

RESUMEN

El agua dulce es un recurso natural vital, que comprende todas las actividades humanas, sociales, económicas y ambientales y cuya cantidad en la tierra es limitada. Sin embargo, su uso se incrementa en función del crecimiento poblacional y el desarrollo económico, convirtiéndole en un recurso cuya escasez afecta a gran parte de la población mundial y cuya calidad se ve afectada por el aumento de vertidos incontrolados de aguas negras sin tratar, la escorrentía agrícola y las aguas residuales tratadas de manera inadecuada.

Debido a la creciente demanda de fuentes de agua utilizables, el aumento de la población mundial y la continua expansión de la industria, la reutilización de las aguas residuales urbanas se plantea como alternativa sostenible para tener en cuenta en la gestión de los recursos hídricos.

Cada vez son más los países que están reutilizando el agua residual para la agricultura de regadío, garantizando así su disponibilidad de manera continuada, evitando la presión sobre las fuentes de agua dulce en regiones con escasez de agua y la sobreexplotación de aguas subterráneas. Sin embargo, la reutilización de aguas residuales requiere medidas de protección de la Salud Pública, siendo necesario un correcto tratamiento de estas aguas con el fin de evitar la transmisión de enfermedades.

De entre todos los patógenos emergentes presentes en agua, las bacterias del género *Helicobacter* son de las más alarmantes, ya que se encuentran directamente relacionadas con el cáncer gástrico y hepatobiliar y su epidemiología aún no está clara. La especie más conocida de este género es *Helicobacter pylori*.

La infección por *H. pylori* puede conducir a trastornos gastrointestinales, entre los que destacan gastritis, úlcera péptica, úlcera duodenal, cánceres gástricos y linfoma asociado con tejido linfático de la mucosa (MALT). Esta especie está clasificada como agente biológico carcinógeno para el ser humano de categoría 1.

Se ha planteado que *H. pylori* puede ser adquirida por diferentes vías de transmisión, entre las que se destaca el agua. Se ha demostrado su capacidad de supervivencia frente a los tratamientos comunes de desinfección de aguas. Además, *H. pylori* tiene la capacidad de formar biopelículas insolubles, lo que favorece su resistencia frente a los diferentes tratamientos de desinfección y potabilización. La formación de biopelículas o su paso a un estado viable no cultivable se han sugerido como forma de supervivencia a largo plazo de *H. pylori* en el medio ambiente.

Por todo ello, en esta tesis se ha investigado la presencia de células viables, y por tanto potencialmente infectivas, de *H. pylori* en aguas potables y de riego, mediante la mejora y la optimización de técnicas de cultivo y moleculares.

Este trabajo se inició con la búsqueda de un medio de cultivo óptimo para la detección, identificación y aislamiento de *H. pylori* en muestras ambientales y clínicas. Se obtuvieron resultados muy positivos con el medio de cultivo Agar Dent con sulfato de polimixina B, independientemente del origen de la muestra.

Seguidamente, se desarrolló un método de pre-tratamiento con Propidium Monoazide y PEMAX™ para la detección y cuantificación exclusiva de células viables de *H. pylori* por PCR. Se confirmó que el PMA a una concentración de 50 μ M y un periodo de incubación de 5 minutos sería la metodología óptima de tratamiento antes del análisis mediante qPCR.

A continuación, se analizaron un total de 20 muestras de agua residual, recogidas asépticamente en la salida del reactor biológico y después del tratamiento de desinfección. Se analizaron para la detección y cuantificación de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. patógenos, mediante las técnicas moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR Cuantitativa (qPCR), Hibridación *In Situ* con Sondas Fluorescentes (FISH), FISH Combinado con Direct Viable Count (DVC-FISH), Secuenciación Masiva Dirigida (DAS) y la técnica tradicional de cultivo en placa.

Mediante la técnica de cultivo, a pesar de la microbiota acompañante, fue posible la detección de 4 colonias sospechosas de *Helicobacter* spp. y *H. pylori*, cuya identificación fue confirmada mediante amplificación y posterior secuenciación.

La técnica DVC-FISH demostró la presencia de células viables de *Helicobacter* spp. en 15 (75%) de las muestras, sin necesidad de un paso previo de enriquecimiento. Respecto a la detección de células de *H. pylori*, mediante DVC-FISH y FISH, estos microorganismos se observaron en 10 (50%) y 11 (55%) de las 20 muestras analizadas, respectivamente. La técnica qPCR determinó la presencia de *H. pylori* en las muestras, con un porcentaje de detección del 60%.

Finalmente, mediante metagenómica de secuenciación dirigida, se analizó el microbioma de 16 muestras de aguas residuales. Para ello, se evaluaron *in silico* e *in vitro* los iniciadores HSF/HS2R y, una vez comprobada su idoneidad, se emplearon para la secuenciación de las muestras. La clase bacteriana más abundante en todas las muestras fue la Epsilonproteobacteria, como era esperable. Los filos dominantes de las muestras analizadas fueron Proteobacteria, seguido de Bacteroidetes y Firmicutes. *H. pylori* se detectó mediante esta técnica en 6 muestras de aguas residuales. Además, se detectaron otras especies de *Helicobacter* spp., como *H. hepaticus*, *H. pullorum* y *H. suis*.

Igualmente se evaluó y desarrolló un método para la detección de marcadores de virulencia y resistencia frente al metronidazol y amoxicilina de *H. pylori* en muestras ambientales. Mediante la técnica de PCR se identificó el gen *cagA* en 5 muestras de agua residual y una de agua potable. Respecto al genotipo *vacAs1*, se observó en 4 muestras de agua residual; el genotipo *vacAm1*, se identificó en una muestra de agua potable y 2 de agua de riego. En las biopelículas analizadas, 2 fueron positivas para el tipo *vacAm1*, y otros dos para el gen de resistencia *pbp1A*.

Del mismo modo se analizaron 45 muestras de heces, tanto de forma directa como tras un enriquecimiento previo. No se observaron colonias sospechosas en Agar Dent selectivo a partir de la siembra directa de las muestras. Mediante la técnica qPCR se demostró la presencia de *H. pylori* en 41 muestras (45,56%). Fue posible cuantificar 10 muestras directas y 18 enriquecidas, con concentraciones entre $3,39 \cdot 10^3$ y $2,61 \cdot 10^3$ unidades genómicas/mL, las restantes presentaban niveles por encima del umbral de fiabilidad (>35 ciclos). Mediante DVC-FISH se observaron células viables de *H. pylori* en 26 (57,78%) de las 45 muestras directas.

La detección de mutaciones en el 23S rDNA, específicas de la resistencia a la claritromicina, indicó que el 37,79% de las muestras de heces presentaban células de *H. pylori* potencialmente resistentes.

Mediante secuenciación dirigida y posterior análisis bioinformático se identificó *H. pylori* en 13 muestras directas y 13 muestras enriquecidas, y otras especies como *H. hepaticus* y *H. pullorum*. Por último, se evaluó la capacidad de *H. pylori* para formar biopelículas y su resistencia frente a los tratamientos comunes de desinfección. Se observó que factores como la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y el oxígeno pueden influir sobre el crecimiento de *H. pylori*

formando parte de biopelículas. Del mismo modo las biopelículas de *H. pylori* resultaron resistentes al tratamiento con radiación UV e hipoclorito de sodio.

También se analizaron 27 biopelículas procedentes del sistema de distribución de agua potable para detectar la presencia de *H. pylori* mediante qPCR. El porcentaje de detección fue del 23%, siendo posible la cuantificación en 5 muestras, con concentraciones entre $7,32 \cdot 10^1$ y $1,16 \cdot 10^1$ unidades genómicas/mL.

Los resultados obtenidos en esta Tesis confirman la presencia de células viables de *H. pylori* y otros *Helicobacter* spp. en aguas residuales tras su tratamiento, lo que supone un riesgo potencial para la Salud Pública. De igual forma se evidencia su presencia en muestras de heces, proporcionando un punto de partida para el estudio del riesgo que puede suponer para el ser humano la transmisión fecal-oral de estas especies.

Este trabajo también demuestra la capacidad de *H. pylori* de formar biopelículas y su resistencia frente a tratamientos comunes de desinfección y confirma su presencia en sistemas de distribución de agua potable.