de estudio (Takeda y col., 1993).

Con los resultados presentados en este capítulo se indica una cierta variabilidad en la secuencia del fragmento estudiado del gen de la Stx 2 y se refuerza la posibilidad de que existan fagos portadores de genes que codifican para variantes de la Stx 2. Aumentando la longitud de la secuencia estudiada, el método descrito aquí podría ser adecuado para realizar un estudio de la variabilidad de los fagos portadores del gen de la Stx 2.

*Capítulo 3:
Persistencia de los bacteriófagos
portadores del gen de la Stx 2*

Capítulo 3:

Persistencia de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2

3.1.- Introducción

Como se ha mostrado en los resultados presentados en los capítulos 1 y 2, los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2, infecciosos para *E. coli* O157:H7, se encuentran presentes en aguas residuales de diversas partes del mundo, en cantidades relativamente elevadas. A fin de ampliar el conocimiento sobre estos fagos, los siguientes estudios estuvieron dirigidos a evaluar la persistencia de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para *E. coli* O157:H7 en el medio ambiente.

3.1.1.- Contaminación fecal de aguas y alimentos

La contaminación de productos destinados al consumo por microorganismos de origen fecal es uno de los vehículos principales de transmisión de enfermedades.

La contaminación fecal presente en un determinado producto puede ser reciente, es decir, cercana en tiempo y espacio al origen de la contaminación, o remota (lejana en tiempo y espacio al origen de la contaminación). Desde el origen de la contaminación suelen tener lugar una serie de procesos de inactivación natural o artificial que actúan con eficacia variable sobre los diferentes tipos de microorganismos presentes en dicha contaminación. Estos procesos de inactivación influyen especialmente en aquellas muestras que presenten un tipo de contaminación remota, dado que la lejanía desde el origen de contaminación aumenta la posibilidad de que tengan lugar.

Cuando se produce una contaminación de aguas o alimentos con diversos microorganismos de origen fecal, los procesos de inactivación que tienen lugar desde el

origen de la contaminación hasta la ingestión de las aguas o alimentos por parte del consumidor, determina la posibilidad de que éste sea infectado por dichos microorganismos. Esta posibilidad es especialmente peligrosa cuando el producto está contaminado por microorganismos patógenos con dosis infecciosas bajas, como es el caso de las cepas de *E. coli* O157:H7 patogénicas (Coia, 1998).

Es importante evaluar el efecto de los procesos de inactivación sobre los diferentes grupos de microorganismos a fin de minimizar los riesgos.

3.1.2.- Procesos causantes de la inactivación de microorganismos.

De los diversos procesos de inactivación de microorganismos que pueden tener lugar, algunos ocurren de forma natural, mientras que otros se aplican a modo de tratamiento para eliminar los microorganismos presentes en productos destinados al consumo humano.

La aplicación de uno u otro proceso es dependiente de la contaminación presente en el producto a tratar y de la naturaleza del producto en si mismo. Así, estos procesos serán diferentes, por ejemplo, en los tratamientos aplicados a alimentos o a aguas.

En el caso de los alimentos, existen diversos tratamientos para evitar la contaminación por parte de organismos patógenos de los alimentos destinados al consumo. Uno de los más utilizados en el tratamiento de bebidas y alimentos es la pasteurización (Stanier, 1970).

En el caso del agua, la inactivación de microorganismos de origen fecal presentes en el medio acuático puede tener lugar como parte de un proceso natural. En este caso influyen, entre otros, factores como la luz solar, la temperatura, la materia en

suspensión, o la actividad biológica por parte de otros microorganismos (Zaiss y Hennies, 1988).

Entre los tratamientos artificiales se encuentran el tratamiento en origen, depuración de aguas residuales y el tratamiento aplicado en aguas destinadas al consumo. Entre éstos últimos destacan el uso de desinfectantes, radiaciones ultravioleta o los procesos de tratamiento que se realizan en plantas depuradoras.

3.1.3.- Persistencia de bacterias y bacteriófagos frente a procesos de inactivación

Los estudios dirigidos a observar la diferente persistencia de microorganismos de origen fecal frente a procesos de inactivación son muy numerosos (Bell y col., 1976; Kott y col. 1978; Zaiss, 1982; Chang y col., 1985; Tartera y col., 1988; Omura y col., 1989)

Si bien los bacteriófagos son un grupo heterogéneo y su resistencia no puede ser definida de manera universal, estudios realizados comparativamente entre bacteriófagos y bacterias de origen fecal, indican mayor persistencia de los bacteriófagos frente a diferentes tratamientos de inactivación y desinfección que las bacterias (IAWPRC Study Group on Health Related Microbiology. 1991).

De los diversos estudios realizados sobre la inactivación diferencial de bacterias y bacteriófagos frente a diferentes procesos de inactivación, muchos se centran en la inactivación diferencial de bacterias y bacteriófagos frente a procesos de tratamientos de aguas. Todos ellos indican la mayor persistencia de bacteriófagos frente a procesos de inactivación natural (Niemi, 1975; Zaiss y Hennies, 1988), desinfectantes químicos, entre los que destaca el cloro (Tartera y col., 1988; Sobsey, 1989), radiación ultravioleta (Havelaar y col., 1987; Tartera y col., 1988; Bosch y col.,

1989) o frente a los procesos de tratamiento complejos aplicados en plantas depuradoras (Sobsey, 1989; Payment y col, 1993; Jofre y col., 1995).

3.1.4.- Persistencia de *E. coli* O157:H7 y de los bacteriófagos que la infectan frente a procesos de inactivación

No existe información que describa como afectan los diferentes procesos de inactivación a la persistencia de *E. coli* O157:H7 y de los fagos que la infectan.

3.1.5.- Inactivación diferencial de los bacteriófagos

Del mismo modo que bacterias y bacteriófagos presentan diferente persistencia frente a determinados procesos, entre los bacteriófagos también podemos encontrar diferentes grados de inactivación. Dicha inactivación se produce de manera diferencial atendiendo, entre otras causas, a la morfología de los bacteriófagos (Rhodes y Kator, 1991, Lasobras y col., 1997).

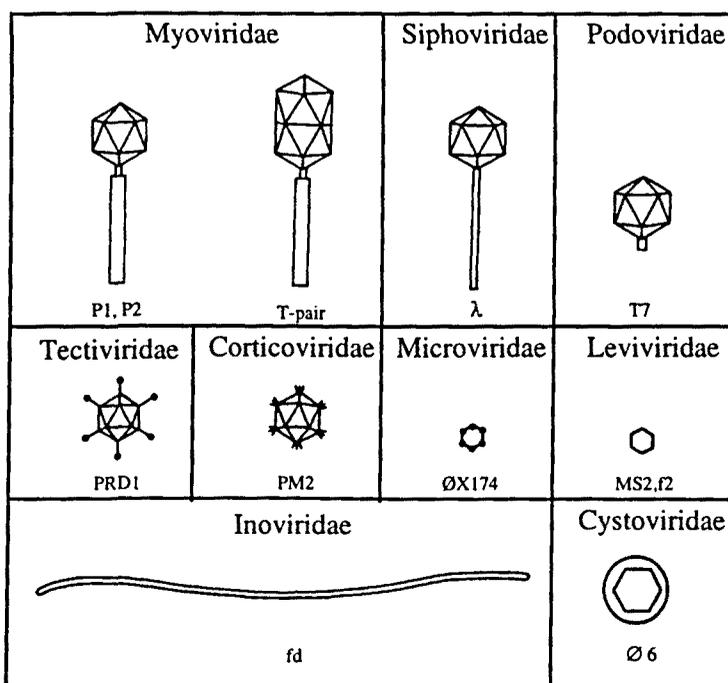
Los datos existentes indican que en las muestras donde hay contaminación remota respecto a las que la contaminación es reciente, se da una diferente distribución de los tipos morfológicos de los fagos que se detectan con una determinada cepa huésped, de manera que después de un tratamiento de depuración, los fagos que se detectan son distintos morfológicamente a aquéllos detectados antes del tratamiento (Dee y col. 1992, Lasobras y col., 1997). Por ello se cree que tanto la inactivación natural como los tratamientos de depuración y potabilización, pueden seleccionar favorablemente la persistencia de unos tipos morfológicos concretos respecto a otros.

3.1.5.1.- Morfologías de bacteriófagos

Los virus bacterianos son uno de los grupos más heterogéneos que existen. La gran cantidad de morfologías existentes hacen extremadamente difícil su clasificación. A pesar de ello existen diferencias claras que permiten englobar los bacteriófagos en ciertas categorías principales. Estas clasificaciones responden a diferentes criterios como son la morfología general, el tamaño de la cápside y de la cola (si la poseen), el tipo de ácido nucleico, si presentan o no cubiertas sobre la cápside, etc. (Francki y col., 1991).

La clasificación actual de los bacteriófagos según el Comité Internacional de Taxonomía Vírica (Francki y col., 1991) agrupa los bacteriófagos en las siguientes familias, *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Tectiviridae*, *Corticoviridae*, *Microviridae*, *Leviviridae*, *Inoviridae* y *Cystoviridae* (Figura 1). De todos éstos, los bacteriófagos pertenecientes a las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae* son los más frecuentemente descritos, lo cual hace suponer que son los más abundantes en el medio ambiente.

Figura 1.- Familias de bacteriófagos



3.1.5.2.- Tipos morfológicos de colifagos somáticos más abundantes

Algunas bacterias son infectadas por tipos morfológicos concretos de bacteriófagos, mientras que otras son susceptibles de infección por bacteriófagos de morfologías variadas. Éste es el caso de la especie *Escherichia coli*. Esta especie y en concreto la cepa C (Pedroso y Martins, 1995) presenta susceptibilidad de infección por al menos cinco grandes grupos morfológicos de bacteriófagos, englobados en la categoría de colifagos somáticos. Se entiende por colifagos somáticos aquéllos que para producir la infección bacteriana se asocian con un receptor somático de la superficie de *E. coli*.

Las familias de colifagos somáticos capaces de infectar a la cepa C de *E. coli*, según la clasificación actual del Comité Internacional de Taxonomía Virica son: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae*. Las tres primeras corresponden a los llamados “fagos con cola”, mientras que los fagos pertenecientes a la familia *Microviridae* no la poseen.

3.1.5.2.1.- Fagos con cola

Son muy variables en lo que se refiere a sus dimensiones y a sus propiedades fisicoquímicas. En general presentan una cápside, una cola y unos orgánulos de fijación. No presentan cobertura. Las cápsides son isométricas o alargadas y son icosaédricas o derivados formados por capsómeros triangulares fácilmente visibles. Las colas pueden ser largas o cortas, contráctiles o no, y presentan lisozimas en su extremo. El rango de densidad en gradientes de CsCl oscila entre 1.4 y 1.5 g/cm³.

Infectan uniendo su cola a la superficie de la bacteria, mediante los lisozimas degradan la pared celular y introducen el ADN en el interior de la bacteria. La replicación del ADN depende del huésped. Suele producirse una procápside y

diferentes líneas de síntesis para los componentes del fago. Los fagos maduros se dispersan en el interior celular hasta que se produce la lisis bacteriana.

Familia *Myoviridae*

Grupo de fagos con cola contráctil, conocidos comúnmente como T-Fagos. Los miembros más destacados de este grupo son los bacteriófagos T2, T4, T6, C16 entre otros.

Presentan diámetro de la cápside de 110 x 80 nm. Esta cápside presenta simetría hexagonal y puede ser alargada o isométrica. Tienen una cola contráctil de 110 nm unida a la cápside por un “collar” y en su otro extremo presenta en su base una placa con fibras. Son fagos de doble cadena de ADN con un porcentaje G+C del 35%. Su nombre deriva del griego *myos*, que significa músculo, referido a la cola contráctil.

Familia *Siphoviridae*

Grupo de fagos con cola larga no contráctil conocidos más comúnmente como fagos lamboides. Son miembros de este grupo el colifago λ , PA2, ØD328, Ø80 y los fagos de *Bacteroides fragilis* (Booth y col., 1979).

El diámetro de la cápside es de 60 nm y suele ser asimétrica. Tienen cola flexible y no contráctil de longitud variable que oscila entre los 64 a los 570 nm aunque los tipos más comunes presentan colas de aproximadamente 150 nm. Se observan morfologías de cola muy variadas, siendo en algunos casos recta y en otros casos mucho más curvada. Poseen un ADN de doble cadena con un porcentaje G+C del 50%

Su nombre deriva del griego *sipho* o tubo, referido a la cola larga.

Familia *Podoviridae*

Son bacteriófagos con cola corta. Conocidos como T-7 Fagos. Son miembros de esta familia los fagos T7, T3, H, PTB, ØI y ØII.

Presentan una cápside isométrica de 60-65 nm de diámetro, con cola corta de unos 8 nm de longitud y una placa basal con fibras. Son fagos de doble cadena de ADN con un porcentaje G+C del 50%.

Su nombre deriva del griego *podos* que significa pie, referido a la cola corta.

3.1.5.2.2.- Fagos sin cola: Familia *Microviridae*

Grupo de fagos sin cola. No presentan cubierta. El género más común corresponde al grupo de fagos ØX, como el fago ØX174. Presentan una cápside icosaédrica de 25-30 nm. con partículas en los vértices de la cápside. Su ADN es cíclico y monocatenario, con un % G+C del 44%.

Derivación del nombre: *mikros* : pequeño.

NOTA: Las cuatro familias descritas anteriormente se corresponden a una clasificación anterior realizada por D. E. Bradley en 1987. Bradley agrupó las diferentes morfologías de bacteriófagos en tipos, nombrándolos alfabéticamente. El tipo A correspondía a la familia *Myoviridae*, el tipo B a la *Siphoviridae*, el tipo C a la *Podoviridae* y el tipo E a la *Microviridae*.

3.1.6.- Persistencia de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2

La información disponible sobre los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2, indican que estos fagos son del tipo lambda (λ), (Samadpour y col. 1995; Datz y col., 1996). El fago λ pertenece a la familia de fagos *Siphoviridae* (Francki y col., 1991).

Dado que no existen estudios precedentes sobre la presencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 en el medio ambiente, se desconoce la persistencia que presentan estos fagos en aguas residuales.

3.1.7.- Objetivos

Por todo lo expuesto anteriormente se consideró la posibilidad de que los procesos de inactivación actuaran de forma diferente sobre los fagos portadores del gen de la Stx 2, que sobre el total de fagos que infectan a *E. coli* O157:H7. Partiendo de dicha consideración, se fijaron los siguientes objetivos:

Estudiar la persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 sometidos a diferentes procesos de inactivación y comparar esta persistencia con la que presenta *E. coli* O157:H7.

Estudiar la inactivación diferencial de los tipos morfológicos de bacteriófagos presentes en muestras de agua sometidas a diferentes procesos de inactivación a fin de conocer qué tipo morfológico presenta mayor persistencia frente a dichos procesos y en su caso tener una estimación aproximada de la supervivencia diferencial de los bacteriófagos que transportan el gen de la Stx 2.

Capítulo 3

3.2.- Materiales y Métodos

3.2.1.- Estudio de persistencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

3.2.1.1.- Persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 ante procesos de inactivación natural

Para el estudio de la persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 frente a procesos de inactivación natural se analizó, en primer lugar, la presencia de estos fagos en agua de río. En segundo lugar se amplió el estudio para evaluar la inactivación de estos fagos frente a la inactivación natural mediante experimentos de inactivación natural "*in situ*".

3.2.1.1.1.- Presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua de río

3.2.1.1.1.1.- Muestras utilizadas

Se analizaron muestras provenientes del río Llobregat a la entrada de la planta potabilizadora de Abrera (perteneciente al Consorcio Ter-Llobregat). Estas muestras se corresponden a una zona del río Llobregat muy bien conocida por nuestro grupo de investigación y que tiene unos niveles de contaminación fecal inferiores a los de las aguas residuales, como consecuencia de cierto proceso de dilución y depuración natural. Este proceso se aprecia por un cambio en las relaciones entre los números de los diferentes microorganismos. Este cambio es favorable a los microorganismos más persistentes.

3.2.1.1.1.2.- Caracterización de las muestras

Las muestras se caracterizaron por enumeración de los colifagos somáticos (utilizando CN13 como cepa huésped) y de los fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888). La enumeración de los bacteriófagos se realizó por el método de la doble capa de agar con el medio Scholten's modificado. El protocolo de enumeración de bacteriófagos se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

3.2.1.1.1.3.- Detección de los fagos portadores del gen de la Stx 2

Para el análisis de los fagos portadores del gen de la Stx 2 se realizaron cultivos de enriquecimientos de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888). Estos cultivos se infectaron con los bacteriófagos purificados de volúmenes de 100, 10, 1 y 0,1 ml del agua de río (*).

De los sobrenadantes de los cultivos de enriquecimiento se purificaron los bacteriófagos, se extrajo su ADN y se amplificó para el gen de la Stx 2 por PCR anidada.

El proceso siguió idéntica metodología a la descrita en los capítulos 1 y 2 de esta memoria.

(*)NOTA: Los cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados a partir de 100 ml de agua de río, se realizaron con medio Scholten's modificado 2X, a fin de contrarrestar la dilución del medio de cultivo producida por el volumen de muestra utilizado.

3.2.1.1.2.- Experimentos de inactivación natural "*in situ*"

Para realizar estos experimentos se utilizó un montaje que reproduce como actuarían los procesos de inactivación en el agua de un río sobre el conjunto de microorganismos que conforman la contaminación de un agua residual que fuera vertida a ese río.

3.2.1.1.2.1.- Muestras utilizadas

En todos los experimentos se mezcló agua de río de la zona donde se realizó el experimento con agua residual conteniendo una suspensión de células de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, preparada como se indica a continuación.

1.- Se realizó un cultivo de *E. coli* O157:H7(ATCC 43888) en medio Scholten's modificado (Anexo 1) y se incubó a 37 °C durante toda la noche. A partir de este cultivo, se realizó un recuento de células viables mediante diluciones decimales seriadas del cultivo en peptona salina (Anexo 1). Se realizó un recuento del número de células viables mediante una extensión de 0,1 ml de cada dilución decimal del cultivo en agar selectivo de coliformes fecales, (FC-agar, Anexo 1). Se incubaron las placas a 37 °C durante 18 horas (*). Se contaron las colonias y se calculó el número de células viables por ml de medio de crecimiento.

(*) NOTA: Puesto que en este caso se pretendía contar *E. coli* O157:H7 y ésta no crece bien a temperaturas de 44 °C (Martins y col. 1992), las placas de FC-AGAR se incubaron a 37 °C en lugar de a 44 °C (como se describe para el recuento de coliformes fecales en este medio de cultivo, "Standard Methods", American Public Health Association, 1992).

2.- En 100 ml de una muestra de agua residual proveniente de la planta 1 (descrita en el apartado 1.2.2. de Materiales y Métodos del capítulo 1 de esta memoria) se inoculó 0,1 ml de un cultivo de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 correspondiente a 10^9 ufc/ml (proveniente del cultivo incubado a 37 °C durante toda la noche). Se realizó el cálculo del inóculo añadido para que el número de coliformes fecales en el agua residual fuera de 10^8 ufc/100 ml. Este valor debía ser superior al conjunto de coliformes fecales presentes por la contaminación de la muestra de agua residual (Tabla 3.1).

Esta metodología fue sensiblemente distinta en el primer experimento (A), donde se filtró previamente la muestra de agua residual antes de inocularla con *E. coli* O157:H7 y antes de realizar la dilución con agua del río. La filtración se realizó con membranas de 0,22 μ m de baja afinidad para proteínas (Millex™-GV Millipore).

3.- Se diluyó la muestra de agua residual inoculada con O157:H7 mediante dilución 1/50 con agua procedente de un río (Llobregat) de la zona donde se realizó la experiencia de inactivación "*in situ*". Los niveles de contaminación del río en esta zona son entre 100 y 1000 veces menores que los del agua residual (Tabla 3.1).

4.- Estas mezclas se introdujeron dentro de tubos de diálisis, preparados previamente como se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales. En total se prepararon 10 tubos de diálisis con aproximadamente 100 ml de la mezcla en cada uno.

5.- Estos tubos de diálisis se introdujeron dentro de una jaula, a fin de proteger los tubos. Este recipiente se sumergió dentro de una cubeta de análisis fisicoquímicos situada en la planta potabilizadora de Abrera (*)y que puede considerarse que mimetiza las condiciones del río. (Foto).

(*) NOTA: Queremos agradecer al consorcio de Aguas Ter-Llobregat (ATLL) que nos permitieran utilizar sus instalaciones para realizar estos experimentos.

La cubeta presenta unas proporciones de 5 metros de largo por 1 metro de ancho por 1,5 metros de altura y mantiene un flujo continuo de agua del río Llobregat antes de su entrada en la planta. La jaula con los tubos de diálisis se colocó a 20-25 cm de profundidad. La parte superior de la cubeta no está cubierta por lo que las muestras recibieron insolación (Figura 3.1).

6.- Se tomaron muestras del agua del río y de la dilución realizada 1/50 para su análisis posterior en el laboratorio. Se realizaron análisis del agua residual inicial y del agua residual inoculada con *E. coli* O157:H7 antes de diluirla con el agua del río (Tabla 3.1). Se analizaron coliformes fecales, colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7, tal como se indica posteriormente en el apartado 3.2.1.1.2.3.

Tabla 3.1.- Valores de colifagos somáticos y fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (ufp/100 ml) y de coliformes fecales (ufc/100 ml), al inicio del experimento de inactivación “*in situ*”.

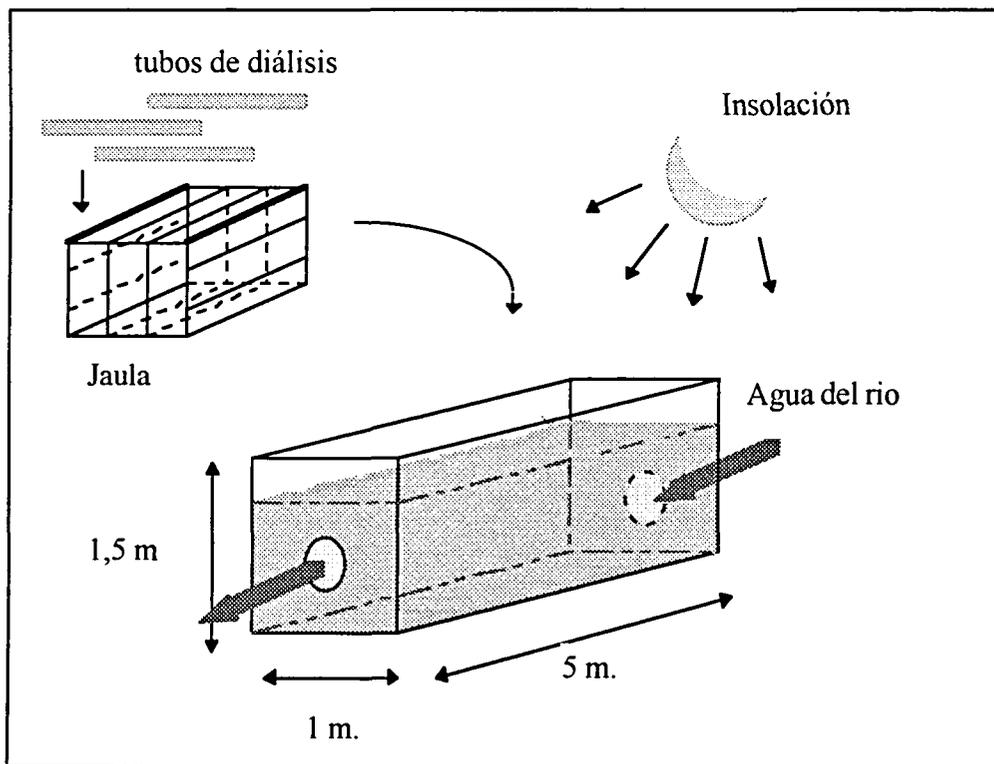
		Colifagos somáticos	Fagos O157:H7	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> O157:H7 ^(a)
Exp. A	Agua residual	1,4.10 ⁶	6,9. 10 ⁴	ND ^(b)	-
	A. residual+O157:H7	1,6.10 ⁶	6,9. 10 ⁴	-	1,7.10 ⁸
	Agua de río	1,1.10 ⁴	8,5. 10 ³	ND	-
	t = 0 h	3,5.10 ⁴	2,3.10 ³	-	ND
Exp. B	Agua residual	1,5.10 ⁶	8,9.10 ⁴	1,2.10 ⁷	-
	A. residual+O157:H7	1,5.10 ⁶	8,9.10 ⁴	-	2,3.10 ⁸
	Agua de río	1,5.10 ⁴	1,2.10 ³	3,8.10 ⁴	-
	t = 0 h	3,2.10 ⁴	2,8.10 ³	-	4,2.10 ⁶
Exp. C	Agua residual	6,0.10 ⁶	8,8.10 ⁴	2,1.10 ⁷	-
	A. residual+O157:H7	6,0.10 ⁶	8,8.10 ⁴	-	1,3.10 ⁸
	Agua de río	1,6.10 ⁴	2,2.10 ³	6,7.10 ⁴	-
	t = 0 h	3,5.10 ⁴	2,6.10 ³	-	5,6.10 ⁶

(a) Valores correspondientes a *E. coli* O157:H7 en agua residual inoculada con esta cepa y en los tiempos iniciales de análisis de los tres experimentos, analizados en ambos casos con medio FC-agar a 37 °C.

(b) Datos no disponibles.

7.- Se extrajeron los tubos con las muestras siguiendo intervalos de tiempo variables según el experimento, en general cada 1 o dos días. En cada toma de muestras, se realizaron mediciones para estudiar como variaban los diferentes parámetros microbiológicos para estudiar su inactivación por efecto de la depuración natural (Tabla 3.2).

Figura 3.1- Esquema del montaje utilizado para la realización de estos experimentos



Fotografía 3.1.- Fotografía de la cubeta donde se realizaron los experimentos de experimento de inactivación natural "*in situ*"



3.2.1.1.2.2.- Experimentos realizados

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes siguiendo idéntica metodología, por cuestiones de organización los tiempos de muestreo variaron ligeramente entre los experimentos. También variaron las condiciones fisicoquímicas del agua en los tres experimentos realizados, coincidiendo con el cambio estacional y climatológico (Tabla 3.2).

Tabla 3.2.- Parámetros fisicoquímicos del agua del río utilizada en los tres experimentos realizados. Horas de insolación y tiempos de muestreo que se realizaron en cada caso.

	Experimento A	Experimento B	Experimento C
Fecha de inicio	28/7/97	14/10/97	27/10/97
Turbidez	-	17,05 NTU	14,6 NTU
pH	-	7,83	7,75
Temperatura	25 °C	16,5 °C	14,1 °C
Insolación/día	10,8 horas	5,6 horas	5,0 horas
Tiempos de muestreo ^(a)	0, 24, 72 y 168 horas.	0, 24, 72, 144 y 192 horas.	0, 72, 168 y 240 horas.

(a) La degradación de los tubos de diálisis sumergidos en el agua del río impidieron alargar los experimentos durante más tiempo, como se pretendía en un inicio.

3.2.1.1.2.3.- Parámetros microbiológicos estudiados

Bacterias

Se analizaron coliformes fecales con medio FC-agar (Anexo 1), realizando diluciones decimales seriadas de la muestra en peptona salina (Anexo 1) y filtración por membranas de 0,44 µm según se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas (*).

El medio FC-agar se utilizó para evaluar la cantidad de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) presente en las muestras inoculadas con esta cepa. El número de colonias detectadas en medio FC-agar debía corresponder a *E. coli* O157:H7 dado que previamente se había realizado un inóculo que superaba el número de *E. coli* presente en el agua residual.

(*)NOTA: De nuevo puesto que en este caso se pretendía contar *E. coli* O157:H7 y ésta no crece bien a temperaturas de 44 °C (Martins y col. 1992), las placas de FC-AGAR se incubaron a 37 °C en lugar de a 44 °C.

Bacteriófagos

Se enumeraron (ufp/ml) colifagos somáticos (utilizando CN13 como cepa huésped) y fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 por el método de la doble capa de agar con medio Scholten's modificado (Anexo 1). El protocolo de enumeración de bacteriófagos se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

La enumeración de los colifagos somáticos se realizó a las cinco horas de incubación por los motivos que se indican a continuación.

Fagos portadores del gen de la Stx 2

A aquellos tiempos en que el número de colifagos somáticos descendía como mínimo 1 logaritmo respecto al tiempo anterior, se estudió la presencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7 ATCC 43888 del modo descrito anteriormente. Puesto que estos estudios se realizaron el mismo día de la recogida de la muestra, fue necesario realizar el contaje de calvas de colifagos somáticos a las cinco horas (en lugar de a las 18 horas como describe el protocolo indicado en el apartado de Materiales y Métodos Generales) a fin de tener una indicación del descenso del número de bacteriófagos.

Brevemente, para el estudio de fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7, se purificaron fagos a partir de volúmenes de 10, 1, 0.1 y 0,01 ml del agua tratada y se utilizaron para realizar enriquecimientos con *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. De los sobrenadantes obtenidos, se purificaron los fagos, se extrajo el ADN y se realizaron amplificaciones por PCR anidada tal como se indica en los capítulos 1 y 2.

Este estudio se realizó a los tiempos 0, 72 y 168 horas en el Experimento A. En el experimento B se analizaron los fagos portadores del gen de la Stx 2 en los tiempos 0, 144 h y 192 horas. Por último, en el experimento C, se realizó el estudio en los tiempos correspondientes a 0 y 168 horas.

Inactivación de los diferentes tipos morfológicos de colifagos somáticos

Se aprovecharon estos mismos experimentos para observar la inactivación de diferentes tipos morfológicos de colifagos somáticos.

De los recuentos de bacteriófagos obtenidos, en aquellos tiempos en que el número de fagos descendía 1 logaritmo respecto al número de fagos inicial, se realizaron aislamientos de bacteriófagos enumerándolos por el método de la doble capa de agar con *E. coli* CN13, para su observación en microscopía electrónica. El protocolo se describe posteriormente en el apartado 3.2.2.

En los experimentos de inactivación se enumeraron los colifagos somáticos de dos formas distintas. Por un lado utilizando el medio Scholten's modificado para el recuento de bacteriófagos, como ya se ha indicado al principio de este apartado. Además, los bacteriófagos se enumeraron de nuevo, utilizando en esta ocasión el medio de triptona, a fin de observarlos mediante microscopía electrónica. Se utilizó en esta segunda ocasión el medio de triptona porque ciertos experimentos de estudios de inactivación de los morfotipos (que se describen posteriormente en este capítulo), se habían realizado en medio de triptona y se pretendió continuar con la misma metodología, dado que existen razones para creer que la variación del medio podría de algún modo alterar los resultados, (ver apartado de Resultados).

3.2.1.2.- Experimentos de inactivación por tratamiento con cloro

Como se ha indicado en la introducción de este capítulo, la cloración es un tratamiento habitual en los procesos de potabilización de aguas destinadas al consumo humano y también en el tratamiento de efluentes secundarios. Por ello se estudió la persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 frente al tratamiento con cloro, como un ejemplo de inactivación por desinfección.

3.2.1.2.1.- Experimentos de inactivación de O157:H7 y de los bacteriófagos que la infectan por tratamiento con cloro

En un primer grupo de experimentos se estudió la persistencia de los bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 comparándola con la persistencia que presentó la propia *E. coli* O157:H7 al tratamiento de inactivación por cloro.

Todos los experimentos presentados en esta sección se realizaron mediante la adición de un volumen de lejía comercial equivalente a 10 ppm de cloro durante 20 minutos de contacto y posterior neutralización con tiosulfato, sobre agua residual bruta.

3.2.1.2.1.1.- Experimentos realizados

Se repitieron tres experimentos siguiendo idéntica metodología. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1.- En 100 ml de agua residual de la planta 1 (descrita en el apartado 1.2.2. del capítulo 1) se inoculó 1 ml de un cultivo de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 conteniendo 10^9 ufc/ml. La concentración final de O157:H7 en el agua inoculada correspondió a 10^7

ufc/ml. Estos valores de *E. coli* son muy superiores a los valores de *E. coli* que normalmente presenta este tipo de agua residual (Tabla 3.3).

2.- Se realizó un análisis previo del agua residual inoculada, antes del tratamiento con cloro (Tabla 3.3). Se analizaron coliformes fecales, *E. coli*, colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7, tal como se indica posteriormente en el apartado 3.2.1.2.1.2.

Tabla 3.3.- Valores de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* (ufc/ml) y de colifagos somáticos y bacteriófagos infecciosos para O157:H7 (ufp/ml) en el agua residual utilizada en los experimentos de inactivación por cloro.

	<i>E. coli</i> (O157:H7) ^(a)	<i>E. coli</i>	Colifagos somáticos	Bacteriófagos O157:H7
Experimento 1	4,2.10 ⁷	7,3.10 ⁴	1,9.10 ⁴	7,4.10 ¹
Experimento 2	1,0.10 ⁷	4,0.10 ⁴	2,5.10 ⁴	1,3.10 ²
Experimento 3	3,7.10 ⁷	4,6.10 ⁴	2,4.10 ⁴	1,5.10 ²

^(a) Analizados con medio FC-agar a 37 °C.

3.- A este volumen de 100 ml del agua residual inoculada se le añadió 18,5 µl de lejía comercial (recién abierto el envase), por 100 ml de agua residual.(*).

(*) NOTA: En la lejía comercial se especifica la presencia de 54 g de cloro por litro de lejía la primera vez que se abre el recipiente. Por tanto, una vez realizados los cálculos, se añadió el volumen equivalente a 10 ppm de cloro.

- 4.- La muestra se mantuvo en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente (*)
- 5.- Pasado este tiempo se inactivó la acción del cloro mediante la adición de tiosulfato sódico (3 g de tiosulfato /100 ml de agua tratada).
- 6.- Se analizaron los mismos parámetros estudiados a tiempo 0, comparándose ambos resultados.

3.2.1.2.1.2- Parámetros microbiológicos estudiados

Bacterias

Se analizó *E. coli* O157:H7 con medio FC-agar (Anexo 1) incubándose a 37 °C (por las razones que se indican anteriormente). Asimismo se analizó *Escherichia coli* con medio Fluorocult® (Anexo 1).

Escherichia coli O157:H7 no se detecta mediante el medio Fluorocult dado que es MUG (Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide) negativa (Martins y col. 1992), y el medio Fluorocult tiene incorporado el MUG en su fórmula como elemento diferenciador de *E. coli* (Clark y col., 1991). Por tanto, este medio se utilizó para analizar otros serotipos de *E. coli* diferentes a O157:H7 presentes en el agua residual.

Para estudiar ambos parámetros, se realizaron diluciones decimales seriadas de la muestra en peptona salina y filtración según se describe en el apartado de Material y Métodos Generales.

(*) NOTA: El tiempo de tratamiento con cloro utilizado en estos experimentos fue de 20 minutos a fin de evitar que algunos de los parámetros estudiados (especialmente las bacterias) se inactivaran hasta el punto de no poder detectarlos después del tratamiento, lo cual hubiera dificultado el análisis de los resultados.

En experimentos posteriores descritos en este mismo capítulo (apartado 3.2.2.7.3.), se utilizan tiempos de tratamiento con cloro superiores (30 minutos), dado que los parámetros analizados son diferentes a los que se estudiaron en este caso

Bacteriófagos

Se enumeraron (ufp/ml) colifagos somáticos (utilizando CN13 como cepa huésped) y fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, por el método de la doble capa de agar con medio Scholten's modificado (Anexo 1). El protocolo de enumeración de bacteriófagos se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Inactivación de los diferentes tipos morfológicos de bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7

Se aprovecharon estos mismos experimentos para observar la inactivación de diferentes tipos morfológicos de fagos infecciosos para O157:H7. La metodología empleada se indica con más detalle en el apartado 3.2.2.7.3.

Se utilizó medio de triptona para realizar los aislamientos de los fagos que se pretendían observar por microscopía electrónica, por lo que los fagos infecciosos para O157:H7 se enumeraron doblemente, de igual modo en que se indicó el apartado 3.2.1.1.2.3. de este capítulo.

3.2.1.2.2.- Experimentos de inactivación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 por tratamiento con cloro.

Una vez observado el efecto del tratamiento con cloro sobre *E. coli* O157:H7 y los fagos que la infectan (ver apartado de Resultados), el siguiente paso fue la observación de si los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7, seguían un comportamiento similar al del conjunto de bacteriófagos infecciosos para O157:H7.

Con este fin, se estudiaron muestras de agua residual provenientes de la planta 1, tratándolas con cloro tal como se ha descrito en el apartado anterior. Se estudió la presencia del gen de la Stx 2 en bacteriófagos presentes en muestras de agua residual antes y después de realizar el tratamiento con cloro. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1.- Se realizó un análisis previo del agua residual, antes del tratamiento con cloro (Tabla 3.4). Se analizaron coliformes fecales, *E. coli*, colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7, tal como se indica posteriormente en el apartado 3.2.1.2.2.1.

2.- Se añadió el cloro del mismo modo que se ha explicado anteriormente y después de 20 minutos se inactivó con tiosulfato.

Tabla 3.4.- Valores de coliformes fecales y *E. coli* (ufc/ml) y de colifagos somáticos y bacteriófagos infecciosos para O157:H7 (ufp/ml) en el agua residual utilizada en el experimento de inactivación por cloro.

	Coliformes fecales	<i>E. coli</i>	Colifagos somáticos	Bacteriófagos O157:H7
Experimento 1	2,2.10 ⁵	8,0.10 ⁴	3,0.10 ⁴	1,2.10 ²
Experimento 2	1,3.10 ⁵	3,8.10 ⁴	3,3.10 ⁴	1,9.10 ²
Experimento 3	8,1.10 ⁴	2,4.10 ⁴	1,9.10 ⁴	1,5.10 ²

3.2.1.2.2.1.- Parámetros microbiológicos estudiados

Bacterias

Se analizaron coliformes fecales, con medio FC-agar y *E. coli*, con medio Fluorocult. En este experimento, puesto que no se realizó inóculo con *E. coli*

O157:H7, la utilización de ambos medios era meramente informativa de los valores de ambos parámetros en las muestras de agua analizada.

Bacteriófagos

Se enumeraron (ufp/ml) colifagos somáticos (utilizando CN13 como cepa huésped) y fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 ATCC 43888, por el método de la doble capa de agar con medio Scholten's modificado (Anexo 1). El protocolo de enumeración de bacteriófagos se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Fagos portadores del gen de la Stx 2

Para estudiar la presencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2, antes y después de realizar el tratamiento con cloro del agua residual se purificaron los bacteriófagos presentes en la muestra mediante filtración y tratamiento con ADNasa.

Los fagos purificados a partir de volúmenes de 10, 1 y 0.1 ml de muestra se utilizaron para infectar cultivos de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. De los sobrenadantes obtenidos de estos enriquecimientos, se purificaron los fagos por filtración y tratamiento con ADNasa, se extrajo el ADN y se realizaron amplificaciones por PCR anidada.

Se siguió idéntica metodología a la descrita en los capítulos 1 y 2.

3.2.1.3.- Experimentos de inactivación por un tratamiento de Pasteurización

Se incluyó este tratamiento en los estudios de inactivación ya que la pasteurización es un tratamiento comúnmente utilizado para la eliminación de patógenos en alimentos, y ya que los alimentos son uno de los principales vehículos de transmisión de *E. coli* O157:H7.

Se estudió la persistencia del conjunto de bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) comparándola con la persistencia que presentó esta cepa de *E. coli* O157:H7 al tratamiento de pasteurización. Asimismo se estudió la persistencia de los fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 portadores del gen de la Stx 2.

3.2.1.3.1.- Experimentos realizados

Se realizaron tres experimentos siguiendo idéntica metodología. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1.- En 100 ml de agua residual se inoculó 0,1 ml de un cultivo de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 conteniendo 10^9 ufc/ml. La concentración final de O157:H7 en el agua inoculada correspondió a 10^6 ufc/ml. Estos valores de *E. coli* son muy superiores a los valores de *E. coli* que normalmente presenta este tipo de agua residual (Tabla 3.5).

2.- Se realizó un análisis previo del agua residual, antes del tratamiento con cloro (Tabla 3.5). Se analizó *E. coli* O157:H7 con FC-agar, *E. coli*, colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7, tal como se indica posteriormente en el apartado 3.2.1.3.2.

Tabla 3.5.- Valores de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* (ufc/ml) y de colifagos somáticos y bacteriófagos infecciosos para O157:H7 (ufp/ml) en el agua residual utilizada en el experimento de pasteurización.

	<i>E. coli</i> O157:H7 ^(a)	<i>E. coli</i>	Colifagos somáticos	Bacteriófagos O157:H7
Agua residual	1,2.10 ⁶	2,4.10 ⁴	2,5.10 ⁴	6,3.10 ²

(a) Analizados con medio FC-agar a 37 °C.

3.- Se sometió la muestra a un tratamiento por calor a 60 °C durante 45 minutos, agitando la muestra manualmente cada 5 minutos.

4.- Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se analizaron los parámetros que se indican a continuación.

3.2.1.3.2.- Parámetros microbiológicos estudiados

Bacterias

Se analizó *E. coli* O157:H7 mediante el medio FC-agar a 37 °C y otras cepas de *E. coli* presentes en el agua residual mediante el medio Fluorocult del mismo modo que se indicó en experimentos anteriores

Bacteriófagos

Se enumeraron (ufp/ml) colifagos somáticos (utilizando CN13 como cepa huésped) y fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 por el método de la doble capa de agar con medio Scholten's modificado (Anexo 1). El protocolo de enumeración de bacteriófagos se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

Fagos portadores del gen de la Stx 2

Antes y después de realizar la pasteurización del agua residual, se tomó la muestra para purificar parcialmente los fagos de la misma, del modo descrito en el capítulo 1, a fin de estudiar la presencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2.

Los fagos purificados a partir de volúmenes de 10, 1 y 0.1 ml de muestra, se utilizaron para infectar cultivos de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888. De los sobrenadantes obtenidos en estos enriquecimientos, se purificaron los fagos y se analizó la presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 siguiendo el mismo protocolo que se indicó anteriormente.

3.2.1.4.- Análisis estadístico

Se determinó la significación estadística de las diferencias observadas entre las reducciones decimales calculadas a partir de las inactivaciones de las bacterias y los bacteriófagos, así como entre los colifagos somáticos y los fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7, en cada uno de los diferentes tratamientos estudiados. Para ello se aplicó un test de contingencia. En este caso se aplicó el test de la T-student (T-student Test, Statistic Program S.A.S. Institute Inc, 1990. "S.A.S. User's Guide: Statistics". Edition 6.04. Gary North Carolina. USA).

3.2.2.- Estudios de los tipos morfológicos de colifagos presentes en diferentes muestras de agua

A fin de obtener información sobre la inactivación de los diferentes tipos morfológicos de bacteriófagos, se realizaron observaciones por microscopía electrónica de los tipos morfológicos presentes en muestras de aguas residuales y de aguas sometidas a diversos procesos de inactivación, ya fuera natural o artificial (por tratamiento).

3.2.2.1.- Caracterización de las muestras

Todas las muestras utilizadas en este estudio se caracterizaron por enumeración de colifagos somáticos con *E. coli* CN13 y algunas de ellas para fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888). Se realizó por el método de la doble capa de agar según se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales.

El medio de cultivo utilizado fue el medio de triptona por las razones que se detallan posteriormente en el apartado 3.2.2.6.1.

3.2.2.2.- Aislamiento de los bacteriófagos

Para estudiar la distribución de las diferentes morfologías de bacteriófagos presentes en las muestras, se tomaron alícuotas de las muestras y/o diluciones seriadas de éstas y se enumeraron por el método de la doble capa de agar (tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos Generales).

A fin de evitar una selección de los bacteriófagos, se escogieron para el estudio las placas donde se encontró una distribución regular de las calvas de lisis, con un número que oscilara entre 1 y 20 calvas. De estas placas se recogieron todas las calvas de lisis mediante el asa de siembra y se realizó un enriquecimiento de los bacteriófagos. No se escogieron los fagos según morfología de calva, ya que ello podría haber dado información falsa, pues en ocasiones, diferentes bacteriófagos producen calvas aparentemente iguales.

3.2.2.3.- Enriquecimiento de los bacteriófagos

Se enriquecieron los bacteriófagos aislados a partir de las calvas de lisis, a fin de aumentar el número de partículas hasta un título de 10^9 ufp/ml para poderlos observar al microscopio electrónico. A continuación se prepararon las rejillas de microscopía y se observó en el microscopio electrónico. Los protocolos de enriquecimientos y preparación de las rejillas se describen en el apartado de Material y Métodos Generales.

3.2.2.4.- Observación al microscopio electrónico de transmisión

Los bacteriófagos se observaron mediante un microscopio electrónico de transmisión Phillips E.M. 301. La observación de los fagos se realizó a 34.000 aumentos para hacer un reconocimiento general y se aumentó hasta a 91.000 o 110.000 aumentos para hacer observaciones más detalladas o visualizar mejor los fagos de menor tamaño. El voltaje utilizado fue de 80 KV. Las fotografías se hicieron en placas fotográficas.

3.2.2.5.- Cálculo de los porcentajes obtenidos para cada tipo morfológico

Se calculó el porcentaje de cada tipo morfológico presente en las muestras estudiadas mediante la relación del número de fagos correspondiente a cada tipo morfológico en relación al número total de fagos observados al microscopio electrónico para cada muestra.

3.2.2.6.- Estudio de los efectos producidos por diversos factores metodológicos

Existía una alta probabilidad de que ciertas variaciones en la metodología de aislamiento pudieran influir en los resultados obtenidos en cuanto a los tipos morfológicos detectados en un ensayo determinado. Estas diferencias en los porcentajes de los diferentes tipos morfológicos observados, podrían ser debidas, por ejemplo, a diferente expresión de receptores en la cepa huésped dependiendo del medio de cultivo utilizado para su crecimiento, a la influencia de la concentración de sales presentes en el medio de cultivo o incluso, en caso de filtración previa de la

muestra, a la filtración diferencial de los diferentes tipos morfológicos de bacteriófagos. A fin de evaluar esta influencia, se estudiaron separadamente diversos factores metodológicos.

3.2.2.6.1.- Efecto del medio de cultivo utilizado

Se estudiaron en paralelo aislamientos realizados con medio de triptona y con medio Scholten's modificado.

Dado que, como se muestra en la sección de resultados, sí existían diferencias en los estudios realizados en paralelo con ambos medios de cultivo, en los estudios posteriores se utilizó el medio de triptona para realizar las enumeraciones de los fagos presentes en las muestras y el posterior enriquecimiento de las calvas de lisis.

3.2.2.6.2.- Efecto de la filtración de la muestra

Se filtraron muestras de agua residual con membranas de 0,22 μm de baja afinidad para proteínas (Millex™-GV Millipore) antes de utilizarlas para realizar la enumeración de bacteriófagos. Luego se obtuvieron calvas aisladas por el método de la doble capa de agar. A partir de las placas obtenidas, se realizaron los aislamientos de bacteriófagos como se ha indicado anteriormente y se observaron las distintas morfologías de bacteriófagos presentes. En paralelo, se estudiaron de igual modo las morfologías de los bacteriófagos aislados a partir de las mismas muestras de agua residual sin filtrar.

3.2.2.6.3.- Efecto de la cepa huésped utilizada

A fin de comparar las morfologías de los bacteriófagos presentes en agua residual infecciosos para las cepas *E. coli* CN13 y *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888), se realizaron la enumeración y el aislamiento de los bacteriófagos como se ha indicado anteriormente, utilizando en paralelo ambas cepas huésped.

Puesto que *E. coli* CN13 es susceptible de ser infectada por un mayor número de colifagos somáticos (Pedroso y Martins, 1995), se utilizó mayoritariamente para realizar estos estudios, ya que queríamos disponer de números suficientes de fagos después de los procesos de inactivación.

3.2.2.7.- Estudios de inactivación de los diferentes tipos morfológicos de bacteriófagos

Se utilizaron muestras de aguas con diferentes grados de contaminación o sometidas a diferentes procesos de depuración.

Este estudio se inició con la observación de los morfotipos presentes en muestras de agua con contaminación reciente. Posteriormente se estudiaron muestras que presentaban contaminación remota por efecto de la inactivación natural y finalmente se estudiaron muestras que presentaban una reducción de la contaminación por efecto de un tratamiento de desinfección con cloro.

3.2.2.7.1.- Estudios de muestras de agua residual y de efluente de depuradora

Se realizaron inicialmente observaciones de los tipos morfológicos de colifagos somáticos presentes en muestras de agua con elevada contaminación en las que no se podían prever fenómenos de inactivación. Para este estudio se escogieron las siguientes muestras.

- 1.- Muestras de agua residual obtenidas a la entrada de una depuradora de aguas de tratamiento fisicoquímico (Planta 1) que recibe agua de una zona urbana de 1.400.000 habitantes.
- 2.- Muestras de agua residual obtenidas a la entrada de una depuradora de aguas de tratamiento biológico (Planta 2) que recibe agua de una zona urbana de 400.000 habitantes.
- 3.- Muestras de agua residual obtenidas de un matadero de animales.
- 4.- Muestras de agua de efluente de depuradora de aguas de tratamiento biológico (Planta 2).

Se aislaron los colifagos somáticos como se ha indicado anteriormente y se compararon los porcentajes de los tipos morfológicos de bacteriófagos presentes en cada una de las muestras.

3.2.2.7.2.- Estudios en muestras de agua sometidas a procesos de inactivación natural

3.2.2.7.2.1.- Inactivación natural en un río

Se estudiaron muestras de agua de río proveniente del río Ter recogidas en tres puntos distintos. El punto 1, está situado en una zona del río que recibe influjo de agua con contaminación urbana. El punto 2 está localizado aproximadamente 4 kilómetros después del punto 1 siguiendo el curso del río. Después del punto 2, el agua del río es almacenada en dos pantanos, (Sau y Susqueda, de $2.3 \cdot 10^8$ y $1.7 \cdot 10^8$ metros cúbicos respectivamente), el tiempo de residencia en estas dos pantanos se estima entre 2 y 4 meses. El punto 3 está situado después de estos dos pantanos.

Se realizó un estudio comparativo de los tipos morfológicos de colifagos somáticos presentes en las aguas correspondientes a los tres puntos de muestreo para determinar la variación, en la distribución de los tipos morfológicos de bacteriófagos, producida a medida que los niveles de contaminación disminuían por efecto de la inactivación natural.

3.2.2.7.2.2.- Experimentos de inactivación natural “in situ”

Se estudió la inactivación de los tipos morfológicos de colifagos somáticos en muestras sometidas a un proceso de inactivación natural “in situ” mediante dilución de agua residual en agua del río Llobregat y posterior ubicación en el flujo de agua del río. La metodología aplicada se explica detalladamente en el apartado 3.2.1.1.2 de este capítulo.

Se realizaron observaciones de los tipos morfológicos de colifagos somáticos en dos de los tres experimentos realizados. Las observaciones corresponden al experimento A (ver Tabla 3.1), en el que, como se indicó anteriormente, se realizó filtración previa de la muestra y al experimento B (ver Tabla 3.1).

Sólo se realizaron las observaciones de morfologías a los tiempos en que se había producido un descenso de un logaritmo en el número de colifagos somáticos (como se indica en el apartado 3.2.1.1.2.3. de este capítulo). En el experimento A las observaciones se realizaron a las 0, 72 y 168 horas, y en el experimento B a los tiempos 0, 144 y 192 horas.

3.2.2.7.3.- Experimentos de inactivación por efecto del tratamiento con cloro

3.2.2.7.3.1.- Inactivación de las diferentes morfologías de colifagos somáticos por efecto del tratamiento con cloro

Se utilizaron para este estudio muestras de agua residual y muestras de agua provenientes del efluente de una depuradora biológica (Planta 2), antes y después de aplicar el tratamiento con cloro.

La metodología aplicada para el tratamiento con cloro de las muestras se explica detalladamente con anterioridad en este capítulo en el apartado 3.2.1.2.

No obstante en estos experimentos se incrementó el tiempo de tratamiento con cloro, utilizándose 30 minutos de tratamiento en lugar de los 20 minutos descritos en el apartado 3.2.1.2. Dado que es conocida la mayor persistencia de los bacteriófagos a los tratamientos con cloro (ver Introducción), no se temió en este caso provocar una excesiva inactivación de éstos (ver nota apartado 3.2.1.2.1.1), siendo interesante por el contrario, forzar una mayor inactivación de los colifagos somáticos.

Se determinaron los porcentajes de los distintos tipos morfológicos de colifagos somáticos de los dos tipos de muestras, antes y después de clorar.

3.2.2.7.3.2.- Inactivación de las diferentes morfologías de los bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 por efecto del tratamiento con cloro

Se estudió el efecto del tratamiento con cloro sobre la distribución de los tipos morfológicos de fagos aislados con *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888), presentes en muestras de agua residual. Para ello se aprovecharon los experimentos de inactivación de fagos infecciosos para O157:H7 descritos anteriormente en el apartado 3.2.1.2 .

Se observaron los porcentajes de los diferentes tipos morfológicos presentes en la muestra antes y después del tratamiento con cloro. Puesto que para realizar estos análisis se aplicó la misma metodología de los experimentos de tratamiento con cloro que se han descrito en el apartado 3.2.1.2., se quiere recordar que el tiempo utilizado para el tratamiento con cloro en estos experimentos fue de 20 minutos.

Como se ha indicado anteriormente el aislamiento y posterior enriquecimiento de los bacteriófagos infecciosos para O157:H7 que iban a ser observados por microscopía electrónica, se realizó con medio de triptona.

3.2.2.8.- Análisis estadístico

A fin de determinar la significación de las diferencias entre los porcentajes obtenidos para cada tipo morfológico, y las diferencias entre las diferentes muestras estudiadas, se aplicó un test de contingencia. En este caso se aplicó el test de Fisher (Fisher's Exact Test, Statistic Program S.A.S. Institute Inc, 1990. "S.A.S. User's Guide:Statistics". Edition 6.04. Gary North Carolina. USA).