

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos
Máster Universitario de Ingeniería Ambiental



Estudio de amebas de vida libre (FLA) como reservorio de patógenos (*Helicobacter pylori* y *Legionella pneumophila*) en aguas tratadas: ¿un nuevo indicador de la efectividad del tratamiento de desinfección?

Trabajo Final de Máster

Presentado por:

Carlos Maupoey Sorolla

Dirigido por

Dra. Yolanda Moreno Trigos

Dra. Salud Botella Grau

Valencia, Septiembre de 2015

Agradecimientos

Tras haber finalizado este trabajo, y con ello dando por acabado el Máster de Ingeniería Ambiental, quiero dar las gracias a todos los profesores, familiares, amigos y artistas, que con paciencia y compañerismo me han ayudado a llegar hasta aquí aportándome fuerza e inspiración.

Especial agradecimiento a todas las personas que trabajan en el IIAMA por crear tan buen ambiente de trabajo, por permitirme poner en práctica todo lo aprendido durante mis estudios y por otorgarme nuevos conocimientos.

Resumen

El agua es un recurso indispensable para la vida y, ante los problemas de escasez, la depuración y reutilización de aguas residuales es una de las principales soluciones.

Los procesos de depuración de aguas residuales no son capaces de garantizar la total eliminación de ciertos microorganismos patógenos que suponen un grave riesgo para la salud humana, como *Helicobacter pylori* causantes de úlcera y cáncer gástrico, o *Legionella pneumophila* causante de neumonías severas. Los procesos habituales de tratamiento terciario para la desinfección son suficientes para eliminar estas bacterias, pero la presencia en las aguas de amebas de vida libre puede suponer un reservorio y una forma de protección para estos microorganismos por su resistencia a los tratamientos de desinfección habituales (cloración o radiación ultra violeta) a los que son sometidas las aguas tratadas.

En este Trabajo Fin de Máster se evaluó la presencia de amebas de vida libre como indicador de la efectividad del proceso de depuración, de los tratamientos terciarios de desinfección habituales en las EDAR, y de la cloración en las aguas potables para eliminar estos patógenos.

Para ello se han estudiado diferentes muestras de aguas residuales tratadas y aguas de abastecimiento, se ha investigado la presencia de amebas de vida libre y su relación con el tratamiento biológico. Para la identificación de *H. pylori* y *L. pneumophila* en el interior de las FLA, se utilizó el método rápido de identificación de bacterias viables patógenas de transmisión hídrica DVC-FISH.

Palabras clave: Bacterias patógenas, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, Amebas de Vida Libre, FLA, *Acanthamoeba castellanii*, FISH, DVC, aguas residuales y potables.

Abstract:

The water is an essential resource for life on planet Earth. And when it comes about shortage problems, re-use of treated water becomes one of the main solutions.

The conventional wasted water treatment process is not capable of guarantee the complete removal of certain pathogens which could be a serious risk for human health. Such as *Helicobacter pylori* that causes ulcer and gastric cancer, or *Legionella pneumophila* which causes severe pneumonia. The actual treatment for disinfection could remove bacterial load, but the presence in the water of Free Living Amoeba may be a reservoir and a protection way for this microorganisms due to the resistance to usual disinfection treatments, such as chloration and ultraviolet radiation.

In this thesis it was evaluated the presence of free Living Amoebas as depuration process effectiveness indicator, also for the chloration treatment.

In order to this, different wasted water and supply water samples were studied. The presence of Free Living Amoebas and their relation with the biological treatment was investigated. DVC-FISH method was used for the FLA's inner *H. pylori* and *L. pneumophila* identification.

Key words: Pathogens, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, Free Living Amoebas, FLA, *Acanthamoeba castellanii*, FISH, DVC, waste water, drinking water.

Resum:

L'aigua és un recurs indispensable per a la vida i, davant dels problemes d'escassetat, la depuració i reutilització d'aigües residuals és una de les principals solucions.

Els processos de depuració d'aigües residuals no són capaços de garantir la total eliminació de certs microorganismes patògens que suposen un greu risc per a la salut humana, com *Helicobacter pylori* causants d'úlcers i càncer gàstric, o *Legionella pneumophila* causant de pneumònies severes. Els processos habituals de tractament terciari per a la desinfecció són suficients per a eliminar estos bacteris, però la presència en les aigües d'amebes de vida lliure pot suposar un reservori i una forma de protecció per a estos microorganismes per la seua resistència als tractaments de desinfecció habituals (cloració o radiació ultra violeta) als que són sotmeses les aigües tractades.

En este Treball Fi de Màster es va avaluar la presència d'amebes de vida lliure com a indicador de l'efectivitat del procés de depuració, dels tractaments terciaris de desinfecció habituals en les EDAR, i de la cloració en les aigües potables per a eliminar estos patògens.

Per a això s'han estudiat diferents mostres d'aigües residuals tractades i aigües d'abastiment, s'ha investigat la presència d'amebes de vida lliure i la seua relació amb el tractament biològic. Per a la identificació de *H. pylori* i *L. pneumophila* en l'interior de les FLA, es va utilitzar el mètode ràpid d'identificació de bacteris viables patògenes de transmissió hídrica DVC-FISH.



Paraules clau:

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	p. 1
1.	El agua como recurso básico	p. 1
2.	Depuración de aguas residuales	p. 1
	2.1. Fases del tratamiento de aguas residuales	p. 2
	2.2. Estaciones de Tratamiento de Aguas Potables (ETAP)	p. 3
3.	El agua, depurada y tratada, como foco de infección	p. 3
4.	Eficacia de los tratamientos de desinfección y alternativas viables.....	p. 5
5.	Amebas de Vida Libre (FLA)	p. 6
	5.1. Protozoología de las FLA	p. 8
	5.2. Las amebas como reservorio de bacterias patógenas	p. 11
6.	Género <i>Helicobacter</i>	p. 11
	6.1. Transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> en agua	p. 12
	6.2. Estrategias de supervivencia de <i>H. pylori</i> en ambientes acuáticos.....	p. 14
7.	Género <i>Legionella</i>	p. 15
	7.1. Transmisión de <i>Legionella pneumophila</i>	p. 16
	7.2. Legislación y medidas de seguridad	p. 16
8.	Métodos de detección de <i>H. pylori</i> , <i>L. pneumophila</i> y FLA.....	p. 17
	8.1. Hibridación <i>in situ</i> por Fluorescencia (FISH).....	p. 17
	8.2. Técnica combinada DVC-FISH.....	p. 18
II.	OBJETIVOS	p. 20
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	p. 22
1.	Origen de las muestras	p. 23
2.	Procesado de las muestras.....	p. 24
3.	Identificación de amebas en las muestras procesadas.....	p. 25
4.	Detección e identificación de <i>H. pylori</i> y <i>L. pneumophila</i> viables con DVC-FISH	p. 25
	4.1. Incubación en DVC	p. 25
	4.2. Condiciones de fijación de la muestra	p. 25
	4.3. Condiciones de hibridación en la técnica FISH.....	p. 26
	4.4. Sondas empleadas en el proceso de hibridación.....	p. 27
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	p. 28
1.	Procesado de las muestras y aislamiento de FLA en medio NNAP.....	p. 29
2.	Identificación de las FLA.....	p. 32
3.	Identificación de patógenos procedentes de las FLA, después del tratamiento con hipoclorito sódico.....	p. 37
	3.1. Detección de <i>H. pylori</i> y <i>L. pneumophila</i> en FLA mediante DVC-FISH.....	p. 39
	3.2. Identificación de <i>H. pylori</i> por cultivo	p. 43
	3.3. Identificación de <i>L. pneumophila</i> por cultivo	p. 46
4.	Consideraciones finales.....	p. 47
V.	CONCLUSIONES	p. 49
VI.	BIBLIOGRAFÍA	p. 51
VII.	ANEJOS	p. 61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de detección de <i>H. pylori</i> en ambientes acuáticos	p. 13
Tabla 2. Origen de las muestras procesadas	p. 23
Tabla 3. Resultado del crecimiento de FLA en todas las muestras procesadas	p. 30
Tabla 4. Resultados del crecimiento de FLA en las muestras y porcentaje sobre el total	p. 31
Tabla 5. Recuento del crecimiento de FLA en las 12 muestras de EDAR procedentes de los 6 muestreos en los que se evaluó el tratamiento terciario de desinfección	p. 31
Tabla 6. Muestras en las que se han identificado especies de FLA.....	p. 34
Tabla 7. Muestras que han dado crecimiento de colonias de <i>H. pylori</i> y <i>L. pneumophila</i>	p. 38
Tabla 8. Resultados de las observaciones realizadas mediante FISH para la identificación de <i>H. pylori</i> y <i>L. pneumophila</i> en las muestras que presentaban presencia de FLA	p. 42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los quistes de <i>Acanthamoeba</i> según características morfológicas ..	p. 8
Figura 2. <i>Acanthamoeba</i> spp. A)trofozoíto; b)quiste redondeado y poligonal doble pared....	p. 9
Figura 3. <i>Balamuthia mandrillaris</i> a) trofozoíto; b) quiste.....	p. 10
Figura 4. <i>Naegleria fowleri</i> a) trofozoíto; b) forma ameboflagelada; c) quiste	p. 11
Figura 5. Trofozoítos de FLA observados en las muestras con microscopio de contraste de fases a 60x.....	p. 33
Figura 6. Trofozoítos de <i>Vermamoeba vermiformis</i> observados a 60x..	p. 34
Figura 7. Quistes de <i>Acanthamoeba</i> spp. observados a 60x.....	p. 35
Figura 8. Quistes de <i>Acanthamoeba</i> spp. observados a 60x.....	p. 35
Figura 9. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. observado a 60x.....	p. 36
Figura 10. Quistes y trofozoítos de <i>Balamuthia mandrillaris</i> a 60x	p. 36
Figura 11. Trofozoítos de FLA observados a 60x.....	p. 37
Figura 12. Hibridación específica de <i>H. pylori</i> con las sondas EUB en verde y HPY en rojo....	p. 39
Figura 13. Comparación entre un control de <i>H. pylori</i> y las bacterias observadas.....	p. 40
Figura 14. <i>H. pylori</i> en forma cocoide tras el análisis DVC-FISH.....	p. 43
Figura 15. <i>H. pylori</i> en forma bacilar	p. 44
Figura 16. Ejemplo de como la observación está dificultada por el exceso de bacterias	p. 45
Figura 17. Hibridación específica de <i>Legionella</i> sonda LEG705 verde y LEGPNE1 rojo	p. 46
Figura 18. <i>L. pneumophila</i> a partir de las colonias.....	p. 47

ABREVIATURAS

°C: Grados Centígrados

ASC: Agar Sangre de Caballo

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales

EPSAR: Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales (GV)

FISH: Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes

FLA: Ameba de vida libre (Free-living Amoeba)

g: Gramo

L: Litro

m³: Metros cúbicos

mg: Miligramo

mL: Mililitro

mW: MiliWatio

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

nm: Nanómetro

NNAP: Non Nutrient Agar Page

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PFA: Paraformaldehído

PMA: Propidium monoazide

PYG: Peptone-Yeast Extract-Glucose

rDNA: Ácido desoxirribonucleico ribosómico (Ribosomal Deoxyribonucleic Acid)

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)

rpm: Revoluciones por minuto

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico (Ribosomal Ribonucleic Acid)

UV: Ultravioleta

VBNC: Viable no cultivable (Viable But Nonculturable)

μL: Microlitro

μm: Micrómetro

I. INTRODUCCIÓN

1. El agua como recurso básico

El agua es un recurso indispensable para la vida en el planeta Tierra, pero el aumento en su consumo, el desgaste de los recursos subterráneos y la escasez de recursos hídricos en las zonas áridas y semiáridas son problemas que demandan un cambio en la concepción del agua, pasando a ser considerado como un recurso escaso, capaz de generar conflictos, actuales o futuros, entre países o regiones.

Las prácticas agrícolas, las actividades industriales, el aumento de la población humana y la mejora en la calidad de vida en la sociedad, hacen que se incrementen las necesidades de agua, recurriéndose por lo tanto a la utilización de aguas fósiles y a la sobreexplotación de acuíferos. Ello, unido al grave problema de la contaminación del agua, hace disminuir notablemente las cantidades disponibles de este elemento. Teniendo en cuenta esto, el buen uso de este escaso recurso debe de apoyarse en una mejora en la eficacia de su consumo, la introducción de nuevas tecnologías en las industrias que permitan reutilizar el agua empleada y la aplicación de políticas hidráulicas que lleven a una gestión más racional del agua.

La reutilización de las aguas residuales urbanas es una solución viable ya que supone una fuente extra de recursos hídricos. Por lo tanto es necesario realizar mejoras e investigaciones para un mejor control y vigilancia con el que garantizar que el uso de aguas residuales es una vía segura.

Así pues, los procesos de depuración de aguas se presentan como un proceso vital en esta reutilización, siendo necesario obtener información sobre el origen del agua residual y su contenido en materia orgánica para poder optimizar los procesos de depuración. Esta materia orgánica puede suponer un sustrato idóneo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, muchos de los cuales son patógenos, es decir, causantes de enfermedades (Metcalf y Eddy, 2003). Los criterios sanitarios de calidad de aguas para el consumo humano están establecidos en la Directiva 98/83/EU, recogida en España bajo el Real Decreto 140/2003.

Hay que tener en cuenta que no solamente el agua residual, sino también el agua tratada para obtener agua potable para el consumo humano puede contener bacterias patógenas, esporas, polen e incluso productos químicos tóxicos. A pesar de los avances y esfuerzos en cuestión de seguridad, en ocasiones el agua de abastecimiento es contaminada con patógenos, siendo una fuente de infección para el hombre (Thomas *et al.*, 2004). Esto incrementa la necesidad de que el agua sea tratada de forma correcta para evitar problemas de salud humana, siendo este el objetivo prioritario de la salud pública. La responsabilidad al respecto de esto recae sobre las directivas europeas y se ve reflejado en la legislación nacional, la cual debe garantizar que se reduzca la carga de contaminantes microbiológicos y físico-químicos en las aguas.

2. Depuración de aguas residuales

En la actualidad la depuración de aguas residuales es una tecnología sometida a continuos avances, a día de hoy la depuración de estas aguas se realiza en las llamadas Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales o EDAR. Las cuales por definición son un conjunto de instalaciones donde confluyen las aguas residuales para su tratamiento de descontaminación y depuración. Su objetivo es alcanzar, mediante combinación de diversos tratamientos físicos, químicos y/o biológicos, la reducción de la contaminación de las aguas residuales hasta límites aceptables para el cauce receptor.

2.1. Fases del tratamiento de aguas residuales

En las EDAR se distinguen dos líneas de tratamiento, separándose la línea de aguas de la línea de fangos, los cuales deben ser también tratados paralelamente, obteniendo una fracción de agua que debe ser recirculada a la cabeza de planta para ser tratada en la línea de aguas.

El proceso de depuración del agua se divide en cuatro etapas: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario.

Pretratamiento

Consistente en una sucesión de etapas físicas y mecánicas en las que se busca la eliminación de material de gran volumen que se encuentre en flotación o suspensión en el agua a tratar. Estos elementos de gran tamaño pueden originar problemas en los tratamientos posteriores.

Entre las operaciones realizadas en este pretratamiento están el desbaste para la eliminación de gruesos de gran tamaño, el desarenado y desengrasado para retirar arenas y sólidos y líquidos no miscibles en agua o de densidad menor a la del agua y la decantación para eliminar sólidos de menor tamaño. En algunos casos también se pueden incluir otras como la regulación y homogenización de caudales y cargas o la preaireación.

Tratamiento Primario

Procesos físicos y físico-químicos que se realizan para separar la contaminación que se encuentra suspendida en el agua. Dentro de esta fase se efectúan los siguientes tratamientos:

En los procesos físicos se utilizan decantadores-digestores y decantadores de gravedad, mientras que en los procesos físico-químicos se emplea la adición de reactivos químicos, los cuales permiten que las partículas se agreguen y puedan sedimentar con mayor facilidad. El nivel de reducción depende del proceso utilizado y de las características de las aguas residuales.

Tratamiento Secundario

También conocido como Tratamiento Biológico, el cual continúa reduciendo a la fracción de contaminación disuelta en el agua, mediante el empleo de bacterias que actúan dentro de grandes tanques agitados para oxigenar el agua. Los microorganismos se encargan de reducir la carga orgánica del agua alimentándose de esta.

Los tratamientos secundarios pueden agruparse en tratamientos de biomasa suspendida y tratamientos de biomasa fija.

En los primeros la biomasa con bacterias está suspendida en el medio acuático en contacto con la contaminación orgánica mediante agitación (fangos activos, aireación prolongada), mientras que en los segundos la biomasa se fija sobre un material soporte que se pone en contacto con el agua y la contaminación orgánica (lechos bacterianos, biodiscos).

El proceso más utilizado es el de fangos activos, realizado mediante la oxidación de la materia orgánica por vía aerobia. En este tratamiento el reactor está especialmente diseñado para mantener los microorganismos bajo condiciones controladas, acelerando el proceso natural de descomposición y neutralización de los residuos. En el decantador se produce la separación del agua depurada de los fangos activos. Parte del fango se recircula al reactor biológico con tal de mantener una concentración suficiente de bacterias, los fangos excedentes son llevados a la línea de tratamiento de fangos.

Tratamiento Terciario

Es un tratamiento físico-químico destinado a afinar algunas características del agua antes de que salga de la depuradora como efluente, la cual posteriormente puede ser empleada para distintos usos. Estos tratamientos son un complemento a la depuración del agua residual para eliminar compuestos no biodegradables o microorganismos patógenos que hayan sobrevivido a los anteriores procesos. Hay procesos destinados a desinfectar el efluente, como el tratamiento con cloro gas, hipoclorito, ozono y radiación ultravioleta, otros procesos sirven para reducir los sólidos en suspensión, la turbidez y la DBO₅ (parámetro que mide la cantidad de materia susceptible de ser consumida u oxidada por medios biológicos), e incluso existen procesos enfocados a la reducción de sales, tales como la ósmosis inversa, la electrodiálisis reversible y el intercambiador iónico.

La depuración del agua produce subproductos compuestos por todo aquello que se ha eliminado del agua. Los fangos procedentes de los decantadores deben recibir un tratamiento especial basado en espesamiento, digestión, deshidratación, hasta hacerlos susceptibles de ser tratados como residuos sólidos urbanos, incinerados, o bien como subproducto sometido a otros tratamientos como la estabilización o compostaje, a fin de ser reutilizado por ejemplo, en la agricultura. Es por ello que es necesaria una correcta eliminación de microorganismos patógenos en todo el material tratado en la EDAR.

Además, en el caso de tener que tratar aguas industriales se realizan tratamientos especiales, que suelen ser una combinación de procesos convencionales con procesos químicos. Los procesos más comunes en estas plantas son la corrección del pH (alcalinidad) y la precipitación química.

2.2. Estaciones de Tratamiento de Aguas Potables (ETAP)

Se definen como un conjunto de estructuras en las que el agua bruta recibe diferentes tratamientos físicos-químicos para que se vuelva apta para el consumo humano.

Los tratamientos físico-químicos a los cuales es sometida el agua cruda para transformarla en agua potable son: sedimentación, coagulación, floculación, decantación, filtración y cloración y desinfección. La desinfección consiste en la adición de cloro para destruir los microorganismos que aún pudieran encontrarse presentes en el agua. El objetivo de este tratamiento es desinfectar el agua y prevenir contaminaciones, además de asegurar su calidad sanitaria. Con tal de asegurar la buena calidad del agua potable para el consumo del ser humano, el cloro se adiciona en una cantidad de entre 0,6 y 0,8 miligramos por cada litro de agua (ppm). Este cloro residual libre en el agua, ayuda a prevenir posibles contaminaciones entre la salida de la ETAP y los puntos donde el agua es analizada, embotellada y distribuida a consumidores.

3. El agua, depurada y tratada, como foco de infección

El número de brotes infecciosos que pueda existir actualmente en las aguas no es un cálculo totalmente preciso, por lo general el número es mayor que el estudiado ya que solo una fracción de los brotes es registrada. En algunos casos esos brotes afectan a poca gente y de forma esporádica, por lo que pueden ser datos no registrados estadísticamente, perdiéndose además los datos referentes a casos derivados de alimentos contaminados con aguas de riego o las enfermedades crónicas que puedan estar asociadas a contaminación en los sistemas de distribución de agua municipales.

Según la “Waterborne Disease Outbreak Surveillance System” (WBDOSS) en EE.UU. en 2007 fueron registrados 164 brotes infecciosos producidos por aguas potables y agua reutilizada para el riego y recreo, lo cual afectó directa o indirectamente a seres humanos (Ingerson-Mahar y Reid, 2012).

Según Ingerson-Mahar y Reid, el brote de infección en las aguas de Ontario (EE.UU.) producido en el año 2000 por *Escherichia coli* supuso un daño económico de 150 millones de dólares. Por lo tanto hay que tener en cuenta no solo los riesgos para la salud humana, sino también los costes económicos derivados de estas infecciones producidas por patógenos en el agua.

La estrategia tradicional para el análisis de la calidad de las aguas tratadas ha sido el control del nivel de coliformes fecales, mediante el empleo de métodos culturales. Durante décadas y hasta ahora la clave para garantizar una distribución de agua limpia y adecuada para el uso por el ser humano ha consistido en combinar este análisis con una adecuada desinfección (Codony *et al.*, 2012). Pero su eficacia puede no ser la suficiente, debido a que este método no indica la presencia específica de ningún patógeno, siendo además los coliformes un grupo de bacterias muy común (Ingerson-Mahar y Reid, 2012).

Así pues, pese a que el indicador microbiológico más empleado es *Escherichia coli*, pueden existir patógenos aún más resistentes a los métodos de desinfección convencionales de las EDAR, los cuales pueden persistir en el agua supuestamente desinfectada con mayor facilidad que los indicadores fecales. Por lo tanto, el uso de un único organismo indicador como control de la calidad de las aguas tratadas puede tener sus limitaciones (Harwood *et al.*, 2005).

En la actualidad se conoce solo una pequeña parte de los patógenos oportunistas presentes en aguas tratadas. Entre estos patógenos están encontramos *Mycobacterium*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunos protozoos como *Acanthamoeba*, *Naegleria* o *Cryptosporidium* (Barbeau y Buhler, 2001; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Bonilla-Lemus, 2010; Varela y Manaia, 2013). Estos protozoos patógenos son altamente resistentes a los tratamientos de desinfección habituales como el tratamiento con hipoclorito sódico. En el caso de *Acanthamoeba*, está puede resistir concentraciones mayores de 1024 ppm (García *et al.*, 2007), del mismo modo para una disminución de 4 unidades logarítmicas de este protozoo se necesitan dosis de UV 10 veces mayor que para eliminar *E. coli*, concretamente 119 mW/cm² (Hijen y Madema, 2015).

Autoridades públicas de la salud de todo el mundo trabajan en la llamada EPA Contaminants Candidate List, o CCL3 en su versión actual (US-environmental protection agency, 2009) listado en el cual pretenden reflejarse los microorganismos patógenos que no están actualmente sometidos a ningún tipo de regulación a nivel nacional de cada país, pero que se espera que puedan aparecer en los sistemas de aguas públicas.

En este estudio, la importancia de estos patógenos reside en su capacidad de adherirse a estructuras denominadas biofilms. Estas estructuras son aglomeraciones de bacterias unidas por polímeros extracelulares formados por DNA, proteínas y carbohidratos, que junto a algunos protozoos de vida libre como las amebas pueden actuar como reservorio, protegiéndolos de los tratamientos de desinfección (Wingender y Flemming, 2011) e incluso propiciar su multiplicación (Dupuy *et al.*, 2011). Además de actuar como huéspedes transportadores, las amebas de vida libre o FLA facilitan la infección de los patógenos en el cuerpo del ser humano (Peralta y Ayala, 2009).

Cabe tener en consideración que la presencia de amebas en el agua destinada a consumo humano no es esporádica, estos organismos pueden aparecer en los sistemas de distribución de aguas y resistir a duras condiciones físicas y químicas, siendo en ocasiones resistentes a

altas temperaturas y a biocidas e incluso a los tratamientos convencionales con cloro realizados en las EDAR, como ya se ha comentado anteriormente (Thomas *et al.*, 2009). Existen evidencias, estudiadas en laboratorio, de que todas las bacterias incluidas en el listado CCL3 pueden tener crecimiento en el interior de las amebas, sirviendo estas como reservorio, barrera de resistencia ante los procesos de desinfección y tratamientos habituales con cloro y por lo tanto vía de transporte aumentándose el potencial del patógeno. Entre los patógenos de la lista que pueden tener a las amebas como reservorio se encuentran *H. pylori*, *L. pneumophila* e incluso la propia *E. coli* empleada como indicador de calidad en las aguas. (Besser *et al.*, 1999; Brown, 2000; Rangel *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006; Codony *et al.*, 2012).

Helicobacter pylori es una de las causas más comunes de infección crónica bacteriana en la humanidad (Graham *et al.*, 1991) y está considerado por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como carcinógeno Tipo I. Se estima que aproximadamente un 50% de la población mundial presenta infección por *H. pylori*, con mayor incidencia en los países en vía de desarrollo, donde el suministro de agua proviene de ríos o fuentes de agua no tratadas adecuadamente (Lu *et al.*, 2001).

La infección por *Legionella* spp. presenta un cuadro clínico muy variable, desde formas asintomáticas, hasta una neumonía grave con fallo multiorgánico. Se distinguen dos formas clínicas: la infección pulmonar o neumonía por *Legionella* y la fiebre Pontiac o síndrome global agudo autolimitado (Stout y Yu, 1997). La legionelosis es una enfermedad provocada por algunas especies patógenas del género *Legionella*, cuyas repercusiones sanitarias y socioeconómicas han provocado que su vigilancia y control esté en aumento durante los últimos años con una incidencia destacada en la Comunidad Valenciana.

Esto encamina a un dilema entre la estrategia de pretender detectar todos los patógenos potenciales en el agua, o bien utilizar uno solo como indicador que resulte más apropiado, debiendo considerarse no solo a los organismos patógenos en sí, sino también incluir otros indicadores persistentes y potenciales reservorios como puedan ser las amebas de vida libre. (Codony *et al.*, 2012).

Como alternativa se presenta el uso futuro de una combinación del uso tradicional de indicadores microbiológicos para el control de calidad de las aguas, y el control patógenos específicos o nuevos y más efectivos indicadores.

Así que es de gran interés para la Salud Pública, teniendo en cuenta que el agua es una posible vía de transmisión de enfermedades infecciosas, realizar todos los estudios orientados a entender y demostrar cómo estas bacterias patógenas pueden sobrevivir y llegar a representar un riesgo para la salud humana, y qué medidas de control pueden tomarse para asegurar su eliminación en las instalaciones de tratamiento de aguas.

4. Eficacia de los tratamientos de desinfección y alternativas viables

Las bacterias patógenas como *H. pylori* y *L. pneumophila* pueden ser eliminadas, generalmente, con los tratamientos convencionales de las EDAR. Hay muchos tratamientos, físicos, térmicos y químicos, para la desinfección o control de bacterias patógenas en medios acuáticos. Iones metálicos (cobre y plata), radiación ultravioleta (UV) y agentes oxidantes son comúnmente usados (Kim *et al.*, 2002). Los tratamientos de cloración son los de uso más extendido como tratamiento de choque contra estas bacterias, tal vez debido a su buena relación de coste-efectividad (Haas y Engelbrecht, 1980). Pero entre las desventajas de la cloración a grandes concentraciones se incluyen problemas en tuberías y liberación de subproductos carcinogénicos en el agua potable.

Estudios realizados acerca de la efectividad del hipoclorito sódico en la desinfección de *L. pneumophila* y *Acanthamoeba* han intentado demostrar que, en muestras de agua donde las amebas pueden contener *L. pneumophila* ha sido necesario realizar un tratamiento de entre 256 y 1024 ppm de hipoclorito sódico (NaOCl), la cual es una concentración mayor a la que había sido necesaria en muestras que contenían la bacteria sin la protección de la ameba como reservorio, la cual era de 512 ppm de NaOCl (García *et al.*, 2007). También se ha demostrado que algunos desinfectantes, como los empleados en torres de refrigeración, no son eficaces para eliminar amebas (Sutherland y Berk, 1996), así como la baja eficacia de algunos biocidas (Greub y Raoult, 2003b).

Las amebas además pueden favorecer a que las bacterias patógenas cambien, a largo plazo, su estado viable no cultivable o de resistencia, esto contribuye a la supervivencia del organismo patógeno en aguas que supuestamente habían sido desinfectadas (Kilvington y Price, 1990; Steinert *et al.*, 1997; 1998; 2002; Kim *et al.*, 2002).

La presencia de bacterias como *L. pneumophila* puede además bloquear a la ameba en su forma de quiste, por lo que se da una sinergia que favorece la resistencia de ambos organismos ante los tratamientos con hipoclorito sódico (Kilvington y Price, 1990; Barker *et al.*, 1992; 1995; Nwachuku y Gerpa, 2004; Storey *et al.*, 2004).

Así pues, teniendo en cuenta que la presencia de bacterias como *L. pneumophila*, pueden favorecer que las amebas se mantengan en su forma de resistencia o de quiste, la cual a su vez favorece la prevalencia de la bacteria patógena, se hace necesario considerar que para prevenir los problemas relacionados con estos organismos patógenos deben aplicarse desinfectantes a concentraciones efectivas, no solo contra la bacteria, sino también contra la ameba que actúa como reservorio (García *et al.*, 2007).

Estos trabajos demuestran que las concentraciones establecidas por la legislación para el tratamiento de aguas potables, tratamientos terciarios en EDAR e incluso el tratamiento de hipercloración de sistemas de distribución de agua sanitaria (30 ppm) no es siempre suficiente para eliminar *L. pneumophila* y probablemente otros patógenos, como *H. pylori* que se encuentren protegidos en el interior de amebas.

Tanto el tratamiento con luz UV, como ya se ha comentado en apartados anteriores, como el tratamiento con dióxido de cloro son superiores que el hipoclorito sódico a la hora de inactivar estos microorganismos, sobre todo en caso de combinarse ambos (Rand *et al.*, 2007).

Del mismo modo, un buen mantenimiento de los sistemas de tratamiento, como evitar la formación de biofilms y mantener las lámparas UV en perfecto estado, favorecerían la eficacia de los tratamientos.

5. Amebas de Vida Libre (FLA)

Las Amebas de Vida Libre (Free Live Amoebas, FLA) son un grupo heterogéneo de eucariotas (Rodríguez-Zaragoza, 1994), que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en todo el mundo, son muy abundantes en la naturaleza y en las zonas urbanas, ya que pueden sobrevivir en una amplia variedad de hábitats, incluyendo ambientes inhóspitos, gracias a su poca demanda de alimento y a que puede formar estructuras conocidas como quistes que las hacen resistentes.

Tienen la capacidad de ser parásitos, invadiendo el cuerpo de un ser vivo, al cual se denomina huésped. Esto hace que se le califique como microorganismo anfitrión, ya que afecta al cuerpo del huésped causando infecciones en el sistema nervioso central e infecciones diseminadas en piel y pulmones (Castrillón *et al.*, 2013).

Las FLA son más abundantes a pH 7,6 y su presencia disminuye a pH inferiores; aunque algunas amebas pueden tolerar niveles de pH de 8,6 o superiores. Las FLA normalmente toleran temperaturas de 10 a 30 °C (Rodríguez-Zaragoza, 1994).

En el ciclo vital o ciclo biológico de la mayoría de FLA existen dos estadios de desarrollo: una fase de trofozoíto y una fase de quiste.

Los trofozoítos o forma vegetativa metabólicamente activa de las FLA, adoptan una forma variable y se desplazan emitiendo pseudópodos, extensiones citoplasmáticas también involucradas en la captación de los alimentos. Se reproducen por partición binaria asexual y su enquistamiento se produce al quedar la ameba expuesta a cambios adversos en el entorno como pueden ser la falta de alimento, la desecación, pH inadecuado y presiones parciales de O₂ bajas.

El quiste es la forma latente o de resistencia o dormancia metabólicamente inactiva de las FLA ante condiciones desfavorables y situaciones de estrés, identificable por la presencia de una pared celular. En ellos se observa una reducción de la actividad metabólica hasta valores muy bajos. Si el quiste rompe, se libera al parásito y esto sucede cuando las condiciones ambientales son de nuevo favorables (Pereira y Pérez, 2003). En el enquistamiento las amebas pierden su movimiento de pseudópodos y se proveen de una pared protectora e impenetrable. Este periodo de latencia o dormancia cesa cuando la FLA enquistada encuentra unas condiciones adecuadas, los quistes se deshacen de su cubierta y vuelven a su forma vegetativa mediante el proceso denominado desenquistamiento, que es inducido por un medio rico en aminoácidos (Krishna y Shukla, 1984).

Entre las amebas de vida libre que tienen capacidad patógena para el hombre destacamos dos géneros: *Acanthamoeba* y *Naegleria* descubiertas en 1965 por Fowler y Carter, respectivamente. Entre las especies pertenecientes a estos dos géneros destacamos, por la importancia que presentan en el hombre, *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba castellanii* (Pereira y Pérez, 2003).

Estudios *in vitro* han revelado que 14 especies de amebas, entre las que se encuentran *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. y *Hartmannella* spp. pueden servir como huésped para *L. pneumophila* (Valster *et al.*, 2010).

Se ha determinado, estudiando casos en individuos que han tenido contacto con aguas contaminadas, que algunas amebas de vida libre (FLA) pueden causar meningitis y encefalitis. *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *Balmuthia mandrillaris* son FLA patógenas oportunistas humanas que se encuentran en el agua y en el suelo, por lo tanto es fácil que alcancen a afectar al ser humano si este ingiere alimentos regados o limpiados con agua que contenga estas amebas. El primer caso atribuido a *Naegleria fowleri* fue descrito en 1965 por Malcolm Fowler y Rodney F. Carter, en Australia, a la enfermedad se le denominó como meningoencefalitis amebiana primaria, término que fue acuñado por Cecyl G. Butt en 1966.

Naegleria fowleri parasita a individuos aparentemente saludables, como puedan ser personas jóvenes, causando meningoencefalitis amebiana primaria (Hlavsa *et al.*, 2011).

La infección causada en el sistema nervioso central por *Acanthamoeba* spp. y *Balmuthia mandrillaris* es denominada encefalitis amebiana granulomatosa. Esta infección provoca la aparición de células inflamatorias que forman un granuloma, a excepción de huéspedes inmunosuprimidos, donde no lo forman (Peralta y Ayala, 2009).

El protozoo *Acanthamoeba* spp. Fue descrito por primera vez en 1930, por Sir Aldo Castellani como un microorganismo saprófito que se desarrollaba en cultivos de levaduras de *Cryptococcus paraosus*, posteriormente fue reclasificado como *Acanthamoeba castellanii* (Douglas M., 1930). Actualmente, se ha establecido que *A. castellanii*, *A. culbertsoni*,

Acanthamoeba polyphaga y probablemente otras especies, son capaces de producir infecciones en seres humanos y animales (Ma *et al.*, 1990).

Acanthamoeba spp. puede producir queratitis amebiana, enfermedad dolorosa de la córnea que generalmente afecta a individuos inmunocompetentes. El mayor factor de riesgo asociado a la queratitis amebiana es el uso de lentes de contacto combinado con poca higiene de las mismas. *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris* también pueden causar amebiasis cutánea, que es una infección cutánea que produce lesiones blandas y no dolorosas localizadas principalmente en la cara, el tronco y las extremidades (Peralta y Ayala, 2009).

5.1. Protozoología de las FLA

Género *Acanthamoeba*

Actualmente hay descritas hasta 24 especies distintas en el género *Acanthamoeba* agrupadas en tres grupos principales (I, II, III) según la morfología de su forma en quiste (Page, 1988).

En preparaciones frescas se pueden observar trofozoitos ameboides irregulares con múltiples proyecciones pseudopodiales retráctiles, filamentosas o espinosas llamadas acanthopodios (figura 1). El tamaño de los trofozoitos puede variar según la especie, estando el promedio entre 20 a 40 μm ; en el caso de *A. Castellanii* el diámetro mayor es de 21 a 45 μm . El grupo I consiste de especies caracterizadas por grandes quistes y trofozoitos con endocistos en forma estrellada y ectocistos que pueden ser lisos o rugosos; el grupo II contiene amebas donde el ectocisto es rugoso y grueso, mientras que el endocisto puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado; en el último grupo el ectocisto es delgado y ondulado mientras que el endocisto es generalmente redondeado (Castrillón y Orozco, 2013).

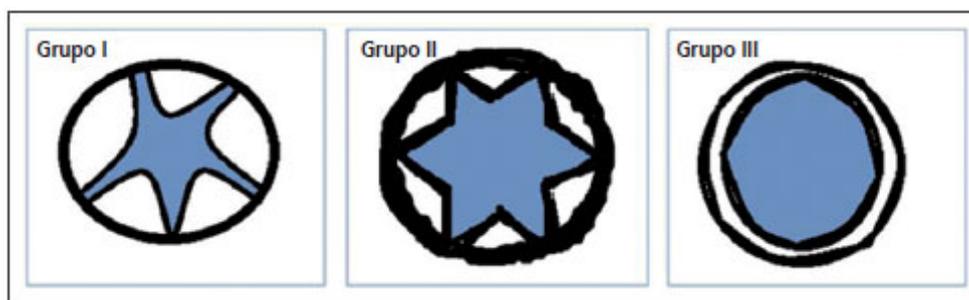


Figura 1. Clasificación de los quistes de *Acanthamoeba* según características morfológicas (Fuente: Castrillón y Orozco, 2013)

El grupo más comúnmente aislado del medio ambiente es el grupo II, con un quiste de tamaño menor de 18 μm . siendo el exoquiste de forma poliédrica, globular, ovoide o estrellado, y ondulado el endoquiste (figura 2). A este grupo pertenece la especie patógenas *Acanthamoeba castellanii* (Castrillón y Orozco, 2013).

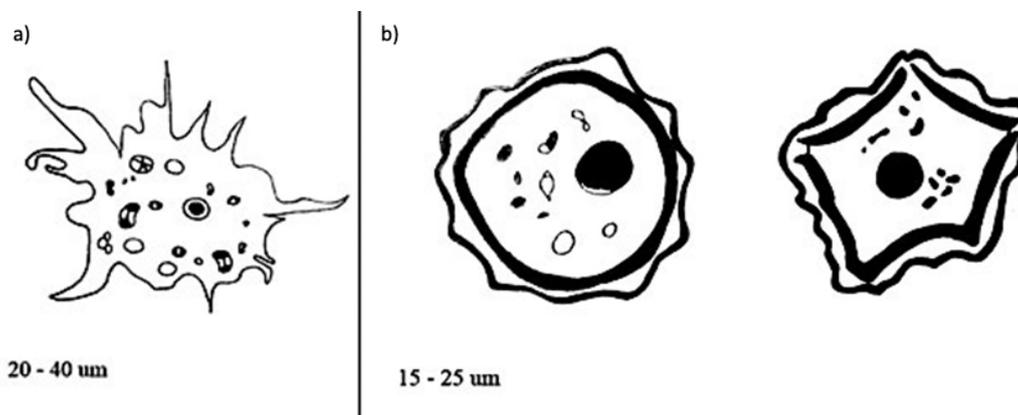


Figura 2. *Acanthamoeba* spp.: a) trofozoito; b) quiste en forma redondeada y poligonal con doble pared

Acanthamoeba castellanii puede encontrarse ampliamente distribuida en la naturaleza, en agua residual, lagunas y ríos, agua de mar, charcos, en enfriadores de agua, en filtros de aire acondicionado, también puede encontrarse en la boca y de la nariz de individuos sanos (Pfister, 1996; Stothard *et al.*, 1999, Marciano-Cabral, 2003).

Género *Balamuthia*

Dentro de este género puede encontrarse la especie *Balamuthia mandrillaris*. Un parásito oportunista, que causa lesiones en la piel y meningoencefalitis, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos (Fernández, 2015).

En el ciclo de vida de *B. mandrillaris* es muy semejante al de *Acanthamoeba spp*, siendo posible que estas amebas se confundan al presentar similitudes en su forma de trofozoito y de quiste. Los trofozoitos de *B. mandrillaris* miden entre 15 a 60 μm de diámetro máximo. Puede diferenciarse de *Acanthamoeba spp.* porque *B. mandrillaris* se desplaza mediante amplias proyecciones aplanadas, llamadas lamelipodios (Figura 3), a diferencias de las prolongaciones espinosas del género *Acanthamoeba*. Los quistes de *B. mandrillaris* miden de 15 a 30 μm de diámetro máximo, pudiéndose ser algo más grandes que los de *Acanthamoeba*; tienen una triple pared característica.

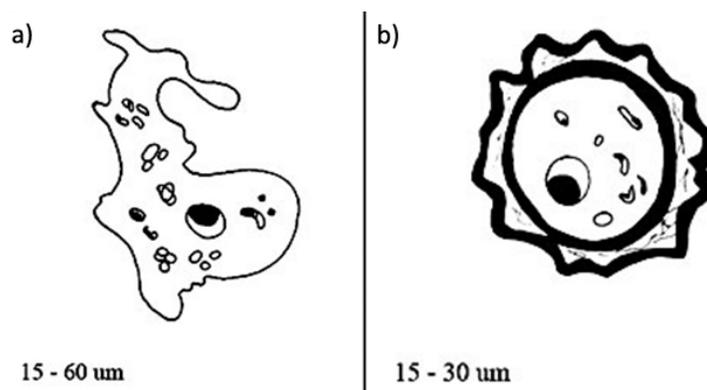


Figura 3. *Balamuthia mandrillaris*: a) trofozoíto; b) quiste

Balamuthia mandrillaris no se encuentra en el medio ambiente con tanta facilidad como *Naegleria* y *Acanthamoeba*, ya que ha sido principalmente recuperada de muestras de autopsia de humanos y animales infectados (Martínez *et al.*, 1997; Gutiérrez, 2000; Schuster, 2002) aun así, ha sido publicado el aislamiento de esta ameba de vida libre del ambiente en un entorno asociado a un caso de encefalitis (Schuster *et al.*, 2003).

Género *Naegleria*

En este género se encuentra de forma abundante la especie *Naegleria fowleri*. Esta ameba puede encontrarse, el suelo, agua dulce de piscinas y lagos, agua doméstica y agua residual (Oddó, 2006). Puede soportar altas temperaturas ambientales de entre 40 y 45 °C y puede resistir el cloro de las aguas de piscina. Según estudios las cepas termofílicas de *N. fowleri* han resultado virulentas en los animales de experimentación (Cerva, 1982; Martínez *et al.*, 1997; Gutiérrez, 2000).

Esta ameba puede encontrarse en su forma vegetativa o trofozoito (15 y 25 μm de diámetro, pueden estar aislados o en grupos), en estado flagelado y en forma de quiste. En su forma flagelada, es usualmente piriforme, con un diámetro máximo de 12 a 18 μm y con presencia de dos o más flagelos (figura 4).

Los quistes se pueden observar como formaciones esféricas, de 8 a 12 μm (figura 4), de diámetro mayor, aunque pueden alcanzar hasta 20 μm , presentan una densa pared retráctil con uno o dos poros aplanados (Fernández, 2015). Si las condiciones ambientales se tornan de nuevo favorables este desenquistamiento se produce relativamente pronto, aproximadamente en 5 minutos (Chávez-Munguía *et al.*, 2009).

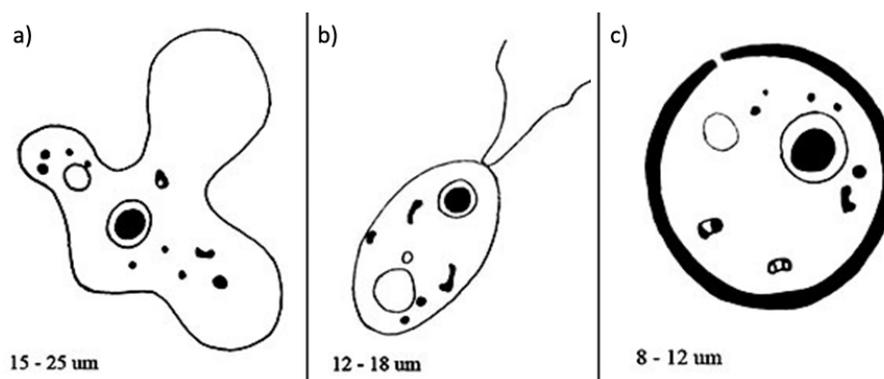


Figura 4. *Naegleria fowleri*: a) trofozoíto; b) forma ameboflagelada; c) quiste

El diagnóstico de *Naegleria* ha sido realizado con mayor frecuencia en tejidos de material de autopsia, las imágenes mostradas a continuación corresponden a estudios de Meningoencefalitis amebaria primaria (Oddó D., 2006).

5.2. Las amebas como reservorio de bacterias patógenas

En diversos casos ha sido realizada una comparación de las FLA con el “Caballo de Troya”. Esta comparación considera que las amebas pueden actuar como vehículos o reservorio de bacterias patógenas, siendo un hospedador, siendo este huésped inocuo a estas bacterias (Barker y Brown, 1994). Ciertas bacterias patógenas son capaces de resistir la digestión de las amebas y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en su interior, el cual las protege tanto de la cloración como de los antibióticos.

6. Género *Helicobacter*

En 1979, por primera vez, Warren observó la bacteria en el epitelio gástrico inflamado y, posteriormente, en gastritis asociadas a úlcera péptica (Warren, 2002). Pero no fue hasta 1982, cuando este microorganismo fue considerado de importancia cuando Marshall y Warren, lograron el primer cultivo de *Campylobacter pyloridis*, el actual *Helicobacter pylori* (Marshall y Warren, 1984). Estos microorganismos fueron adscritos con las siguientes claves: bacterias curvadas Gram-negativas, móviles mediante un flagelo envainado, capaces de formar estructuras cocoidales, microaerófilas, quimiorganótrofas, incapaces de fermentar u oxidar carbohidratos, con crecimiento óptimo a 37°C e incapaces de crecer a 25°C (Goodwin *et al.*, 1989).

En noviembre de 2005, Robin Warren y Barry Marshall recibieron el Nobel de Medicina y Fisiología. Los miembros del Comité resumían su aportación a la ciencia con estas palabras: "extraordinario e inesperado descubrimiento de que la inflamación del estómago (gastritis), así como la úlcera de estómago y duodeno (enfermedad ulcerosa péptica), son el resultado de una infección del estómago causada por la bacteria *Helicobacter pylori*" (The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine). Actualmente, la gastritis y la úlcera péptica son consideradas enfermedades infecciosas. Además, se ha comprobado la relación causal entre *Helicobacter pylori* y el adenocarcinoma y el linfoma gástrico, y se ha sugerido su relación con algunas enfermedades extradiigestivas (Pajares y Gisbert, 2006).

Sus especies son microaerófilas, quimiorganótrofas y tienen un metabolismo respiratorio. No utilizan carbohidratos. En los medios de cultivo típicos para *Helicobacter*, originan, tras 2-5 días de incubación a 37°C, colonias no pigmentadas, translúcidas y de 1-2 mm de diámetro. Crecen a 30°C pero no a 25°C. Son catalasa y oxidasa positivo. Producen H₂S

y no son capaces de hidrolizar el hipurato. Las especies gástricas son ureasa positivo. Su contenido en G+C varía entre el 35 y el 44% (Vandamme *et al.*, 1991).

La bacteria *H. pylori* se desarrolla bien en el medio de la mucosa gástrica. *H. pylori* presenta la capacidad de sobrevivir a estas condiciones de bajo pH comprendido entre valores de 1 y 4, ya que es capaz de tamponar el pH gracias a la acción de una ureasa. Esta ureasa convierte la urea en amonio, permitiendo que el microorganismo sea capaz de sobrevivir en la mucosa gástrica a pesar de la acidez del lumen (Moreno, 2013).

Pese a que los síntomas que se puedan dar, como en la gastritis, desaparecen al ser erradicada la bacteria, puede darse el caso de que debido a una infección por *H. pylori* se desarrolle un estado de gastritis crónica superficial, lo cual es una posible vía de sufrir cáncer gástrico si la bacteria permanece en la mucosa gástrica durante un tiempo prolongado (Cover y Blaser, 1995). Aproximadamente el 70% de los pacientes con cáncer gástrico son positivos para *H. pylori*. En el año 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la OMS (IARC) incluyó a *H. pylori* como agente biológico carcinógeno para el hombre (Moreno, 2013).

En países desarrollados el mecanismo de contagio de *H. pylori* más frecuente suele ser el contacto interpersonal directo vía oral-oral, pero en los países en vías de desarrollo predominaría la ruta oral-fecal. La falta de infraestructuras sanitarias, el hacinamiento, los bajos estándares socioeconómicos y educativos se asocian con tasas más elevadas de prevalencia y de reinfecciones. El modo de transmisión de este patógeno ha sido fuertemente debatido y hasta el momento no se ha determinado con exactitud (Engstrand, 2001). Se ha postulado que la transmisión puede ocurrir por la vía gastro-oral, oral-oral y fecal-oral, por alimentos y por agua. Lo cual indica que *H. pylori* puede ser adquirido por múltiples vías (Percival *et al.*, 2009), siendo la ruta de transmisión a través del agua la estudiada en este trabajo.

6.1. Transmisión de *Helicobacter pylori* en agua

Aunque la principal vía de transmisión de *Helicobacter pylori* no está clara, se muestra una fuerte correlación de la prevalencia de la infección por *H. pylori* con el acceso a agua limpia. La transmisión de *H. pylori* por el agua puede ser particularmente importante en regiones del mundo donde la calidad de la misma es baja y puede ser una razón para la diferencia en la prevalencia de *H. pylori* entre países desarrollados y en vías de desarrollo (Bunn *et al.*, 2002).

Diversos estudios epidemiológicos y ambientales son consistentes en plantear que el agua juega un rol importante en la transmisión (Klein *et al.*, 1991; Goodman *et al.*, 1996; Bunn *et al.*, 2002; Cellini *et al.*, 2004). Se ha determinado que *H. pylori* está presente en diversas fuentes de aguas: lagos, ríos, agua potable superficial y subterránea, aguas municipales y residuales (Moreno *et al.*, 2003) y ambientes marinos costeros, encontrándose también como microorganismo libre en el agua de mar y asociado a organismos planctónicos

En la siguiente tabla se expone un listado de estudios realizados del agua como medio de transmisión de *H. pylori*, en los cuales se han empleado distintos métodos de detección.

Tabla 1. Métodos de detección de *H. pylori* en ambientes acuáticos (Fuente: Fernández-Delgado *et al.*, 2008)

Métodos	Fuente de agua	Referencias
Cultivo	Aguas residuales	Lu <i>et al.</i> , 2002.
	Agua de pozo contaminada <i>in vitro</i>	Degnan <i>et al.</i> , 2003.
	Agua y plancton marino	Cellini <i>et al.</i> , 2005; Fernández <i>et al.</i> , 2007.
PCR	Agua potable, superficial y subterránea	Hulten <i>et al.</i> , 1996; Hulten <i>et al.</i> , 1998; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2001; McKeown <i>et al.</i> , 1999; Sasaki <i>et al.</i> , 1999; Baker y Hegarty, 2001; Horiuchi <i>et al.</i> , 2001; Park <i>et al.</i> , 2001; Bunn <i>et al.</i> , 2002; Watson <i>et al.</i> , 2004; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2005.
	Aguas residuales	Hulten <i>et al.</i> , 1998; Mazari-Hiriart <i>et al.</i> , 2001; Lu <i>et al.</i> , 2002; Queralt <i>et al.</i> , 2005.
	Lagos y ríos	McKeown <i>et al.</i> , 1999; Sasaki <i>et al.</i> , 1999; Moreno <i>et al.</i> , 2003; Fujimura <i>et al.</i> , 2004; Queralt <i>et al.</i> , 2005.
	Agua y plancton marino	Cellini <i>et al.</i> , 2004; Carbone <i>et al.</i> , 2005; Cellini <i>et al.</i> , 2005; Fernández <i>et al.</i> , 2007.
Inmunofluorescencia	Agua potable, superficial y subterránea	Hegarty <i>et al.</i> , 1999; Baker and Hegarty, 2001.
FISH	Aguas residuales	Moreno <i>et al.</i> , 2003; Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Ríos	Moreno <i>et al.</i> , 2003; Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Agua marina	Piqueres <i>et al.</i> , 2006.
	Aguas de riego	Piqueres <i>et al.</i> , 2006.

El agua que se utiliza en las ciudades es previamente tratada con el objetivo de reducir la carga de microorganismos que pueda contener. Los residuos de cloro en sistemas de distribución de aguas oscilan entre 0,1 y 0,3 mg/L. En tratamientos inadecuados, interrumpidos o intermitentes, es posible que no se produzca una adecuada inactivación de *H. pylori* para prevenir la entrada y persistencia de la bacteria dentro de los sistemas de distribución de agua, suponiendo un riesgo de infección para los individuos que consuman estas aguas tratadas de forma deficiente (Baker, 2002; Watson, 2004) detectaron *H. pylori* en grifos e instalaciones domésticas y escolares en Reino Unido. *Helicobacter pylori* también se ha detectado, en España, en plantas de depuración de aguas residuales, tanto en el afluente como en el efluente y en aguas potables (Moreno y Ferrús, 2012). Lo cual indica que esta bacteria es capaz de tolerar los tratamientos de desinfección mejor que los indicadores fecales básicos (Azevedo *et al.*, 2004).

Teniendo esto en consideración, existen evidencias de que *H. pylori* puede estar presente en aguas cuando la enumeración de coliformes en medios selectivos indique que el agua es potable. También puede darse el caso de que *H. pylori* sea capaz de persistir durante largos periodos de tiempo en sistemas de distribución de agua que contengan bajos niveles de cloro residual. Estudios demuestran que *H. pylori* puede ser más resistente al cloro libre que *E. coli* (Jhonson *et al.*, 1997). *H. pylori* es capaz de sobrevivir en biofilms solubles al agua cuando crece bajo altas condiciones de C:N (Percival *et al.*, 2004).

6.2. Estrategias de supervivencia de *H. pylori* en ambientes acuáticos

Existen varias hipótesis para explicar las estrategias de supervivencia de las bacterias patógenas como *H. pylori* en ambientes acuáticos, tales como la formación de biopelículas, la asociación al plancton y el estado viable no cultivable (VBNC).

Biopelículas

Las biopelículas son comunidades complejas de microorganismos adheridas a superficies o asociadas a interfases. La supervivencia de microorganismos patógenos, incluyendo a *H. pylori*, puede ser prolongada por la colonización activa de biopelículas como las encontradas en los sistemas de almacenamiento y distribución de agua potable. Las biopelículas le proporcionan a la microbiota asociada un sustrato que le permite su multiplicación, la adquisición de nutrientes, el mantenimiento de un ambiente fisicoquímico apropiado y la resistencia a agentes antimicrobianos (Davey y O'toole, 2000; Park *et al.*, 2001).

Algunas amebas de vida libre (FLA) pueden actuar como hospedadores de bacterias resistentes a las amebas y favorecer su protección y diseminación en los sistemas de agua (Loret y Greub, 2010). Los biofilms parecen ser el lugar donde principalmente ocurre la infección de FLA por bacterias resistentes a las amebas (Loret y Greub, 2010). El bajo porcentaje de supervivencia de *H. pylori* en aguas hace pensar que esta bacteria podría sobrevivir en amebas de vida libre que le protegerían frente a los distintos tratamientos, y a través de ellas llegar a los humanos. (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002; Smith y Ashbolt, 2012).

Por lo tanto que el agua potable puede ser una ruta de transmisión de *H. pylori*, y las biopelículas pueden actuar como ambientes de acumulación pasiva de especies de *Helicobacter* o como un reservorio importante de infección.

Estado viable no cultivable (VBNC)

En respuesta a condiciones de estrés ambiental, algunas bacterias adoptan un estado que se ha definido como viable no cultivable (VBNC); se mantiene la patogenicidad y la capacidad de realizar funciones metabólicas, pero esta estrategia de resistencia no permite que la bacteria se reproduzca y por lo tanto no puede aislarse mediante métodos de cultivo en el laboratorio. En este estado, las células permanecen no cultivables hasta que son expuestas a un medio que estimule su crecimiento (Kell *et al.*, 1998). Cuando pasan a este estado las bacterias adquieren una forma esférica o cocoidal (Signoretto *et al.*, 2000).

Al entrar en contacto con el agua, *H. pylori* es capaz de adoptar el estado VBNC, pasando de la forma espiral a la de cocoide, que dificulta su aislamiento y cultivo lo que supone que podría estar infravalorándose su potencial como agente infeccioso. (Oliver, 2005; Bellack *et al.*, 2006).

En la actualidad todavía existe controversia sobre la viabilidad y capacidad de infección de estas formas VBNC (Andersen y Rasmussen, 2009). Dado que estas formas VBNC pueden ser contagiosas y volverse viables en un momento posterior, pero no pueden ser detectadas por los métodos convencionales de cultivo, plantean un riesgo de Salud Pública significativo.

7. Género *Legionella*

Dentro del género *Legionella*, perteneciente a la familia Legionellaceae, existen más de 50 especies descritas y más de 70 serogrupos. No todas las especies son patógenas, las principales causantes de enfermedad son *L. pneumophila* y *L. micadei* (Benson y Fields, 1998). Las especies de *Legionella* se pueden encontrar en medios acuáticos y suelos húmedos, cultivos y tierras de jardinería.

Legionella pneumophila es considerada como un patógeno primario en la salud humana y causante de la enfermedad Legionelosis, la cual es una enfermedad bacteriana de origen ambiental que presenta fundamentalmente dos formas clínicas perfectamente diferenciadas: la infección pulmonar o “Enfermedad del Legionario” (McDade *et al.*, 1977) que se caracteriza por neumonía con fiebre alta, y la forma no neumónica conocida como “Fiebre de Pontiac” (Fraser *et al.*, 1979).

Fue en el año 1976 cuando esta enfermedad fue descubierta a raíz de un brote de neumonía en la XVIII convención Anual de la Legión Americana celebrada en Pensilvania. Dicho brote afectó a un total de 221 legionarios, de los cuales 34 fallecieron (Fraser *et al.*, 1977). A la bacteria se le denominó *Legionella*, en honor a los legionarios infectados, y *pneumophila* por su afinidad para producir infección pulmonar.

Actualmente la legionelosis es una enfermedad con repercusión mediática ya que está asociada a brotes comunitarios, habitualmente relacionados con el uso de agua caliente sanitaria, fuentes ornamentales, etc. Así pues, el estudio de esta bacteria tiene implicaciones sanitarias y socioeconómicas (Moreno, 2002).

Legionella pneumophila es una bacteria gram negativa aerobia estricta que generalmente tiene forma de bacilo, pero puede adoptar forma cocoidal o filamentosa en cultivos prolongados, es capaz de sobrevivir en un amplio rango de condiciones físico-químicas (Fliermans *et al.*, 1981). Puede multiplicarse en temperaturas comprendidas entre 20°C y 45°C (Stout *et al.*, 1985, Sanden *et al.*, 1989) y destruyéndose a 70°C (Groothuis *et al.*, 1985). Su temperatura óptima de crecimiento es 35-37°C. Es una bacteria quimiorganotrófica, es decir, utiliza compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Al tener flagelos puede moverse con facilidad, pero al contrario que *Helicobacter pylori* no presenta forma de resistencia (quiste o spora). Su tamaño oscila entre 0,5 a 1 µm de ancho y de 2 a 4 µm de longitud.

Se ha determinado que *L. pneumophila* puede infectar y replicarse dentro de protozoos de vida libre, concretamente en cinco géneros de amebas que habitan en el suelo y en el agua, lo cual hace que esta bacteria sea aún más virulenta al funcionar la ameba como reservorio y protección de la *Legionella* (Cirillo *et al.*, 1999). Al igual que ocurre con *H. pylori*, esto supone un problema en la depuración de aguas residuales. Las cepas virulentas de *L. pneumophila* son capaces de parasitar amebas mientras que las cepas avirulentas no, al carecer de algún factor necesario para realizar la invasión.

Según la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en los últimos diez años ha sido declarada una media anual de 1.263 casos de legionelosis en España, lo cual supone una tasa anual media de 2,9 casos por cada 100.000 habitantes. En el periodo comprendido entre 1999 y 2011 fueron declarados 597 brotes de legionelosis, en los cuales resultaron afectadas 3.785 personas de las cuales 3.144 requirieron hospitalización (83%). Se dieron 155 fallecimientos, siendo la letalidad global de 4,1%.

7.1. Transmisión de *Legionella pneumophila*

Hasta el momento la infección en humanos por *Legionella* ha sido determinada solo por transmisión ambiente-persona., no habiendo evidencia de su posible transmisión de persona a persona (Yu *et al.*, 1983), ni de la existencia de reservorios animales conocidos.

La entrada de *Legionella* en el organismo humano se produce básicamente por inhalación de aerosoles que contengan un número suficiente de bacterias (Baskerville *et al.*, 1981; Hoge y Breiman 1991), y por la inhalación del polvo formado al remover tierras contaminadas.

Así pues, la infección en personas se puede producir por inhalación de la bacteria al ser esta transportada en pequeñas partículas de polvo o agua, Las gotas de agua que contienen la bacteria pueden permanecer suspendidas en el aire y penetrar en las vías respiratorias alcanzando los pulmones (Fitzgeorge *et al.*, 1983). Las instalaciones que más frecuentemente se encuentran contaminadas con *Legionella* y han sido identificadas como fuentes de infección son sistemas de agua sanitaria, caliente y fría (Tobin *et al.*, 1980, Wadowsky *et al.*, 1982, Bartlet *et al.*, 1983, Stout *et al.*, 1992, Joseph *et al.*, 1996), torres de refrigeración (Fiore *et al.*, 1997).

Para que la infección sea producida los individuos susceptibles deben inhalar aerosoles que contengan cantidades suficientes de la bacteria *Legionella pneumophila* viable (Pelaz y Martin- Bourgon, 1993).

7.2. Legislación y medidas de seguridad

Desde 1997 la Legionelosis es una enfermedad de declaración obligatoria en España a partir de la aprobación del Real Decreto 2210/95 de 28 de Diciembre (BOE de 24 de Enero) por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Debe someterse a control bajo medidas higiénico-sanitarias según explican las guías, protocolos y legislación (Marcó *et al.*, 2009).

España forma parte del Grupo Europeo para el estudio de infecciones por *Legionella* (EWGLI) al cual se le deben notificar los casos de enfermedad en españoles asociados con viajes al extranjero, este grupo además informa de casos en turistas que puedan haber contraído la enfermedad en España (Lane *et al.*, 1998).

La normativa internacional UNE-ISO 11731:2007 para la detección de *L. pneumophila* indica que: “*Legionella* spp. son microorganismos Gram-negativos, normalmente capaces de crecer en no menos de 2 días, en un medio tamponado de agar, extracto de levadura, carbón vegetal, L-cisteína y hierro (III) y que forman colonias, normalmente blancas, o colonias coloreadas que van desde el púrpura al azul o al verde amarillento.” El análisis de *L. pneumophila* debe realizarse según la norma ISO-11371 en su última edición, siendo el límite de detección será igual o menor a 100 UFC (unidades formadoras de colonias) por litro, en torres de refrigeración y circuitos de agua.

Todas las especies de *Legionella* deben manejarse con seguridad en un laboratorio microbiológico convencional con seguridad biológica de Nivel 2. La infección se produce por inhalación del organismo, así que se deben evaluar todas las técnicas considerando su habilidad para producir aerosoles y por lo tanto se debe de trabajar en vitrina de seguridad y campana de extracción dotada con un mechero bunsen.

8. Métodos de detección de *H. pylori*, *L. pneumophila*, y FLA

En los últimos 15 años, la mayoría de los estudios se han orientado al desarrollo de métodos que demuestren la presencia de *H. pylori* en el agua, los cuales han contribuido a la hipótesis de la transmisión acuática de este patógeno. (Fernández-Delgado *et al.*, 2008). El cultivo de *H. pylori* en ambientes distintos al estómago humano ha sido difícil, debido a cambios morfológicos de esta bacteria y al sobrecrecimiento o competencia de otros microorganismos. El hecho de que la forma VBNC (viable no cultivable) de *H. pylori* en aguas impide que se pueda hacer crecer fácilmente en los medios de cultivo conocidos a día de hoy (Signoretto *et al.*, 2000), ha provocado que sea necesario recurrir a diferentes métodos moleculares para la detección de este patógeno en aguas. Se han realizado esfuerzos por cultivar esta bacteria en muestras de agua usando medios de crecimiento alternativos bajo condiciones microaerofílicas variables (Hulten *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2002; Degnan *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2003; Carbone *et al.*, 2005). Hasta el presente, se han reportado algunos casos de cultivo viable de este patógeno a partir de muestras de aguas residuales, agua marina y asociado al plancton, confirmando la presencia de *H. pylori* por análisis de secuencias del gen 16S del rRNA (Lu *et al.*, 2002; Cellini *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2007). Debido a las dificultades que presentan las técnicas tradicionales de cultivo en recuperar este microorganismo del ambiente, la PCR y la inmunofluorescencia y mediante técnica combinada de DVC-FISH han sido usadas exitosamente para la detección de las bacterias patógenas a estudiar.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permite que genes específicos de la bacteria sean ampliados, y las técnicas basadas en la inmunofluorescencia pueden ser empleadas para determinar la presencia de *H. pylori* metabólicamente activa en aguas para consumo humano (Fernández-Delgado, 2008).

8.1. Hibridación *in situ* por Fluorescencia (FISH)

Como principal técnica de gran utilidad para la detección de microorganismos patógenos en muestras de agua mediante fluorescencia se presenta la técnica de Hibridación *in situ* por Fluorescencia (FISH) (Moreno *et al.*, 2003; Piqueres *et al.*, 2006).

Esta técnica se basa en la marcación de la muestra mediante sondas de ADN o ARN acopladas a un fluoróforo, proceso al cual le sigue una hibridación. La observación de estas muestras hibridadas se realiza mediante microscopía de fluorescencia (Amann *et al.*, 1990).

Pocos estudios han evaluado la efectividad de FISH para la detección directa de células viables de *H. pylori* en muestras de agua dulce, potable, marina y agua tratada con hipoclorito de sodio (Moreno *et al.*, 2007). Aunque esta técnica necesita una evaluación más exhaustiva, ha demostrado ser sensible, específica, cuantitativa y rápida para detectar células completas de *H. pylori* en muestras ambientales.

La técnica FISH puede ser combinada con la técnica Direct Viable Count (DVC-FISH) esta combinación de técnicas es una herramienta potente, rápida y sensible para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos (Amman *et al.*, 1995) y ha sido empleada con éxito en la detección de células viables de *H. pylori* en aguas de río, residuales y aguas superficiales en diversos estudios (Piqueres *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007).

La técnica DVC-FISH tiene el fundamento de aportar mayor efectividad a la detección específica propia de la técnica FISH, permitiendo que se pueda realizar la detección específica con la diferenciación entre células viables y no viables gracias a la elongación de las mismas.

La técnica FISH detecta secuencias de ácidos nucleicos mediante una sonda marcada por fluorescencia que hibrida específicamente con la secuencia complementaria sin dañar la célula.

Como blanco es empleada una región del RNA ribosómico 16S o 23S por su estabilidad genética y su estructura, en la que coexisten regiones conservadas con regiones variables y su alto número de copias (Woese, 1987), esto permite una amplificación de la señal fácilmente detectable durante la observación en microscopía de fluorescencia.

8.2. Técnica combinada DVC-FISH

Con respecto a otras técnicas tales como la PCR o la detección de anticuerpos, la combinación DVC-FISH presenta ventajas al no requerir cultivo previo ni extracción de ácidos nucleicos. No da problemas por uniones inespecíficas ni por sustancias inhibitoras que dificulten el proceso.

Además, la técnica FISH combina la precisión de la genética molecular con la información visual de la microscopía, permitiendo la visualización e identificación de células microbianas individuales dentro de su microambiente natural o del tejido enfermo.

Como principal desventaja de esta técnica combinada cabe destacar su sensibilidad, la cual va en función de la sonda empleada y de la matriz donde se esté hibridando. El método utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parece que ejercen una importante influencia en la intensidad de la señal (Fuchs *et al.*, 2001). Por lo tanto podría decirse que es una técnica que puede verse afectada por errores realizados durante el proceso y relacionados a la calidad de las sondas o muestras empleadas.

El diseño de las sondas es, por lo tanto, un aspecto crucial en esta técnica. Las sondas deben ser suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que quiere detectarse. Esto es debido a que la bacteria a observar se encuentra en presencia de otras, en muchos casos con moléculas de rRNA muy homólogas. La accesibilidad de la sonda al rRNA es diferente según la molécula de rRNA de la que se trate (23S o 16S) y la zona del mismo de la que sea complementaria. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 30 pares de bases, las más cortas pueden presentar una mayor accesibilidad, pero pueden llevar menos marcadores (Fuchs *et al.*, 2001).

Las sondas empleadas son modificadas con LNA (nucleótidos con una modificación en el anillo de ribosa), con el fin de que se aumente la especificidad y la sensibilidad de unión con las regiones de rRNA. Según (Rune *et al.*, 2005), en lo referente a la detección de fragmentos de RNA las sondas FISH modificadas con LNA superan a las sondas convencionales de DNA.

La especificidad de una sonda se tienen en cuenta dos parámetros determinantes: la temperatura de hibridación y la concentración de formamida puesta en la solución de hibridación. Normalmente la temperatura de hibridación se mantiene constante en la mayoría de protocolos, pero la concentración de formamida es un parámetro que al variar aporta condiciones más o menos astringentes. Este compuesto hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas, a base de debilitar los puentes de hidrógeno, permitiendo así que se de la unión a temperaturas más bajas con condiciones astringentes (Moter y Göbel, 2000). Actualmente el uso de esta técnica de detección de *H. pylori* en muestras ambientales no está muy extendido. Moreno *et al.* (2003) y Moreno y Ferrús (2012) la emplearon para la detección de *H. pylori* en agua de río y aguas residuales.

En el método DVC se realiza una incubación de las muestras con un agente antimicrobiano y con nutrientes. El agente microbiano actúa como un inhibidor específico de la síntesis de DNA, con lo que se previene la división celular sin afectar a otras actividades metabólicas. Esto favorece a que las células continúen metabolizando nutrientes y queden elongadas y/o más gruesas tras la incubación.

Este método presenta dificultades para la aplicación en comunidades complejas, ya que en un microambiente real existen bacterias resistentes al agente antimicrobiano empleado y por tanto serían capaces de crecer sin la formación de células elongadas. Resulta complicado diferenciar entre células elongadas y células que no lo están. Las células elongadas pueden ser más pequeñas que la media de la población y por tanto enmascarar las células que se están buscando (Coullier *et al.*, 1994). Es por esta razón que se realiza, de forma combinada, la técnica DVC-FISH, ya que el método FISH está basado en secuencias diana específicas de la bacteria que se desea detectar.

Independientemente de estos aspectos, existe un inconveniente en la técnica FISH relacionado con la observación mediante microscopía de fluorescencia.

II. OBJETIVOS

Tras las consideraciones antes expuestas, y tomando como referencia todos los estudios realizados anteriormente, este presente trabajo tiene por propósito contribuir a la investigación necesaria al respecto del estudio del papel de las FLA como reservorio de las bacterias patógenas *Helicobacter pylori* y *Legionella pneumophila* y la valoración de la eficacia de los tratamientos de desinfección actuales aplicados sobre las aguas residuales y las aguas potables para eliminar estos organismos.

Los objetivos planteados para este trabajo de investigación son los siguientes:

1. Aislar e identificar amebas de vida libre en aguas residuales depuradas
2. Aislar e identificar amebas de vida libre en aguas potables
3. Detectar, mediante la técnica DVC-FISH, formas viables de *H. pylori* procedentes del interior de las amebas de vida libre aisladas
4. Detectar, mediante la técnica DVC-FISH, formas viables de *L. pneumophila* procedentes del interior de las amebas de vida libre aisladas
5. Detectar formas cultivables de *H. pylori* procedentes del interior de las amebas de vida libre aisladas
6. Detectar formas cultivables de *L. pneumophila* procedentes del interior de las amebas de vida libre aisladas
7. Valorar la capacidad como indicador de la efectividad del proceso de depuración, detección de amebas de vida libre y de formas viables y/o cultivables de bacterias patógenas en su interior

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Origen de las muestras

En este trabajo se analizaron un total de 24 muestras de agua, procedentes de una EDAR, depuradoras de industrias alimentarias y otras estaciones depuradoras urbanas, y de aguas potables de diversas fuentes de uso público y de una manguera de riego del jardín de una vivienda (tabla2).

La recogida de muestras en esta EDAR se realizó a lo largo de un periodo de tiempo comprendido entre Enero y Mayo de 2015.

Tabla 2. Origen de las muestras procesadas y nomenclatura asignada

	Origen
0.2	EDAR entrada tratamiento terciario
0.3	EDAR salida tratamiento terciario
1.2	EDAR entrada tratamiento terciario
1.3	EDAR salida tratamiento terciario
2.2	EDAR entrada tratamiento terciario
2.3	EDAR salida tratamiento terciario
3.2	EDAR entrada tratamiento terciario
3.3	EDAR salida tratamiento terciario
4.2	EDAR entrada tratamiento terciario
4.3	EDAR salida tratamiento terciario
5.2	EDAR entrada tratamiento terciario
5.3	EDAR salida tratamiento terciario
1	EDAR Industria alimentaria
2	EDAR Industria alimentaria
3	EDAR Industria alimentaria
4	EDAR Industria alimentaria
5	Depuradora urbana
6	Depuradora urbana
DW1	Fuente de agua potable
DW2	Fuente de agua potable
DW3	Fuente de agua potable
DW4	Fuente de agua potable
DW5	Red distrib. agua urbana
DW6	Red distrib.agua urbana

2. Procesado de las muestras

El cloro total en las muestras procesadas fue medido mediante espectrofotometría. El sistema comercial de medición para espectrofotómetro empleado fue el Spectroquant 1.00599.0001: Test de Cloro (Cl₂) para la medida de cloro libre y cloro total, aprobado por la USEPA (US Environmental Protection Agency) para aguas potables y residuales.

Para realizar la medición se diluyó 1 mL de muestra en 9 mL de agua bi-distilada y se siguieron los pasos para la adición de reactivos de medida indicados en el protocolo de este kit de medición para el cloro total.

Con el fin de evaluar la presencia de amebas de vida libre (FLA) en aguas, las muestras fueron sometidas a priori a un filtrado mediante una rampa de filtración. En aguas potables se procesó un volumen de 5 litros, con una filtración a través de membranas estériles de 3 µm (Scharlab, España). En aguas residuales se procesó un volumen de 1 litro con una filtración a través de membranas estériles de 3 µm (Scharlab, España).

En todas las muestras se colocó posteriormente el filtro sobre una placa preparada con medio de cultivo Non-Nutrient Agar Page (NNAP) (Anejo A.1.), tal y como explica Fittipaldi *et al.* (2011) de forma que todo lo retenido por el filtro esté en contacto con el agar. La placa es cultivada en horno de 30 °C durante 24 horas. Tras este periodo de tiempo el filtro es retirado de la placa. La manipulación de la placa es siempre realizada bajo las condiciones de seguridad de una campana de extracción y junto a la llama de un mechero bunsen.

Las placas son entonces incubadas en condiciones de aerobiosis a 28 °C durante un periodo de entre 3 y 12 días, durante el cual las placas pueden ser periódicamente examinadas, ya sea mediante un microscopio invertido observando a través de la placa, o con un microscopio de contraste de fases realizando una preparación en un portaobjetos.

En caso de comprobar la presencia de FLA en la muestra, se procede a realizar su tratamiento con cloro con la finalidad de eliminar otros microorganismos que puedan haber crecido y aquellas células que estén fuera de las FLA.

El tratamiento con cloro se realizó añadiendo a la placa 2 mL de PAGE para poder utilizar un raspador de células estéril y recoger directamente desde la placa con la ayuda de una pipeta. A esta cantidad recogida le es añadido hipoclorito sódico a 1960 ppm. Esta mezcla es conservada en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora en condiciones de aerobiosis, periodo tras el cual debe ser centrifugada a 500 rpm durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, la resuspensión del pellet debe realizarse en la cantidad de PAGE suficiente como para poder distribuir la muestra tratada en los procesos siguientes.

Se ha resuspendido en 1000 µL de PAGE, para poder distribuir la muestra tratada en:

- 450 µL destinados al proceso DVC-FISH
- 300 µL destinados al cultivo en tres nuevas placas con medio de cultivo (anejo A1), siendo 100 µL en cada una:
 - Placa NNAP en la que volver a cultivar FLA
 - Placa Agar Sangre DENT (ASD), incubada 24 horas en microaerofilia a 37°C
 - Placa con medio para crecimiento de *Legionella*, incubada a 37°C. Estas placas son comerciales y han sido adquiridas ya preparadas (OXOID, S.A. *Legionella* BCYE Medium Ref.: PO5072A)

Transcurrido el periodo de incubación, en estos nuevos cultivos en placas Agar Sangre DENT y medio para *Legionella* se observó si se había dado crecimiento de colonias de *H. pylori* y *L. pneumophila*. En las muestras en las que el crecimiento de colonias era positivo, la muestra

correspondiente cultivada nuevamente en NNAP fue sometida a fijación e hibridación de la técnica FISH, mediante la cual poder identificar y confirmar la presencia de estas bacterias patógenas.

3. Identificación de amebas en las muestras procesadas

Tras ser procesadas las muestras, estas fueron puestas en incubación a 37°C durante un mínimo de 72 horas. Periodo tras el cual se esperaba tener crecimiento de FLA en el medio de cultivo NNAP.

Para la observación del posible crecimiento de FLA en las muestras procesadas se realizó mediante el uso de un microscopio invertido, con el cual poder hacer una primera observación de las placas con muestra sin que estas fueran abiertas o alteradas. Tras esto las placas que mostraban posible crecimiento de FLA eran preparadas en un portaobjetos para su análisis en un microscopio de contraste de fases, el cual estaba además equipado con una cámara con la cual poder obtener fotografías de las FLA encontradas en las muestras.

La identificación de las distintas especies de amebas se realizó siguiendo las observaciones, ilustraciones e imágenes indicadas en estudios previos (Castrillón *et al.*, 2013; Fernández, 2015).

4. Detección e identificación de *H. pylori* y *L. pneumophila* viables, mediante la técnica combinada DVC-FISH

4.1. Incubación en DVC

El proceso de incubación en DVC (Anejo A.2.) se realizó mezclando, en tubos de 15 ml, 9 ml de caldo DVC y 1 ml de muestra.

El mililitro de muestra es recogido directamente de la placa de muestra, para ello se emplea la campana de extracción junto con un mechero bunsen para asegurar que la placa no sea contaminada. El mililitro de muestra es recolectado aplicando entre 1,5 y 2 mL de PAGE en la placa, posteriormente el agar es rascado con ayuda de una espátula metálica previamente desinfectada con etanol y llama, el PAGE es recolectado con ayuda de una pipeta de 1000 µl.

Tras introducir 1ml de muestra en los 9 ml de DVC, la mezcla es incubada durante 24 horas en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂), este estado es óptimo para el crecimiento de *H.pylori* (Piqueres *et al.*, 2006), tras la incubación los 10 mL son centrifugados a 8000 rpm durante 8 minutos, tras lo cual es retirado el sobrenadante. El sedimento resultante es resuspendido en 1 ml de PBS 1X a 4°C (Anejo B.2.).

4.2. Condiciones de fijación de la muestra

La fijación de células de la muestra se realiza tras la incubación en DVC, utilizando ese mL ya preparado en el punto anterior. El proceso continua con uno o dos centrifugados adicionales al anterior, realizados de la misma manera, con la diferencia de que la última resuspensión debe hacerse con 250 µL de PBS 1C (4°C) y 750 µL de paraformaldehído (PFA) totalmente descongelado. Esta mezcla debe permanecer en la nevera a 4°C durante por lo menos una hora y media.

Tras este periodo la muestra puede ser retirada del refrigerador para ser de nuevo centrifugada a 8000 rpm durante 8 minutos en dos o tres repeticiones, siendo retirado el sobrenadante y resuspendiendo en PBS. La última resuspensión se realiza en 100 µL de PBS 1X

y 100 µL de etanol 100%. Tras esto las muestras pueden ser guardadas en congelador a -20°C por tiempo prolongado hasta que sea proceda con la hibridación de FISH (Moreno *et al.*, 2003).

4.3. Condiciones de hibridación en la técnica FISH

La hibridación in situ en la técnica FISH de las muestras fijadas se realizó empleando portaobjetos de hibridación, previamente tratados con gelatina (Anejo B.3.). 8 µL de cada una de las muestras fijadas son colocados independientemente en cada pocillo del portaobjetos, respectando el pocillo numerado como "6", en el cual siempre se aplica el control de la bacteria que se quiere identificar.

Tras esto el portaobjetos debe dejarse secar, puede hacerse al aire libre o de forma más acelerada en el horno de hibridación a 46°C durante 5 ó 10 minutos. Tras esto se realizan sucesivos lavados sumergiendo completamente el portaobjetos en etanol de 50, 80 y 100%. El portaobjetos es dejado secar.

Paralela o posteriormente es preparado el tampón de hibridación con sondas, cuya composición se calcula según lo siguiente:

(8 µL de solución de hibridación + 1 µL de cada una de las dos sondas) x nº de pocillos usados

Las sondas empleadas son las marcadas con el correspondiente fluorocromo según la bacteria que quiera identificarse, esto es explicado posteriormente.

La solución e hibridación es preparada, en este caso, al 40% de formamida.

En cada pocillo son colocados 10 µL de tampón de hibridación con sondas (Anejo B.3).

A continuación el portaobjetos es introducido en una cámara de hibridación, la cual está compuesta por un tubo de 50 mL, dentro del cual se ha introducido una base de papel de celulosa humedecido con solución de hibridación para crear una atmósfera húmeda. La reacción de hibridación se realiza dejando esta cámara de hibridación con el portaobjetos incubando durante 1,5 horas en un horno de 46°C en completa oscuridad (Moreno *et al.* 2001).

Tras este tiempo de hibridación el portaobjetos es lavado con solución de lavado con un porcentaje de concentración de NaCl correspondiente al de la solución de hibridación antes empelada, en este caso 40% (Anejo B.3). La solución de lavado debe ser previamente atemperada a 48°C en un baño de agua. El proceso de lavado se realiza vertiendo primera una pequeña cantidad de solución de lavado sobre el portaobjetos, dejando que el líquido caiga arrastrando así la solución de hibridación que pudiese contener aun. Posteriormente, con el objetivo de eliminar los restos de sonda que no se hubieran unido al rRNA de la muestra, el portaobjetos es sumergido por completo en el volumen restante de solución de lavado, contenido en un tubo de 50 ml. Este proceso de lavado debe durar no menos de 15 minutos, manteniéndose en todo momento la temperatura de 48°C en el baño de agua en oscuridad.

Finalmente el portaobjetos puede ser retirado de la cámara de hibridación y lavado con agua destilada. Tras ser secado completamente en estufa o al aire libre, pero siempre en oscuridad, el portaobjetos puede ser conservado en congelador (-20°C) a completa oscuridad.

Para proceder con la observación, el portaobjetos es montado con FluoroGuard Antifade Reagent (Bio-Rad) para conservar la fluorescencia de la preparación (Anejo B.3), posteriormente cubierto por un cubreobjetos de cristal de 24x60 mm. La visualización es realizada mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías se realizaron con la cámara DP-10 de Olympus.

Para determinar las observaciones como positivas ha sido necesario identificar las bacterias bajo el influjo de los tres tipos de radiación mencionadas, con tal de obtener imágenes de las bacterias presentando fluorescencia tanto en color verde como en color rojo.

El control ha sido en todo caso utilizado como patrón a seguir a la hora de identificar como positiva una observación.

4.4. Sondas empleadas en el proceso de hibridación

Para la identificación de *H. pylori* se emplearon dos sondas distintas simultáneamente. La primera sonda es una combinación de tres sondas diferentes, complementarias a una región del rRNA 16S del dominio Eubacteria. Esta mezcla de sondas se utilizó como control positivo de la técnica de FISH, ya que hibrida con todas las bacterias que pueden estar presentes en la muestra (Amann *et al.*, 1995). La secuencia de cada una de las sondas EUB338 es:

EUB338-I: 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'

EUB338-II: 5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'

EUB338-III: 5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT-3'

Las sondas EUB338 fueron sintetizadas y marcadas por TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) con 5 (6)-carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimide éster (FLUOS), que emite en el espectro del verde (495 nm).

Como segunda sonda se empleó la denominada como HPY, diseñada por Moreno *et al.* (2001), con modificaciones LNA para aumentar la sensibilidad y la especificidad de unión de la hibridación (Kubota *et al.*, 2006). Esta es complementaria a una región específica del rRNA 16S de *H. pylori*. La secuencia de la sonda es la siguiente:

HPY-LNA: 5'-CTG GAG AGA C+TA AGC CC+T CC-3'

La sonda HPY-LNA fue sintetizada y marcada con CY3, que emite en el espectro del rojo (552-565 nm), por Exiqon (EE.UU.).

En la identificación de *L. pneumophila* se empleó como sonda específica la denominada LEGPNE1, su diseño está basado en un análisis comparativo (ARB Software Environment for sequence data) de aproximadamente 10.000 secuencias completas o casi completas de 16S rRNA, incluyéndose los miembros de la familia *Legionellaceae* y otras bacterias. La sonda LEGPNE1 (5'-ATC TGA CCG TCC CAG GTT-3') fue sintetizada con C&-TFA [6-(trifluoroacetyl-amino)-hexyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-di-isopropyl)-phosphoramidite] aminolinker en el final 5' (MWG Biotech). Esta sonda es complementaria a un dominio variable del 16S rRNA de *L. pneumophila*. Como sonda general ha sido empleada la denominada como LEG705, la cual permite identificar distintas especies de *Legionella* (Grimm *et al.*, 1998)

Aunque estudios realizados aconsejan el uso de 30% de formamida como máximo con tal de no sufrir un descenso en la intensidad de señal (Grimm *et al.*, 1998), en las hibridaciones realizadas en este trabajo se ha empleado un 40% con el fin de evitar interferencias de otras bacterias.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Procesado de las muestras y aislamiento de FLA en medio NNAP

Entre las muestras empleadas en este estudio había muestras de agua potable y muestras de agua residual depurada, estas segundas fueron procesadas en menor volumen ya que se espera que contengan mayor carga microbiana.

En las muestras procesadas fue medido el cloro total mediante espectrofotometría, estando los valores comprendidos entre 0,5 y 0,66 mg/L, siendo en concentraciones muy diluidas 1 mg/L = 1 ppm. Los valores obtenidos no distaron mucho del rango esperado de 0,1 a 0,3 mg/L (Baker, 2002; Watson, 2004), a excepción de dos datos anómalos aislados, obtenidos en la medición de las muestras de aguas residuales 0.3 y 5.3 posteriores al tratamiento de desinfección en las que se obtuvieron valores de 4,6 y 1,35 mg/L respectivamente.

El cloro total medido era mayor en las muestras tomadas en el efluente del tratamiento de desinfección de la EDAR que en las muestras tomadas antes de dicho tratamiento, la diferencia en la concentración de cloro total entre las muestras tomadas antes y después del tratamiento de desinfección era de entre 0,11 y 0,6 mg/L.

Como ya se ha mencionado anteriormente, estudios realizados acerca de la efectividad del hipoclorito sódico en la desinfección de *L. pneumophila* y *Acanthamoeba* han intentado demostrar que, en muestras de agua donde las amebas pueden contener *L. pneumophila* ha sido necesario realizar un tratamiento de entre 256 y 1024 ppm de hipoclorito sódico (NaOCl), la cual es una concentración mayor a la que había sido necesaria en muestras que contenían la bacteria sin la protección de la ameba como reservorio (512 ppm de NaOCl). Estas concentraciones son mayores que las mediciones de cloro obtenidas en las muestras procesadas.

Considerando esto y lo ya expuesto al respecto de cómo bacterias patógenas como *L. pneumophila* y FLA como *A. castellanii* pueden favorecerse mutuamente para resistir a los tratamientos de desinfección, se hace necesario considerar que deben aplicarse desinfectantes a concentraciones efectivas, no solo contra la bacteria, sino también contra la ameba que actúa como reservorio (García *et al.*, 2007).

Según esto las concentraciones establecidas por la legislación para el tratamiento de aguas potables, tratamientos terciarios en EDAR e incluso el tratamiento de hipercloración de sistemas de distribución de agua sanitaria (30 ppm) no es siempre suficiente para eliminar *L. pneumophila* y probablemente otros patógenos, como *H. pylori* y *L. pneumophila* que se encuentren protegidos en el interior de amebas.

Aunque para la concentración de las muestras no existe ningún protocolo estandarizado hay referencias bibliográficas en las que se utilizó la centrifugación (Bonilla-Lemus *et al.*, 2010); y otras en las que se utilizó la filtración (García *et al.*, 2013). En el laboratorio donde fue realizado el procesamiento de las muestras se realizaron previamente pruebas con 5 muestras de agua residual, tanto por centrifugación como por filtración, y se observó que el resultado respecto al aislamiento de amebas de vida libre (FLA) era el mismo para ambas técnicas. Se concluyó que ambos métodos eran efectivos para el aislamiento de FLA en aguas (Moreno, 2013).

Así pues, con tal de realizar el procesamiento de las muestras de una forma más rápida se decidió emplear la filtración. Los trofozoitos de *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris* miden 20-60 μm , 13-25 μm y 12-60 μm y sus quistes 11-30 μm , 8-20 μm y 6-30 μm respectivamente (Peralta y Ayala, 2009), así que para poder retener las amebas durante la filtración a la vez que se dejaba pasar el resto de carga orgánica se emplearon filtros con poros de 3 μm , diámetro de poro superior a los utilizados por otros autores: 0,2 μm (Corsaro *et al.*, 2010), 0,45 μm (Bonilla-Lemus *et al.*, 2010; Mahmoudi *et al.*, 2011) 0,7 μm

(García *et al.* 2013) ó 1,2 μm (Pernin *et al.*, 1998), los cuales daban como resultado un proceso de filtración extremadamente prolongado para un volumen de muestra tan alto.

En la tabla 3 se exponen los resultados de crecimiento de FLA a partir de las muestras procesadas:

Tabla 3. Resultado del crecimiento de FLA en todas las muestras procesadas

Muestra	Crecimiento de FLA	Tipo de agua
0.2	+	Residual
0.3	-	Residual
1.2	+	Residual
1.3	+	Residual
2.2	+	Residual
2.3	+	Residual
3.2	+	Residual
3.3	+	Residual
4.2	+	Residual
4.3	-	Residual
5.2	+	Residual
5.3	+	Residual
1	-	Residual
2	+	Residual
3	+	Residual
4	+	Residual
5	+	Residual
6	+	Residual
DW1	-	Potable
DW2	+	Potable
DW3	+	Potable
DW4	+	Potable
DW5	-	Potable
DW6	+	Potable

Tabla 4. Resultados del crecimiento de FLA en las muestras y porcentaje sobre el total

	Residuales y potables	Residuales	Potables
Muestras +	19 (79'16%)	15 (83'3%)	4 (66'6%)
Muestras -	5 (20'84%)	3 (16'7%)	2 (33'4%)
Total de muestras	24 (100%)	18 (100%)	6 (100%)

Tras el procesado de las muestras, y la posterior incubación sobre medio NNAP, las placas fueron examinadas al microscopio, se observó crecimiento de FLA en un 79'16% de las muestras procesadas. Concretamente un 83'3% de las muestras de agua residual y un 66'6% de las muestras de agua potable (Tabla 4).

Se analizaron 12 muestras de EDAR emparejadas, tomadas en 6 muestreos diferentes, con la finalidad de evaluar el proceso de desinfección con UV y cloración en las aguas residuales. Cada muestreo incluía una muestra procedente de un punto situado antes de la entrada al tratamiento terciario y otra de un punto situado después del mismo tratamiento (muestras 0.2 a 5.3).

Tabla 5. Resultado del crecimiento de FLA en las 12 muestras de EDAR procedentes de los 6 muestreos en los que se evaluó el tratamiento terciario de desinfección

Muestra	Crecimiento de FLA	Tipo de agua
0.2	+	Residual entrada 3º
0.3	-	Residual salida 3º
1.2	+	Residual entrada 3º
1.3	+	Residual salida 3º
2.2	+	Residual entrada 3º
2.3	+	Residual salida 3º
3.2	+	Residual entrada 3º
3.3	+	Residual salida 3º
4.2	+	Residual entrada 3º
4.3	-	Residual salida 3º
5.2	+	Residual entrada 3º
5.3	+	Residual salida 3º

De estos 6 muestreos, 4 fueron positivos para la presencia de FLA tanto a la entrada como a la salida del tratamiento de desinfección, lo que indica que dicho tratamiento no fue efectivo, al menos para la presencia de amebas de vida libre. En 2 muestreos se dio negativo en la muestra correspondiente a la salida del tratamiento terciario de desinfección. Ningún muestreo fue negativo en la entrada de tratamiento de desinfección y positivos a la salida de éste.

De los casos en los que el resultado ha sido positivo a la entrada del tratamiento de desinfección pero negativo en su salida se deduce que el tratamiento de desinfección fue efectivo para la eliminación de FLA. En caso de haber tenido un resultado opuesto, con positivo a la salida pero negativo en la entrada, podría deducirse que algún elemento del tratamiento terciario estuviese contaminado con FLA.

Según estos resultados la eliminación de FLA llevada por el tratamiento de desinfección no es totalmente eficaz. Como ya se ha comentado en la introducción, los quistes de algunas FLA pueden resistir una concentración de hipoclorito sódico de más de 150ppm, con lo cual resistirían sin ningún problema los rangos de concentraciones utilizados en los tratamientos de desinfección de aguas (0.3- 0.9 ppm). En cuanto al tratamiento con UV también se ha mencionado en la introducción que es más efectivo que el hipoclorito y por tanto la combinación de ambos es más eficaz que por separado. Las dosis de UV deberían ser superior a las habituales para la eliminación de bacterias (*E. coli*) ya que la composición de la pared del quiste le da opacidad impidiendo que la luz UV dañe su DNA. El inconveniente de este sistema es que los sistemas de tratamiento con UV necesitan un mantenimiento de las lámparas para ser debidamente eficaces, y muchos casos estas lámparas están en contacto con el exterior de la instalación (Beltrán y Jiménez, 2008).

García *et al.* (2011) realizaron estudios similares en España, en los cuales se detectó una tasa de aislamiento de FLA en aguas residuales del 100 % en muestras con y sin tratamiento de desinfección, aun teniendo en cuenta dicho estudio y los resultados aquí obtenidos, es necesario realizar esta comprobación en base a una batería de muestras más amplia, con la cual poder obtener un resultado más sólido mediante análisis estadístico.

En cuanto al crecimiento de FLA visto en las muestras de aguas residuales comparado frente al observado en las muestras de aguas potables, puede observarse en la tabla 4 como el porcentaje de positivos es mayor en el caso de las aguas residuales. Esto puede deberse a que los tratamientos de desinfección para aguas potables realizados en las ETAP tienen mayor eficacia de eliminación de FLA que aquellos tratamientos destinados a tratar aguas residuales en las EDAR. No obstante, no es posible llegar a esta afirmación con los datos aquí presentados, siendo necesaria una cantidad mayor de resultados para poder obtener una conclusión basada en un estudio estadístico consistente.

2. Identificación de las FLA

La identificación de las distintas especies de amebas se realizó siguiendo las observaciones, ilustraciones e imágenes indicadas en estudios previos. (Fernández, 2015; Castrillón *et al.* 2013), siendo posible garantizar la identificación de *Acanthamoeba castellanii* gracias a su característica forma poligonal y estrellada en su forma de quiste (Castrillón y Orozco, 2013).

No obstante, la identificación de las distintas especies de FLA mediante la observación bajo microscopía de contraste de fases no es un método suficientemente preciso y puede estar sometido al error debido a la subjetividad del observador, ya que la morfología de las amebas es cambiante, su estructura y apariencia externa puede estar condicionada por el estrés sometido durante la preparación de la muestras en el portaobjetos, lo cual facilita que las amebas tengan mayor tendencia a adoptar su forma de quiste siendo así más difícil la diferenciación entre especies.

Además, y considerando que hay muchas especies de FLA que son muy similares morfológicamente, al ser observadas con microscopio de contraste de fases estas amebas no pueden identificarse inequívocamente a nivel de género, debido además a su cambiante morfología (figura 5). Otras técnicas, como la identificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) resultan más apropiadas para dicha identificación.

Existen estudios que han identificado especies de FLA en muestras de aguas residuales y aguas potables (Moreno, 2013). Otras técnicas, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permiten realizar una identificación más precisa de las especies de amebas contenidas en las muestras de aguas.

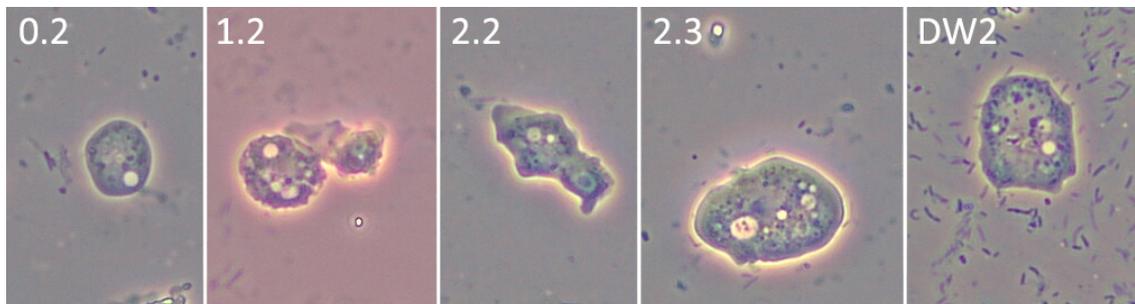


Figura 5. Trofozoitos de FLA observados en las muestras con microscopio de contraste de fases a 60x

La identificación realizada en este trabajo mediante el uso de microscopio de contraste de fases ha permitido identificar satisfactoriamente la especie *Acanthamoeba castellanii*, además de otras FLA pertenecientes a *Acanthamoeba* spp. (Tabla 6). A diferencia de otras FLA, la identificación de *A. castellanii* sí que pudo realizarse mediante observación bajo microscopía de contraste de fases, ya que su forma en trofozoito presenta unas características prolongaciones algo afiladas, y su quiste a diferencia del resto de amebas del género *Acanthamoeba* que adopta formas triangulares o cuadradas, tiene forma poligonal más compleja, tendiendo a una forma estrellada y un diámetro mayor es de 21 a 45 μm (Castrillón y Orozco, 2013).

Entre el resto de FLA observadas se han podido identificar, aunque no de forma inequívoca y dentro de las limitaciones que presenta la microscopía de contraste de fases, géneros distintos tales como las antes mencionadas *Balamuthia* y *Naegleria* (Tabla 6), tomando como referencia las características estructurales y tamaños definidos por otros estudios (Muñoz *et al.*, 2003; Chávez-Munguía *et al.*, 2009; Fernández M, 2015) La identificación de estos géneros no se puede garantizar inequívocamente con los métodos empleados en este trabajo de investigación, pero el hecho de identificar géneros de FLA como *Acanthamoeba* y *Naegleria* es algo común en aguas residuales (Loret y Greub, 2010). Aun así la identificación de FLA del género *Naegleria* no se ha podido validar, ya que en aguas residuales es común encontrar amebas con características muy similares.

En el caso de las muestras 4.2, 3 y 4, ha sido posible identificar lo que parecen ser quistes de la FLA *Vermamoeba vermiformis*, anteriormente conocida como *Hartmannella*, por su característica forma de girar sobre sí misma bajo condiciones de estrés. La presencia de esta ameba es frecuente en aguas residuales (Fouque *et al.*, 2014), en este trabajo se ha podido identificar en las muestras de aguas residuales 4.2, 3 y 4 y en la muestra de agua potable DW5 (figura 6).

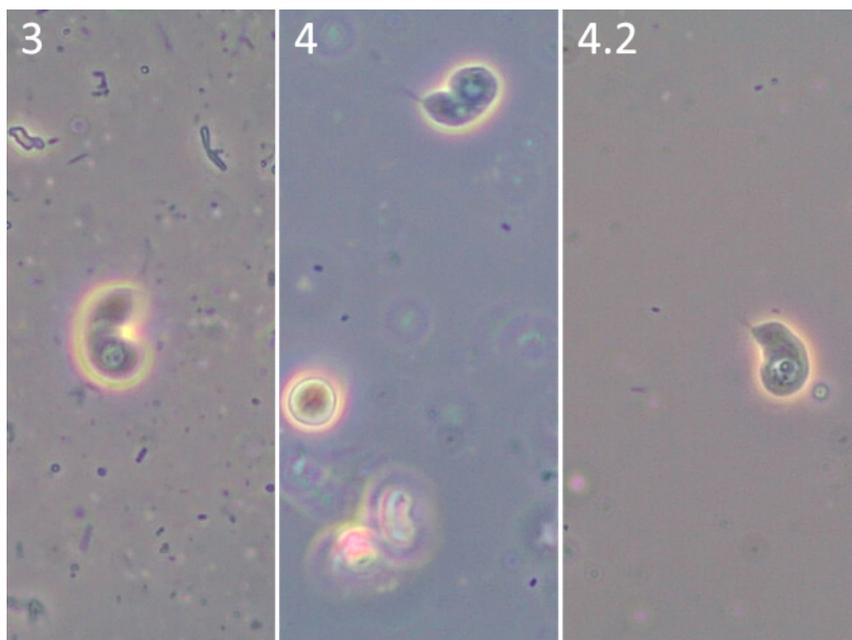


Figura 6. . Trofozoítos de *Vermamoeba vermiformis* observados a 60x

Tabla 6. Muestras en las que se han identificado especies de FLA

	Muestras				
<i>Acanthamoeba</i> spp.	0.2	1.2	3.2	4.2	DW3
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	0.2	4.2			DW3
<i>Balamuthia</i> spp.		2.3*		4.2*	
<i>Naegleria</i> spp.					DW6*
<i>Vermamoeba Vermiformis</i>		4.2	3	4	

*La identificación mediante microscopia de contraste de fases no puede ser validada con los métodos empleados, debido a la gran similitud de estas FLA con otros géneros.

Teniendo en cuenta que para poder obtener una información sostenible al respecto de esto sería necesario analizar una batería de muestras mucho más amplia, los resultados expuestos en la tabla 6, basados en las identificaciones realizadas en tan solo pocas muestras, indican que *Acanthamoeba* spp. está presente entre las muestras procesadas, concretamente en las que provienen del muestreo realizado antes del tratamiento de desinfección de la EDAR (0.2, 1.2 y 4.2). Este resultado está acorde con de otros autores, que determinaron la presencia de este género en este tipo de agua (García et al, 2007).

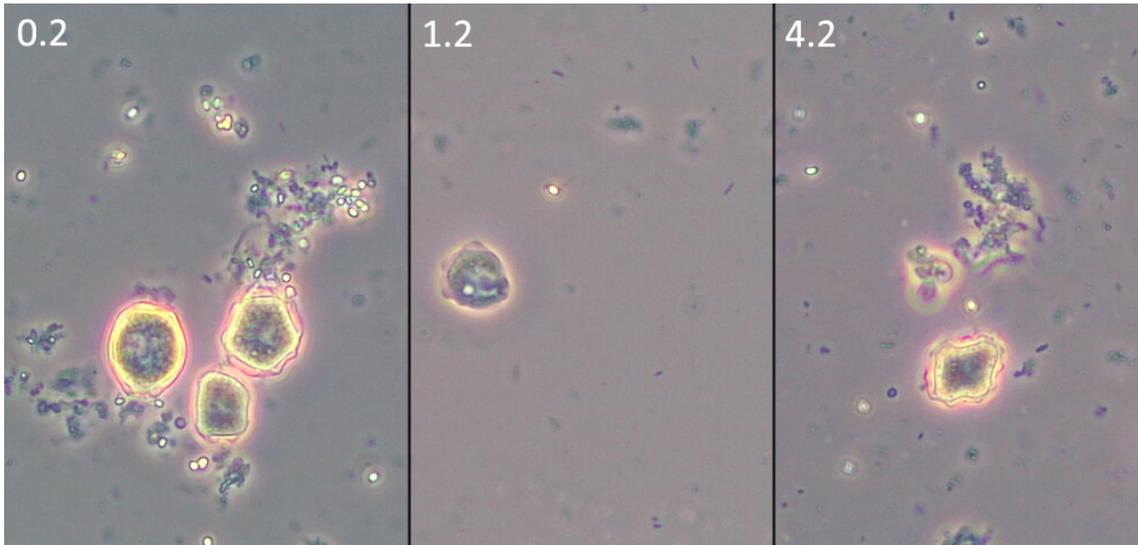


Figura 7. Quistes de *Acanthamoeba* spp. observados a 60x

Por su característica forma de quiste con estructura interna poligonal y estrellada, *Acanthamoeba* spp. ha podido ser identificada en dos de las muestras de aguas de entrada al tratamiento de desinfección 0.2 y 4.2; y en la muestra de agua potable DW3 y DW4; (figuras 7 y 8). También se ha observado la forma de trofozoíto en la muestra DW3 (figura 9).

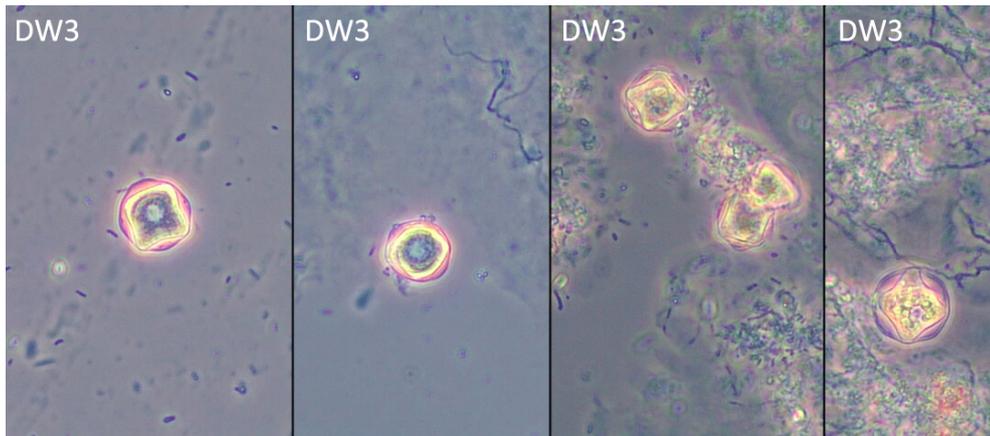


Figura 8. Quistes de *Acanthamoeba* spp. observados a 60x

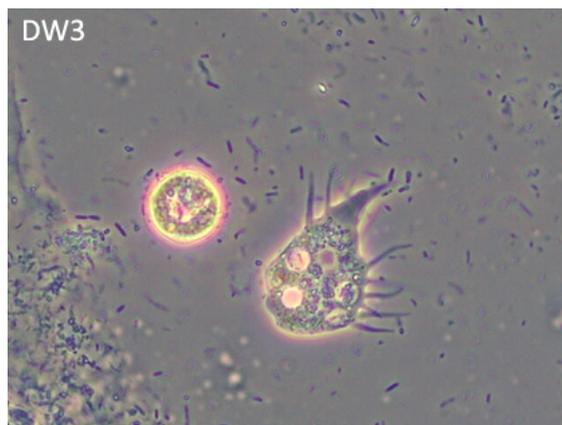


Figura 9. Trofozoito de *Acanthamoeba spp.* observado a 60x

Balamuthia spp. ha podido identificarse solamente en una de las muestras tomadas antes del tratamiento de desinfección (4.2) y en una de las muestras tomadas después de dicho tratamiento (2.3) Aun así la identificación de esta FLA no puede ser garantizada con la simple observación en microscopio de contraste de fases, ya que su forma en trofozoito puede ser muy similar a la de otras FLA. En las muestras mencionadas se ha podido observar lo que parece ser un quiste de *B. mandrillaris* (Figura 10), compuesto por una posible triple capa externa (Fernández, 2015).

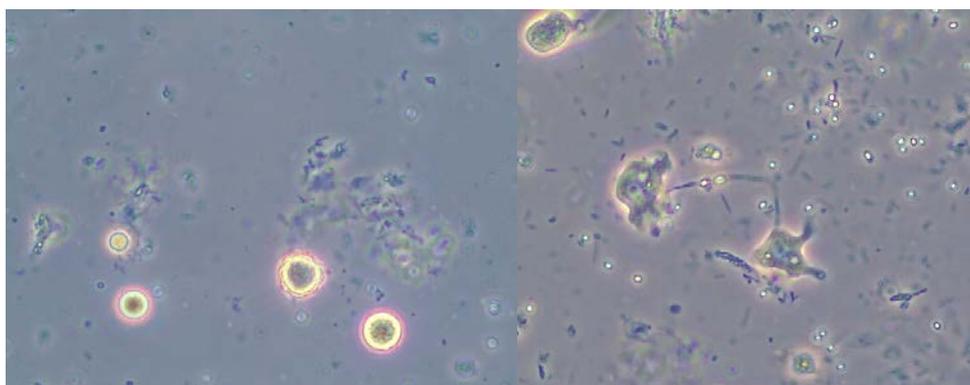


Figura 10. Quistes y trofozoitos de *Balamuthia mandrillaris* a 60x

Por lo general las FLA, que han podido ser identificadas mediante observación morfológica, pertenecen a muestras tomadas antes del tratamiento de desinfección, pero en las muestras del efluente del tratamiento terciario también se ha observado crecimiento de FLA, si esta conclusión fuera apoyada por resultados más firmes basados en el estudio de un gran número de muestras podría decirse que el tratamiento de desinfección no resulta eficaz para la eliminación de FLA. Pero la identificación aquí realizada está basada en una observación con microscopio de contraste de fases, lo cual no permite realizarla de forma inequívoca. Además han sido observadas numerosas FLA en muestras tomadas después del tratamiento de desinfección y en aguas potables que no han podido ser identificadas, por lo que no existe garantía de que dichas amebas no sean de especies patógenas y además puedan tener la ya mencionada función de ser reservorio de bacterias patógenas.

Al formar este trabajo parte de un proyecto de investigación más amplio, los resultados de identificación morfológica han sido confirmados paralelamente en otro trabajo del grupo de investigación, mediante PCR múltiple. En este trabajo, se han identificado en las aguas potable analizadas mediante PCR, *Acanthamoeba* spp. y *Vermamoeba vermiformis* y en las aguas residuales *Acanthamoeba* y amebas de las familia *Vahlkampfiidae* dentro de la cual se encuentra *Naegleria* (Figura 11).

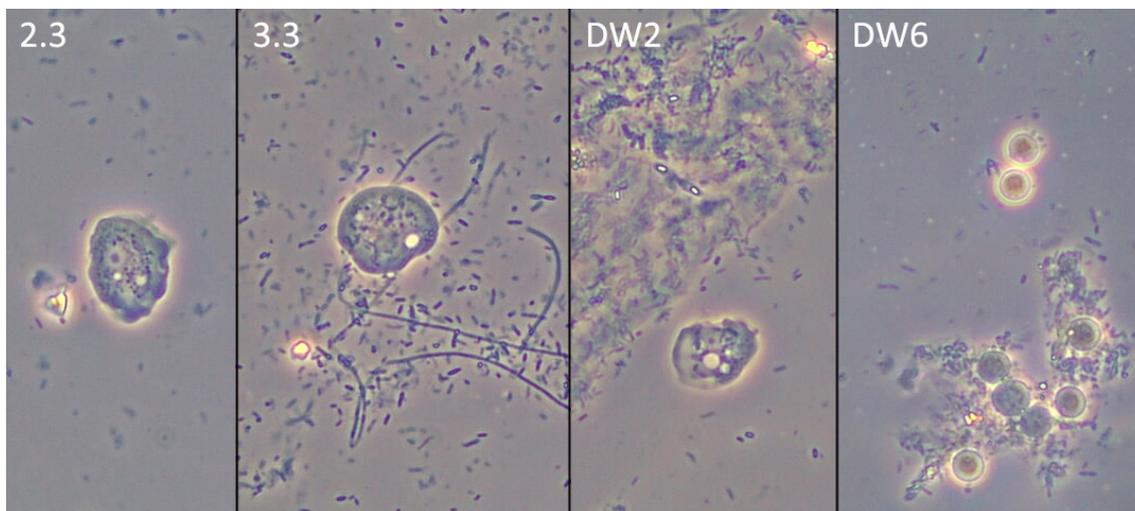


Figura 11. Trofozoítos de FLA observados a 60x

3. Identificación de patógenos procedentes de las FLA, después del tratamiento con hipoclorito sódico

Con tal de poder analizar concretamente las bacterias ubicadas en el interior de las FLA se realizó un tratamiento con hipoclorito sódico para eliminar los organismos que no se encontrasen bajo la protección de estas amebas.

Para tener la certeza de que las bacterias externas a las FLA morían, la concentración de hipoclorito sódico empleada fue muy superior a la ensayada anteriormente por Moreno *et al*, 2007. Según Loret y Greub, 2010, los quistes de *Acanthamoeba* pueden resistir a concentraciones de varios cientos de mg-min/mL de cloro como ya se ha mencionado anteriormente.

Las muestras que presentaron crecimiento de FLA fueron tratadas con hipoclorito sódico a una concentración de 105 ppm, desde las cuales se recogió una cantidad, una vez eliminado el mismo, para ser cultivada en nuevos medios apropiados para favorecer el crecimiento de las especies *H. pylori* y *L. pneumophila*. Para el cultivo de *H. pylori* se utilizó el medio DENT Agar Sangre suplementado con piruvato (ASP, Anejo A.1.) ya que favorece el crecimiento de esta bacteria (Jiang y Doyle, 2000). De la misma forma se empleó el medio BCYE (OXOID) para *L. pneumophila*.

Tras diferentes periodos de incubación de estas placas a 37°C, se observó en cuales se había dado crecimiento de colonias características de cada uno de los patógenos, los resultados se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Muestras que han dado crecimiento de colonias de *H. pylori* y *L. pneumophila*

	Crecim. <i>H. pylori</i>	Crecim. <i>L. pneumophila</i>
Muestras	3.2	2.2
	3.3	2.3
	4.2	3.2
	5.3	5.2
		5.3
		DW3

El crecimiento de colonias ha sido ligeramente mayor en las muestras de entrada al tratamiento terciario, posiblemente debido a que la carga bacteriana de estas muestras sea mayor, de la misma manera solo se ha obtenido crecimiento de colonias en una de las muestras de agua potable, siendo el resto muestras de agua residual. Aun así sería necesario apoyar esta conclusión en más datos para obtener un estudio estadístico sólido.

Las colonias fueron posteriormente preparadas para su identificación mediante técnica FISH. Tras la identificación resultaron positivas para *H. pylori* las colonias de 3.2, 3.3, 4.2 y 5.3 y para *L. pneumophila* las 3.2, 5.2, 5.3 y DW3. Este resultado significa que estos patógenos procedentes del interior de amebas tienen capacidad replicativa y por tanto son infectivos en caso de alcanzar al hombre utilizando como vector estas amebas. En el caso de *H. pylori*, como se ha comentado en la introducción, esta bacteria se encuentra en el agua normalmente en estado no cultivable por tanto el pase por las amebas parece que mejora su estado fisiológico y por tanto capacidad invasiva. Este fenómeno ya ha sido estudiado en *L. pneumophila*, donde su capacidad infectiva solo se activa cuando proviene del interior de amebas (Kilvington y Price, 1990; Steinert *et al.*, 1997; 1998; 2002; Kim *et al.*, 2002).

3.1. Detección de *H. pylori* y *L. pneumophila* en FLA mediante DVC-FISH

Las preparaciones de FISH de las muestras tratadas con la técnica DVC-FISH fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia, con el objetivo de inmersión APO 100x.

El propósito de esta observación consistió en detectar la presencia de *L. pneumophila* y de *H. pylori*, con morfología tanto cocoide como helicoidal, fuera y dentro de *A. castellanii*, y poder diferenciar formas viables más elongadas y o más engrosadas.

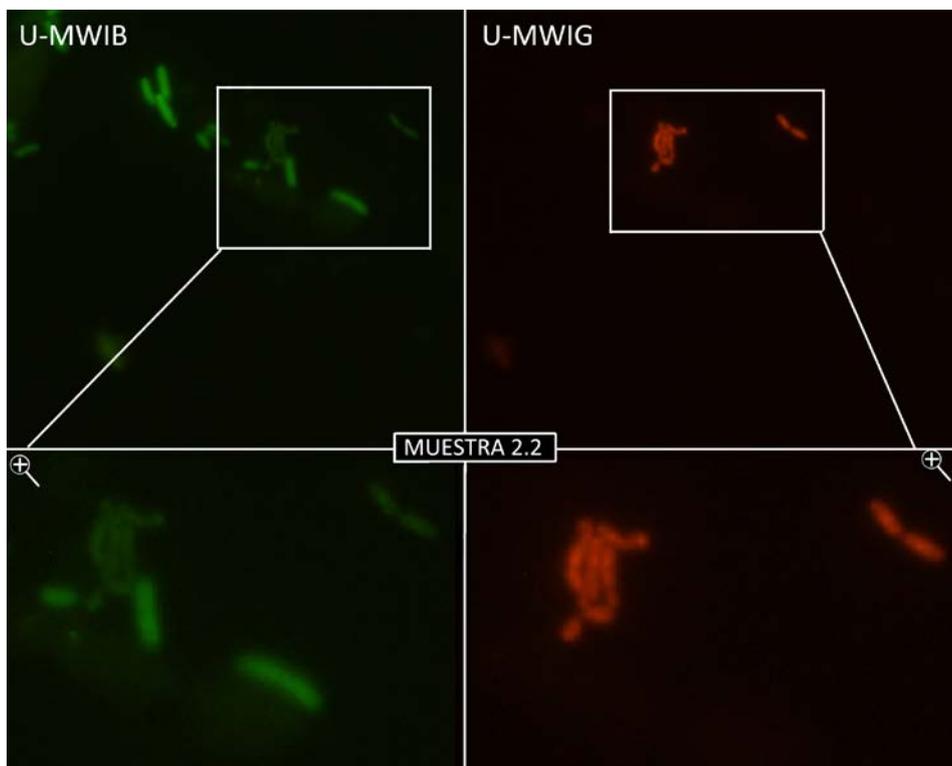


Figura 12. Hibridación específica de *H. pylori* con las sondas EUB en verde y HPY en rojo

Puede observarse en la figura 12 como bajo la radiación U-MWIB, vista en color verde, la sonda EUB-Mix empleada hace que no solo *H. pylori* muestre fluorescencia, sino también otras bacterias a su alrededor. En cambio la observación con U-MWIG, vista en color rojo, permite que la sonda HPY haga resaltar en fluorescencia solo a la bacteria *H. pylori*, permitiendo así su correcta identificación.

Para tener la garantía de que la identificación era inequívoca, se realizó paralelamente en cada portaobjetos de FISH la observación del pocillo con control de *H. pylori*. Esto permite comparar las bacterias del control con las bacterias de la muestra, con tal de poder tener la certeza de que son *H. pylori*.

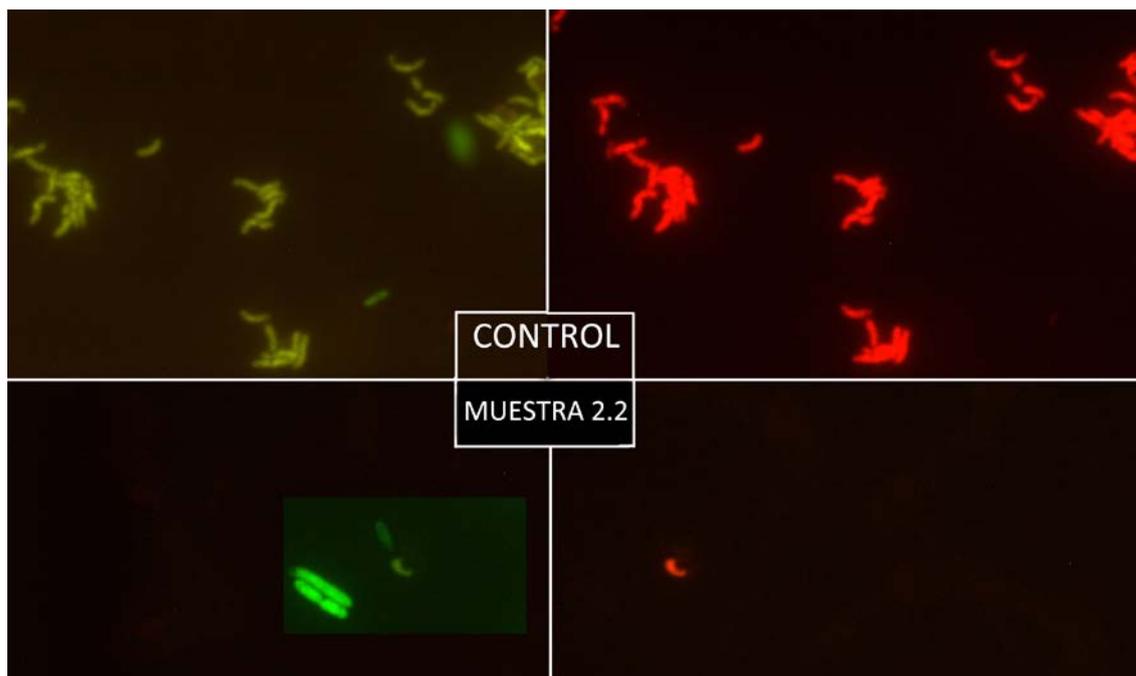


Figura 13. Comparación realizada entre un control de *H. pylori* y las bacterias observadas

El proceso de fijación realizado durante la preparación de los portaobjetos y la gelatina aplicada en el espacio entre pocillos garantizan que en ningún momento las bacterias situadas en el pocillo de control contaminen otros pocillos con muestras de aguas. Aun así para mayor precaución los pocillos colindantes al pocillo control no contenían nunca muestra, estaban vacíos.

En el análisis mediante FISH se pudo observar la presencia de estas bacterias tanto fuera como dentro de lo que parece ser la estructura de las FLA. Aunque algunos autores defienden que la detección mediante FISH puede estar directamente relacionada con la viabilidad de la bacteria (Winięcka-Krusnell *et al.*, 2002). Mediante la técnica FISH no es posible demostrar que *H. pylori* sea viable después del tratamiento con hipoclorito sódico.

Por ello en este trabajo se empleó la combinación del método DVC-FISH para la detección e identificación de células viables de *H. pylori* y *L. pneumophila* que fueran excretadas por *A. castellanii* hacia su exterior, tal y como dicen otros estudios, en los que las FLA excretan las bacterias endógenas cada 2 ó 4 horas (Smith *et al.*, 2012) tras la ingestión. Para asegurar que no hubieran bacterias viables fuera de la ameba en la muestra, como ya se ha comentado anteriormente, se sometió la muestra a un tratamiento de desinfección con una concentración a la cual este patógeno fuera sensible, ya comprobado en estudios anteriores (Moreno *et al.*, 2007), lo cual ha vuelto a ser comprobado en este trabajo. En la observación de las muestras sometidas a la técnica DVC-FISH se apreció la presencia de algunas bacterias elongadas y con mayor intensidad de fluorescencia, lo cual implica que pueden encontrarse en estado viable.

Esto demuestra la capacidad de estas bacterias patógenas de sobrevivir tanto a cortos periodos de cloración (Moreno *et al.*, 2007), como a periodos más largos bajo la protección de FLA, como por ejemplo el tratamiento con hipoclorito sódico de 1 hora realizado en estos ensayos.

La presencia de *H. pylori* en agua residual muestreada antes y después del tratamiento de desinfección de una EDAR y en aguas potables (Al-Sulami *et al.*, 2012) ha sido demostrada previamente por otros autores (Moreno y Ferrús, 2012). La detección de esta bacteria tras los tratamientos de desinfección habituales, a los que teóricamente es sensible, ha dado lugar a otros estudios en los que se hipotetiza que las amebas podían ser hospedadoras de *H. pylori* y ofrecerle protección frente a condiciones adversas (Thomas *et al.*, 2010).

La presencia de *L. pneumophila* en aguas también ha sido estudiada, y su detección ha podido realizarse mediante la técnica PCR (Cirillo *et al.*, 1999; Moreno 2002) y por cultivo en placa (Feeley *et al.*, 1979).

Fueron observadas la totalidad de las muestras en las que se habían encontrado FLA, estando incluidas además, en las observaciones de *H. pylori*, las muestras de amebas incubadas en nuevas placas de medio NNAP nombradas como “ muestra ‘ ”, en las que se quiso observar si *H. pylori* prevalecía a lo largo del tiempo en las amebas. Los resultados muestran que este patógeno prevalece en las FLA hasta 10 días después de su aislamiento.

En la tabla expuesta a continuación se expresan los resultados obtenidos de la observación mediante microscopía de fluorescencia de los portaobjetos empleados en la técnica DVC-FISH.

Tabla 8. Resultados de las observaciones realizadas mediante FISH para la identificación de *H. pylori* y *L. pneumophila* en las muestras que presentaban presencia de FLA

Muestra	<i>H. pylori</i>	<i>L. pneumophila</i>	Muestras '	<i>H. pylori</i>
0.2		+	0.2 '	
1.2		+	1.2 '	+
1.3		+	1.3 '	
2.2	+	+	2.2 '	
2.3	+		2.3 '	+
3.2			3.2 '	+
3.3	+	+	3.3 '	+
4.2			4.2 '	
4.3			4.3 '	
5.2		+	5.2 '	+
5.3		+	5.3 '	+
2		+	2 '	
3	+	+	3 '	+
4		+	4 '	
5	+	+	5 '	
6		+	6 '	+
DW2	+	+	DW2 '	+
DW3		+	DW3 '	
DW4	+		DW4 '	+
DW6	+		DW6 '	

Las muestras en las que se han podido identificar células de *H. pylori* en su forma viable, dentro de las limitaciones de esta técnica, han sido las correspondientes a aguas residuales 2.2, 2.3, 3.3, 3.2', y la muestra de agua potable DW6. En algunas muestras, tales como las correspondientes a aguas residuales 5.3', 3', y las de aguas potables DW2', DW4 y DW4' la identificación de células viables de *H. pylori* no ha podido ser completamente determinada, ya que su forma no era del todo helicoidal.

3.2. Identificación de *H. pylori* por cultivo

La identificación de células de *H. pylori* viables procedentes de FLA también ha sido posible mediante la identificación con FISH del cultivo de las placas en las que se obtuvo crecimiento de colonias características de *H. pylori*.

Las muestras 3.2 y 4.2 de agua residual tomadas antes del tratamiento de desinfección de la EDAR, y la muestra 3.3 posterior a dicho tratamiento, dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de *H. pylori* cultivable, y por lo tanto viables, del interior de las amebas.

Durante la observación de las muestras pudieron encontrarse células de *H. pylori* en forma cocoide (figura 14) y helicoidal y elongada (figura 15).

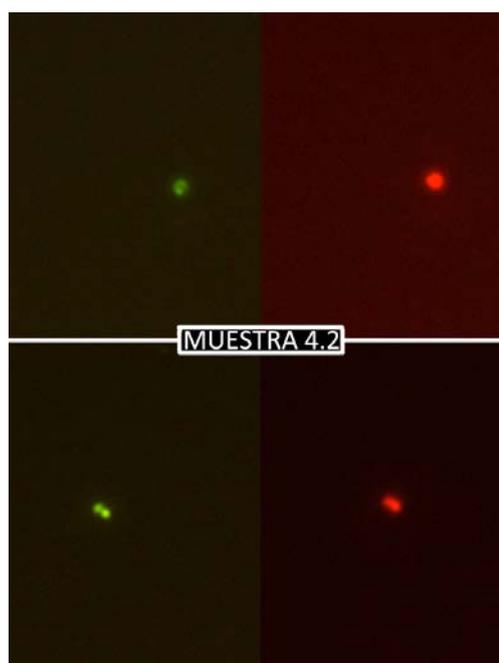


Figura 14. *H. pylori* en forma cocoide tras el análisis FISH

Aunque al observar la forma cocoidal bajo la radiación U-MWIB y la sonda EUB-Mix en color verde puede confundirse *H. pylori* con otras bacterias o estructuras que puedan estar emitiendo fluorescencia, la observación con U-MWIG y sonda HPY permiten asegurar que la bacteria observada es *H. pylori*.

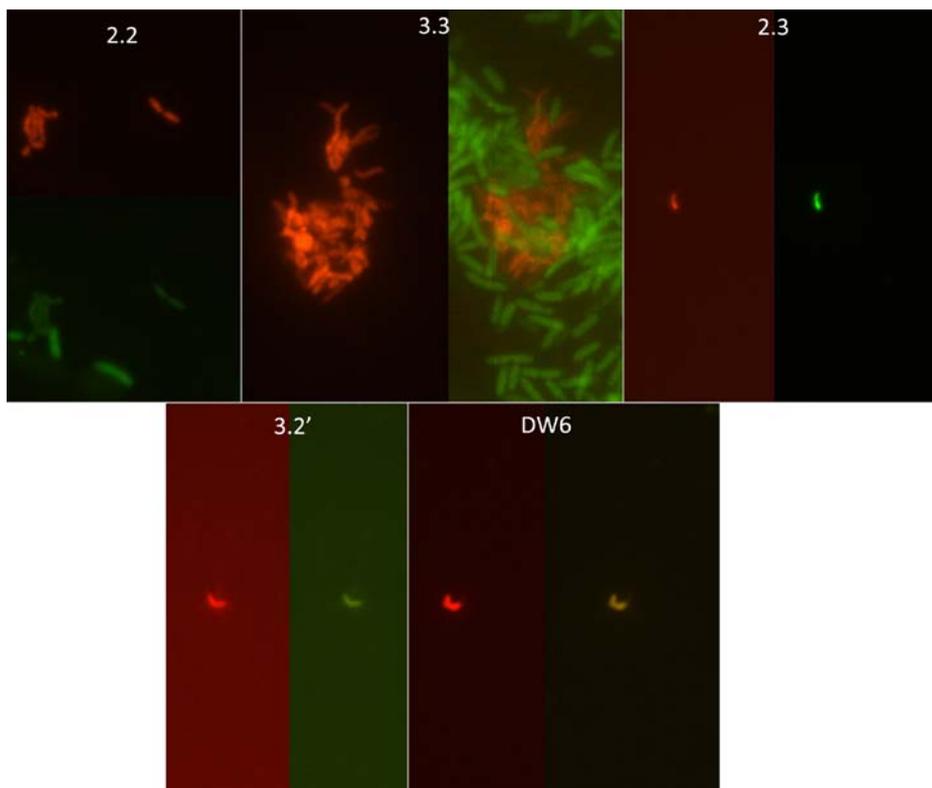


Figura 15. *H. pylori* en forma bacilar

El hecho de que no se hayan obtenido más resultados positivos para el crecimiento de *H. pylori* procedente del interior de FLA en placa sugiere que este adquiere la forma de viable no cultivable (VBNC), ya que por otros estudios ha sido demostrado la viabilidad de la bacteria tras soportar condiciones desfavorables durante un largo periodo de tiempo y superar el tratamiento de desinfección por estar protegido por FLA (Moreno, 2013). La detección de formas viables no cultivables de *H. pylori* no implica que éstas sean formas infectivas. Aunque potencialmente lo sean, sería necesario realizar estudios de infección *in vivo* para comprobarlo.

Las muestras 3.2 y 4.2 de agua residual tomadas antes del tratamiento de desinfección de la EDAR, y la muestra 3.3 posterior a dicho tratamiento, dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de *H. pylori* cultivables, y por lo tanto viables, del interior de las amebas.

Estos tres resultados positivos no son suficientes como para obtener una conclusión inequívoca, pero indican que los tratamientos de desinfección empleados en las EDAR no son suficientemente eficaces en la eliminación de *H. pylori* cuando éste está protegido por FLA, permitiendo que esta bacteria esté presente en el agua efluente tanto en su forma cocoide como en su forma viable. Otros autores como Codony *et al.* (2012) evidencian que las amebas pueden promover la resistencia de esta bacteria a los tratamientos de desinfección realizados en las aguas, tanto residuales como potables.

La bacteria *H. pylori* ha sido también identificada en su forma viable, mediante observación en microscopía de fluorescencia y técnica FISH, en muestras de agua potable, lo cual indica que el riesgo para la salud pública puede ser aún mayor.

Según los resultados expuestos anteriormente, las FLA pueden ser un reservorio de *H. pylori* de acuerdo con Codony *et al.*, 2012; y evidencian que las amebas pueden promover la resistencia de esta bacteria a los tratamientos de desinfección realizados en las aguas, tanto residuales como potables.

La presencia de resultados positivos para la técnica combinada DVC-FISH en aguas potables y residuales es una evidencia de que las bacterias patógenas estudiadas no sólo son capaces de introducirse en el interior de FLA y conseguir evadir los mecanismos de fagocitosis de las mismas sino que, además, pueden de sobrevivir largos periodos de tiempo en aerobiosis en un medio de cultivo desfavorable y posiblemente continuar siendo viables posteriormente.

Pese al tratamiento de desinfección realizado sobre las muestras con hipoclorito sódico, en numerosas ocasiones se observaron bacterias distintas a *H. pylori* y *L. pneumophila* tras la incubación DVC (Figura 16). Esta presencia de bacterias en exceso era mayor en las aguas residuales que en las aguas potables.

En la siguiente figura se expone un ejemplo de como el exceso de bacterias en el pocillo del portaobjetos, puede dificultar la identificación de las bacterias patógenas. En este caso fue necesario utilizar en el microscopio de fluorescencia la radiación combinada U-MWB con tal de poder visualizar y diferenciar bacterias de *H. pylori* entre otras bacterias que abundaban en la misma zona del campo de visión.

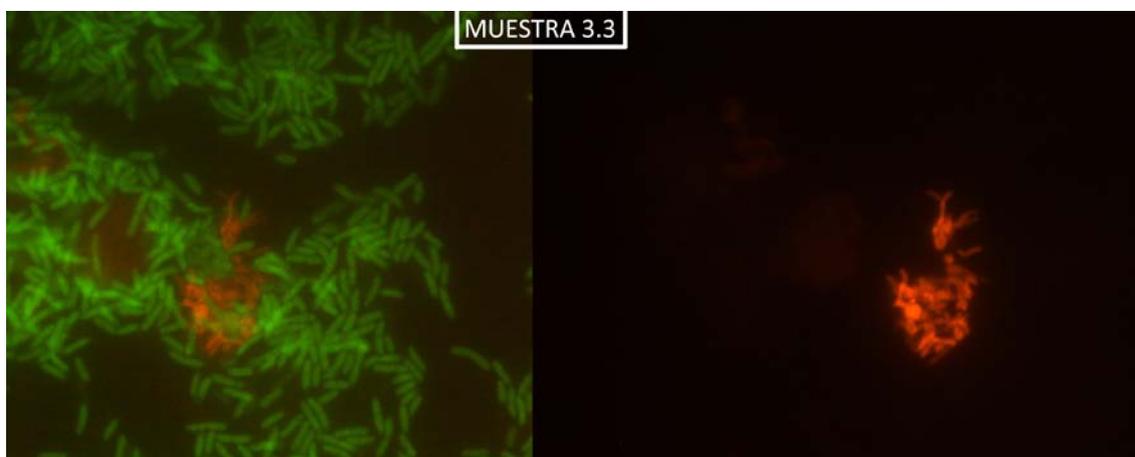


Figura 16. Ejemplo de como la observación puede estar dificultada por el exceso de bacterias

Esto puede ser debido a que estas bacterias estuvieron en el interior de las FLA durante el tratamiento de desinfección y fueron excretadas posteriormente tal y como sugieren otros estudios (Smith *et al.*, 2012), o a que dichas bacterias sean resistentes a la desinfección a la concentración empleada.

3.3. Identificación de *L. pneumophila* por cultivo

Se realizó el mismo análisis mediante FISH para identificar *L. pneumophila*, donde se pudieron observar gran cantidad de estas bacterias, junto con otras del género *Legionella*. En las imágenes siguientes (Figura 17) puede observarse el aspecto que tiene *L. pneumophila* en el control utilizado, el cual coincide con el de las bacterias visualizadas en las muestras.

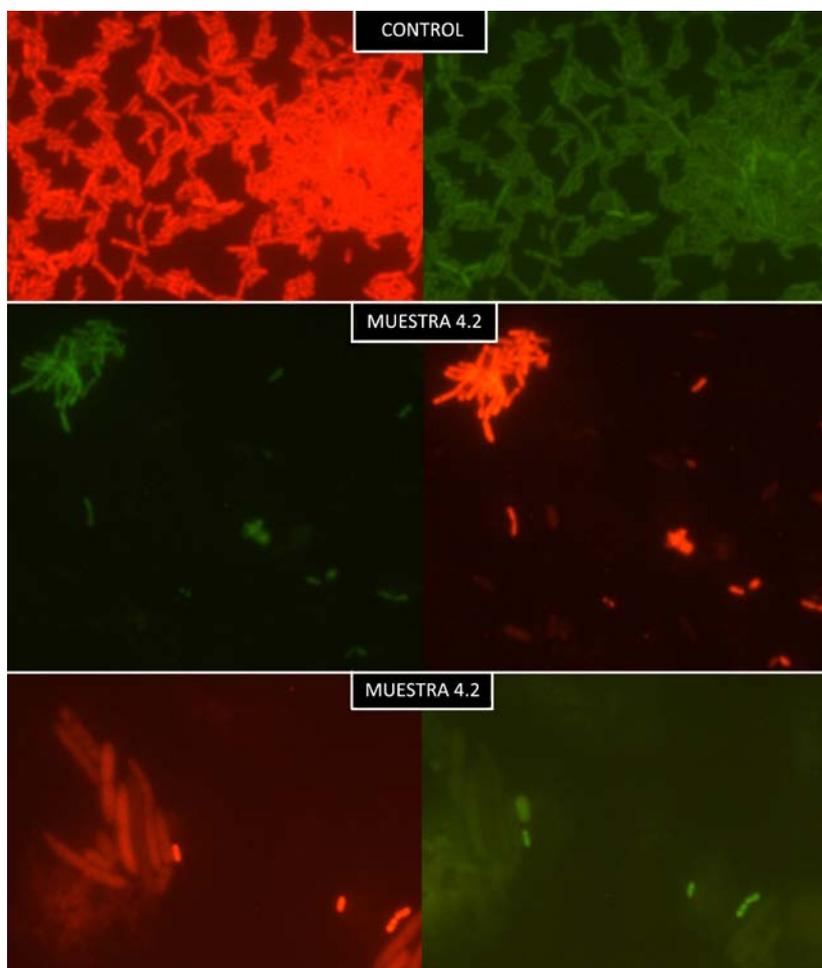


Figura 17. Hibridación específica de *Legionella* con las sondas LEG705 en verde y LEGPNE1 en rojo

Como puede verse en la tabla 5, expuesta anteriormente en el apartado 1 de resultados y discusión, las observaciones realizadas mediante técnica FISH han dado resultados positivos en 14 de las 18 muestras estudiadas que tenían presencia de FLA, es decir el 77,7 %. La presencia de *L. pneumophila* se dio tanto en las muestras de agua residual como potable, y también en las muestras tomadas antes y después del tratamiento terciario de desinfección de la EDAR. También se obtuvieron resultados positivos en la mayoría de colonias recogidas de los medios de cultivo específicos para el crecimiento de estas bacterias.

Como ya se ha indicado previamente, estos resultados necesitan apoyarse en un muestreo más amplio que permita realizar un estudio estadístico más sólido, pero según los resultados aquí obtenidos la presencia de *L. pneumophila* es muy abundante en las muestras estudiadas, lo cual indica que esta bacteria patógena no solo puede estar presente en aguas potables y residuales, sino que los tratamientos de desinfección empleados pueden no ser efectivos para

su correcta eliminación. Esto puede demostrar que las FLA cumplen con ese papel de reservorio y medio de protección para *L. pneumophila*.

Las observaciones realizadas mediante DVC-FISH han mostrado a la bacteria *L. pneumophila* viable, además se han cultivado en placas con medio específico lo cual indica que si la bacteria ha podido multiplicarse es porque existían bacterias viables.

Las muestras 3.2, 5.2 y 5.3 de agua residual, y la muestra DW3 de agua potable, dieron resultados positivos en la observación mediante FISH de *L. pneumophila* cultivables, y por lo tanto viables, del interior de las amebas (figura 18).

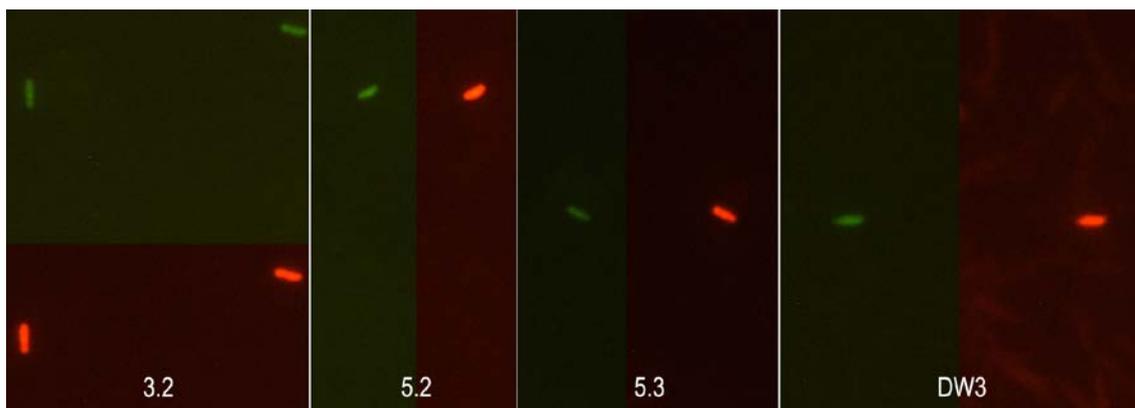


Figura 18. *L. pneumophila* a partir de las colonias

Estos resultados indican, dentro de las limitaciones antes mencionadas al respecto de las técnicas de cultivo y FISH, que *L. pneumophila* puede encontrarse en estado viable en aguas residuales y potables. Esto apoya la teoría de que las FLA realizan una función de reservorio y medio de protección para *L. pneumophila*, que además favorece el cambio de la bacteria a estado viable.

4. Consideraciones finales

Teniendo en consideración lo mencionado en los apartados anteriores, estos resultados apoyan a la teoría de que las amebas podrían ser unos buenos indicadores para señalar la presencia de microorganismos patógenos resistentes al proceso de digestión de las amebas (Codony *et al.*, 2012).

Aunque ha podido comprobarse que *H. pylori* se localiza en el interior de las amebas con pocos signos de degradación (Moreno, 2013), no es posible afirmar que *H. pylori* sea capaz de multiplicarse en el interior de la amebas, a diferencia de otros patógenos como *Legionella* y *Listeria*, al respecto de los cuales sí que se ha podido confirmar dicha teoría (Akya *et al.*, 2009).

Según estudios realizados se ha demostrado que *H. pylori* en cocultivo con *Acanthamoeba* spp. puede mantenerse viable durante 8 semanas (Winięcka *et al.*, 2002), lo cual defiende la idea de que las FLA ayudan a las bacterias patógenas en su supervivencia y resistencia ante tratamientos de desinfección. Para apoyar esto con un estudio estadístico sería necesario realizar nuevos ensayos más prolongados y comparar las distintas cuantificaciones de células de *H. pylori* viables antes y después de ser estas puestas en contacto con *Acanthamoeba*.

La presencia de FLA en los efluentes de aguas residuales y en aguas potables representa un riesgo para la salud humana. Las aguas residuales depuradas de la Comunidad Valenciana se

reutilizan para el riego de campos de cultivo, lo cual puede suponer que las FLA estén en los vegetales, como demuestran Vaerewijck *et al.*, 2011 y por lo tanto llegar a estar presentes entre los productos alimenticios a nivel doméstico.

Al riesgo que supone que las FLA tengan potencial patógeno intrínseco hay que añadir el la importante problemática relacionada con estas amebas al ser hospedadoras de posibles bacterias patógenas, protegiéndolas de los distintos tratamientos de desinfección, actuando como “caballo de Troya”, ya que estas bacterias sobreviven dentro de las FLA sin ser digeridas (Barker y Brown, 1994). La misma consideración debe aplicarse sobre los quistes de estas FLA, que pueden ser altamente resistentes al estrés físico y químico y protegen al microorganismo patógeno intracelular de condiciones ambientales adversas y tratamientos de desinfección que normalmente los matarían (Barker *et al.*, 1992).

Finalmente, y teniendo todo lo dicho anteriormente en consideración, es necesario mencionar que la calidad microbiológica de las aguas tratadas está todavía basada en la presencia de coliformes, mientras que la presencia de amebas, y más generalmente de protozoos y ciliados no está considerada a menos que estos sean patógenos, como *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. (Moreno, 2013).

V. CONCLUSIONES

1. Se han aislado e identificado Amebas de vida Libre (FLA) patógenas del género *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia* y de la familia *Vahlkampfiidae* dentro de la cual se encuentra *Naegleria* en las aguas residuales, incluso después del tratamiento de desinfección de las mismas.
2. Se han aislado e identificado Amebas de vida Libre (FLA) patógenas del género *Acanthamoeba* spp, *Vermamoeba* y de la familia *Vahlkampfiidae* dentro de la cual se encuentra *Naegleria* en las aguas potables analizadas a la salida directa al consumidor.
3. El tratamiento terciario de las aguas residuales analizadas (tratamiento UV combinado con hipoclorito sódico) para su reutilización, no es efectivo para la eliminación de FLA patógenas representando un elevado riesgo como fuente de infección.
4. El tratamiento del agua potable con concentraciones de cloro libre residual de entre 0.5- 1 mg/L no es suficiente para la eliminación de FLA, lo que debería ser considerado al evaluar el riesgo potencial del consumo de agua potable de fuentes públicas.
5. La técnica FISH combinada con la incubación previa en DVC es una herramienta rápida y específica para identificar la presencia de células viables de *H. pylori* y *L. pneumophila* procedentes del interior de las FLA. demostrando que pueden desempeñar la función de reservorio y vehículo de transmisión de patógenos emergentes importantes, protegiéndolos de las condiciones adversas y de los tratamientos de desinfección de las aguas.
6. Se han podido detectar formas cultivables y por tanto viables de *H. pylori* y *L. pneumophila* del interior de las amebas de vida libre aisladas mediante métodos culturales, lo que confirma el potencial infectivo de estas células.
7. Al riesgo por la presencia de especies patógenas de FLA en aguas utilizadas para el consumo humano directamente o reutilizadas para el riego, hay que añadir que estas son portadoras de los patógenos *H. pylori* y *L. pneumophila* viables en su interior evidenciando que estas aguas podría actuar como vehículo de transmisión al hombre de estos patógenos emergentes.
8. El uso de los indicadores tradicionales como control de calidad de las aguas, debería de revisarse ya que existen patógenos aún más resistentes a los métodos de desinfección convencionales, los cuales pueden persistir en el agua supuestamente desinfectada con mayor facilidad que los indicadores fecales.
9. Teniendo en cuenta el riesgo que supone el agua para la transmisión de enfermedades e infecciosas, sería de gran interés a nivel de Salud Pública, presentar como alternativa para el control de la calidad del agua de consumo, una combinación de los indicadores microbiológicos tradicionales con nuevos patógenos más resistentes como indicadores específicos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Sulami A.A., Al-Edani T.A., Al-Adbula A.A., 2012. Culture method and PCR for the detection of *Helicobacter pylori* in drinking water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterol. Res. Pract.* doi:10.1155/2012/245167.
- Andersen L.P., Rasmussen L., 2009. *Helicobacter pylori* - coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 56: 112-115.
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA, 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172: 762-770.
- Akya A., Pointon A., Thomas C., 2009. Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70: 20-29.
- Amman R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Azevedo N.F., Pacheco A.P., Keevil C.W., Vieira M.J., 2004. Nutrient shock incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Appl. Env. Microbiol.* 70: 490-493.
- Baker K.H., Hegarty J.P., Redmond B., Reed N.A., Herson D.S., 2002. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 981.
- Barbeau B., Buhler T. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res. Microbiol.* 152: 753-760.
- Barker J., Brown M.R., Collier P.J., Farrell I., and Gilbert P., 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* 58: p. 2420–2425. Erratum in: *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 4089.
- Barker J., Brown M.R.W., 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.* 140: p. 1253-1259.
- Barker J., Scaife H., and Brown M.R., 1995. Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: p. 2684–2688.
- Baskerville A., Fizgeorge R.B., Broster M., Hambleton P. and Dennis P.J., 1981. Experimental transmission of legionnaires' disease by exposure to aerosols of *Legionella pneumophila*. *Lancet.* 2:1389-1390.
- Beltrán and Jiménez, 2008. Faecal coliforms, faecal enterococci, *Salmonella typhi* and *Acanthamoeba* spp. UV inactivation in three different biological effluents
- Bellack N.R., Koehoorn M.W., MacNab Y.C., Morshed M.G., 2006. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiol. Infect.* 134: 439-449.
- Benson R.F., Fields B.S., 1998. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect.* 13:90-9.
- Besser RE., Griffin PM., Slutsker L., 1999. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. *Ann. Rev. Med.* 50, 355–367.

- Bonilla-Lemus P., Ramírez-Bautista G.A., Zamora-Muñoz C., Ibarra-Montes M. R., Ramírez-Flores E., Hernández-Martínez M.D. 2010. *Acanthamoeba* spp. In domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitana area of Mexico City. *Exp. Parasitol.* 126: 54-58.
- Brown LM., 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* 22(2), 283–297.
- Bunn J., MacKay W.G., Thomas J.E., Reid D.C., Weaver L.T., 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 450-454.
- Butt C.G., 1966. Primary amebic meningoencephalitis. *N Engl J Med* 1966; 274: 1473-6.
- Carbone M., Maugeri T.L., Gugliandolo C., La Camera E., Biondo C., Fera M.T., 2005. Occurrence of *Helicobacter pylori* DNA in the coastal environment of southern Italy (Straits of Messina). *J. Appl. Microbiol.* 98: 768-774.
- Castrillón J.C., Orozco L.P., 2013. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia.
- Cellini L., Del Vecchio A., Di Candia M., Di Campli E., Favaro M., Donelli G., 2004. Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater. *J. Appl. Microbiol.* 97: 285-292.
- Cerva L., Kasprzak W., Mazur T., 1982. *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plant. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*; 26: 152-61.
- Chávez-Munguía B., Omaña-Molina M., Castañón G., Bonilla P., González-Lázaro M., Hernández Martínez D., Salazar-Villatoro L., Esparza- García A., Martínez-Palomo A., Ortega-Pierres G, 2009. Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *J Eukaryot Microbiol*;56(1):66-72
- Cellini L., Di Campli E., Grande R., Di Bartolomeo S., Prenna M., Pasquantonio M.S., Pane L., 2005. Detection of *Helicobacter pylori* associated with zooplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 40: 115-120.
- Cirillo, J.D., Falwok, S., Tompkins, L.S., 1999. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 62: 3254-3261.
- Coullier J., Prevots M., Rompre A., 1994. The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water. *Can. J. Microbiol.* 40: 830-836.
- Cover T.L., Blaser M.J., 1995. *Helicobacter pylori* a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. *ASM Features* 61: 21-26.
- Codony F., Maartín Pérez L., Adrados B., Agustí G., Fittipaldi M., Marató J., 2012. Amoeba-related health risk in drinking water systems: could monitoring of amoebae be a complementary approach to current quality control strategies?. MSM-Lab & Aquasost – UNESCO Chair in Sustainability, UPC, Barcelona, Spain.
- Davey M.E., O’toole G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 847-867.
- Degnan A.J., Sonzogni W.C., Standridge J.H., 2003. Development of a plating medium for selection of *Helicobacter pylori* from water samples. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 2914-2918.
- Douglas M., 1930. Notes on the classification of the amoeba found by Castellani on culture of yeast-like fungus. *J Trop Med Hyg* 1930; 33: 258-59.

- Dupuy M., Mazoua S., Berne F., Bodet C., Garrec N., Herbelin P., Ménard-Szczebara F., Oberti S., Rodier M.H., Soreau S., Wallet F., Héchard Y. 2011. Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res.* 45: 1087-1094.
- Engstrand L., 2001. *Helicobacter* in water and waterborne routes of transmission. *J. Appl. Microbiol.* 90: 80-84.
- Feeley, J. C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C., Baine, W.B., 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 10:437-41.
- Fernández M.T., 2015. Caracterización molecular de Amebas de Vida Libre e identificación de otros parásitos en aguas de red de la provincia de Zaragoza: asociación con otros microorganismos y riesgos para la Salud Pública. Departamento de Microbiología, Medicina preventiva y Salud Pública, Universidad de Zaragoza.
- Fernández M., Contreras M., Suárez P., Gueneau P., García-Amado M.A., 2007. Use of HP selective medium to detect *Helicobacter pylori* associated with other enteric bacteria in seawater and marine molluscs. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 213-218.
- Fernández-Delgado M., Contreras M., García-Amado A.M., Michelangeli F., Suárez P., 2008. Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*. Departamento de Biología de Organismos, IVIC, Universidad de Venezuela.
- Fiore A.E., Nuorti J.P., Levine O.S., Marx A., Weltman A.C., Yeager S., Benson R.F., Pruckler J., Edelstein P.H., Greer P., Zaki S.R., Fields B.S. and Butler J.C. 1997. Epidemic Legionnaires' Disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. *CID.* 26:426-433.
- Fittipaldi M., Pino-Rodríguez N., Agrados B., Agustí G., Peñuela G., Morató J., Codony F., 2011. Discrimination of viable *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts by propidium monoazide real-time polymerase chain reaction. *J. Eukariot Microbiol.* 58: 359-364.
- Fitzgeorge R.B., Baskerville M.B., Hambleton P. and Dennis P.J., 1983. Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. *J Hyg Camb.* 90:80-89.
- Fliermans C.B., Cherry W.B., Orrison L.H., Smith S.J., Tison D.L. and Pope D.H., 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol.* 41:9-16.
- Fouque E., Trouilhé M.C., Thomas V., Humeau P., Héchard Y., 2014. Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: Effects of environmental conditions and cell concentration. *Exp Parasitol.* 2014 Nov;145 Suppl:S62-8. doi: 10.1016/j.exppara.2014.03.029. Epub 2014 Apr 8.
- Fraser D.W., Deuberm D.C., Hill D.L., and Gilliam D.K., 1979. Nonpneumonic short-incubation period legionellosis (Pontiac fever) in men who cleaned a steam turbine condenser. *Science.* 5:690-691.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., Brachman, P.S., 1977. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 297:1189-97.

- Fuchs B.M., Syutsubo K., Ludwig W., Amann R., 2001. *In situ* accessibility of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 961-968.
- Fung W.P., Papadimitriou J.M., Matz L.R., 1979. Endoscopic, histological and ultrastructural correlations in chronic gastritis. *Am J Gastroenterol*; 71: 269-79.
- García, M, Jones S., Pelaz C., Millar R., Kwaik Y., 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. Department of Microbiology and Immunology, University of Louisville, KY, USA. Laboratorio de *Legionella*, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid, Spain.
- García A., Goñi P., Clavel A., Lobez S., Fernández M.T., Ormad M.P. 2011. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. *Environ. Microbiol Rep.* 3: 622-626.
- García A., Goñi P., Cieloszyk J., Fernández M.T., Calvo-Beguería L., Rubio E., Fillat M.F., Peleato M.L., Clavel A., 2013. Identification of free-living amoebae and amoebae-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ.Sci. Technol.* 47: 3132-3140.
- Goodman K.J., Correa P., Tengana Aux H.J., Ramírez H., DeLany J.P., Guerrero O., López M., Collazos T., 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: A population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* 144: 290-299.
- Goodwing C., Armstrong A.J., 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* 9: 1-13.
- Graham DY., Malaty HM., Klein DG., Evans E., Adam E., 1991. Transmission of *Helicobacter pylori* Infection Studies in Families of Healthy Individuals Vol. 26, No 9, p. 927-932. Depts of Medicine and Pediatrics, Division of Molecular Virology, USDA/ARS, Veterans Affairs Medical Center, Houston, Texas, USA.
- Greub, G., and Raoult, D., 2003b. Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24: p. 784–786.
- Grimm D., Merkert H., Ludwig W., Scheleifer K.H., Hacker, J., Brand B.C., 1998. Specific Detection of *Legionella pneumophila*: Construction of a New 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probe. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Jul; 64(7): 2686–2690.
- Groothuis D.G., Veenendaal H.R., Dijkstra H.L., 1985. Influence of temperature on the number of *Legionella pneumophila* in hot water systems. *J Appl Bacteriol.* 59:529-536.
- Gutiérrez Y., 2000. Free-Living Amebae. *Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations*. Ed. Oxford University Press. New York 2000; p. 114-42.
- Haas, C.N., and Engelbrecht, R.S., 1980. Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from aqueous chlorination. *J Water Pollut Control Fed* 52: 1976–1989.
- Harwood V.J., Levine AD., Scott TM. *et al*, 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(6), p. 3163–3170.
- Hlavsa M.C., Roberts V.A., Anderson A.R., Hill V.R., Kahler A.M., Orr M., Garrison L.E., Hicks L.A., Newton A., Hilborn E.D., Wade T.J., Beach M.J., Yoder J.S., 2011. Surveillance for waterborne

disease outbreaks and other health events associated with recreational water. United States, 2007-2008, *MMWR Surveill. Summ.* 60:p. 1-32.

Hijen W., Madema G., 2015. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: *Water Res. Research Gate* 40:3-22

Hoge C.W. and Breiman R.F., 1991. Advances in the epidemiology and control of Legionella infections. *Epidemiol Rev.* 13:329-340.

Hulten K., Han S.W., Enroth H., Klein P.D., Opekun A.R., Gilman R.H., Evans D.G., Engstrand L., Graham D.Y., El-Zaatari F.A., 1996. Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 110: 1031-1035.

Ingerson-Mahar M., Reid A. 2012. MIP. Microbes in pipes. The microbiology of the water distribution system. A report on an American academy of microbiology colloquium. Boulder, Colorado.

Jhonson C.H., Rice E.W., Reasoner D.J., 1997. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4969-4970.

Jiang X., Doyle M.P., 2000. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 38: 1984-1987.

Keer, J.T.; Birch. L., 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Micro.*

Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., 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.

Kilvington, S. and Price, J., 1990. Survival of *L. pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* 68:p. 519–525.

Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., and Kendall, A.M., 2002. Literature review-efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. *Water Res* 36: p. 4433–4444.

Klein P.D., Graham D.Y., Gaillour A., Opekun A.R., Smith E.O., 1991. Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian children. *Lancet* 337: 1503-1506.

Krishna C. R., Shukla O.P., 1984. Differentiation of pathogenic amoebae: encystations and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni*. *J.Biosci.* 6:p. 475-489.

Kubota K., Ohashi A., Imachi H., Harada H., 2006. Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5311-5317.

Lane C.R., Joseph C.A. and Bartlet C.L.R., 1998. European Surveillance of travel associated legionnaires' disease 1996. *Euroservillance.* 3:6-8.

Lorenzo-Morales J., Ortega-Rivas A., Foronda P., Martínez E., Valladares B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water resources. *Parasitol. Res.* 95: 273-277.

Loret J.F., Greub G., 2010. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 213: 167-175.

- Lu H., Graham DY., Yamaoka Y., 2001. A Report Card to Grade *Helicobacter pylori* Therapy. Volume 12, Issue 4, p. 275-278.
- Lu Y., Redlinger T.E., Avitia R., Galindo A., Goodman K., 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 1436-1439.
- Ma P., Visvesvara G.S., Martínez A.J., Theodore F.H., Dagget P.M., Sawyer T.K., et al. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 490-513.
- Marciano-Cabral F, Cabral G., 2003. *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 273-307.
- Marcó, J., Martí S., Martín, J.V., Pastor, P., Rodríguez, J.A., 2009. Guía técnica para la prevención y control de la legionelosis en instalaciones. Ministerio de sanidad y consumo.
- Marshall B.J., 2002. The discovery that *Helicobacter pylori*, a spiral bacterium, caused peptic ulcer disease. In: Marshall B, editor. *Helicobacter* Pioneers (Firsthand account from the scientists who discovered *helicobacters*. 1892-1982). Blackwell Science Asia. p. 165-202.
- Martínez J.M., Visvesvara G.S., Chandler F.W., 1997. Free-Living Amebic Infections. En D H Connors, F W Chandler, D A Schwartz, H J Manz, E E Lack (Eds). *Pathology of infectious Diseases*, Vol II. Ed. Appleton & Lange. Stamford, Connecticut.; 1163-76.
- Mc Dade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowle WR and the laboratory investigation team, 1977. Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory diseases. *New Engl J Med.* 297:1197-1203.
- Metcalfe and Eddy, 2003. Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización. 30 edición, McGraw-Hill Inc., Interamerica de España S.A.
- Moreno C., 2002. Evaluación de nuevos métodos de detección, subtipificación y erradicación de *L. pneumophila*. Tesis doctoral. Universidad de Alicante.
- Moreno L, 2013. El papel de las Amebas de Vida Libre como reservorio de *Helicobacter pylori* en aguas potables y residuales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia.
- Moreno Y., Ferrús M.A., Medina E., Jiménez A., Martínez M., Hernández, J., 2001. Direct detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples by *in situ* hybridization. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 1537.
- Moreno Y., Ferrús M.A., Alonso J.L., Jiménez A., Hernández J., 2003. Use of fluorescent *in situ* hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Res.* 37: 2251-2256.
- Moreno Y., Piqueres P., Alonso J.L., Jiménez A., González A., Ferrús M.A., 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res.* 41: 3490-3496.
- Moreno Y., Ferrús M.A., 2012. Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants. *Helicobacter* 17:327-332.
- Moter A., Göbel, U.B., 2000. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41: 85-112.

- Muñoz V., Reyes H., Toche P., Cárcamo C., Gottlieb B., 2003. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol Latinoam* 58: 106 - 111, 2003 FLAP
- Nobel Prize in Physiology or Medicine. 3rd October, 2005.
- Nwachuku N., and Gerpa C.P., 2004. Health effects of *Acanthamoeba* spp and its potential for waterborne transmission. *Rev Environ Contam Toxicol* 180:p. 93– 131.
- Oddó D., 2006. Infections caused by free-living amebas. Historical commentaries, taxonomy and nomenclature, protozoology and clinicopathologic features. Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional del Cáncer, Unidad de Anatomía patológica, Universidad Católica de Chile
- Oliver J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93-100.
- Page F.C., 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. London, UK: Ferry House, Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria.
- Pajares J.M., Gisbert J.P., 2006. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario de La Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Spain.
- Park S.R., Mackay W.G., Reid D.C., 2001. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilms sampled from a water distribution system. *Water Res.* 35: 1624-1626.
- Pelaz, C., Martin-Bourgon, C., 1993. Legionelosis: datos de España, diagnóstico de laboratorio y recomendaciones para su prevención y control en instalaciones de edificios. Instituto de Salud Carlos III. ISBN: 84-7670-362-7.
- Peralta M.L., Ayala J.J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos (Free-living amoebae in humans). *Salud Uninorte. Barranquilla (Col)* 25: 280-292.
- Percival S.L., Chalmers R.M., Embrey M., Hunter P.R., Sellwood J., Wyn-Jones P., 2004. *Microbiology of waterborne pathogens*. Elsevier, London.
- Percival S.L., Thomas J.G., 2009. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. *J Water Health* 7: 469-477.
- Pereira A., Pérez M., 2003. Amebas de vida libre. *Offarm*, Vol. 22, Núm. 06. Facultad de Farmacia, Laboratorio de parasitología, Universidad de Santiago, Chile.
- Pernin P., Pélandakis M., Rouby Y., Faure A., Siclet F., 1998. Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 955-959.
- Pfister D.R., Cameron J.D., Krachmer J.H., Holland E.J., 1996. Confocal microscopy findings of *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol*; 121:119-28.
- Piqueres P., Moreno Y., Alonso J.L., Ferrús M.A., 2006. A combination of direct viable count and fluorescent in situ hybridization for estimating *Helicobacter pylori* cell viability. *Res. Microbiol.* 157: 345-349.
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C *et al*, 2005.. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 603–609.
- Rand J.L., Hofmann R., Alam M.Z.B., Chauret C., Cantwell R., Andrews R.C., Gagnon G.A., 2007. A field study evaluation for mitigating biofouling with chlorine dioxide or chlorine integrated with UV disinfection. *Water Research* Vol. 41, Issue 9, p. 1939 – 1948.

- Rodríguez-Zaragoza S., 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* 20:p. 225-241.
- Rune T., Nielsen P.S., Jensen T.H., 2006. Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA Journal* 11: 1745-1748.
- Sanden G.N., Fields B.S., Barbaree J.M. and Feeley J.C., 1989. Viability of *Legionella pneumophila* in chlorine-free water at elevated temperatures. *Curr Microbiol.* 18:61-65.
- Schuster F.L., 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*; 15, 342-54.
- Schuster F.L., Dunnebacke T.H., Booton G.C., Yagi S., Kohlmeier C.K., Glaser C., Vugia D., Bakardjiev A., Azimi P., Maddux-González M., Martínez A.J., Visvesvara G.S, 2003. Environmental Isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J Clin Microbiol*; 41: 3175-80.
- Signoretto C., Lleo M., Tafi M.C., Canepari P., 2000. Cell wall chemicals composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1953-1959.
- Smith C.D., Ashbolt N.J., 2012. The fate of *Helicobacter pylori* phagocytised by *Acanthamoeba polyphaga* demonstrated by fluorescent in situ hybridization and quantitative polymerization chain reaction tests. *Curr Microbiol.* 65: 805-812.
- Steinert, M., Emody, L., Amann, R., and Hacker, J., 1997. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila*. Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 63:p. 2047–2053.
- Steinert, M., Ockert, G., Luck, C., and Hacker, J., 1998. Regrowth of *L. pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentrall Bakteriell* 288:p. 331–342.
- Steinert, M., Henstchel, U., and Hacker, J., 2002. *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* 26:p. 149–162.
- Storey M.V., Winiacka-Krusnell J., Ashbolt N.J., and Stenström T.-A., 2000. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* 36:p. 656–662.
- Stothard D.R., Hay J., Schroeder-Diedrich J.M., Seal D.V., Byers T. J., 1999. Fluorescent oligonucleotide probes for clinical and environmental detection of *Acanthamoeba* and the T4 18S rRNA gene sequence type. *J Clin Microbiol*; 37: 2687-93.
- Stout J.E., Yu V.L. and Best M.G., 1985. Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution system. *Appl Environ Microbiol.* 49:221-228.
- Stout, J.E. and Yu, V.L., 1997. Legionellosis. *N Engl J Med* 337: p. 682 - 687.
- Strunk, O., O. Gross, B. Reichel, M. May, S. Hermann, N. Stuckmann, B. Nonhoff, T. Ginhart, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, K.-H. Schleifer, and W. Ludwig. ARB: a software environment for sequence data. Submitted for publication.
- Sutherland, E.E., and Berk, S.G., 1996. Survival of protozoa in cooling tower biocides. *J Ind Microbiol* 16: p. 73–78.
- Thomas V., Bouchez T., Nicolas V., Robert S., Loret J.F., Lévi Y, 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J. Appl. Microbiol.* 97: 950-963.

- Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS *et al.*, 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2428–2438.
- Thomas V., McDonnell G., Denyer SP., Maillard JY., 2009. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* 34(3), 231–259.
- Thomas V., McDonnell G., Denyer S.P., Maillard J.Y., 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 231-259.
- US-environmental protection agency, 2009. Drinking water contaminant candidate list 3-final. EPA-HQ-OW-2007-1189 FRL-8963-8966. *Federal Register* 74(194), 51850–51862.
- Vaerewijck M.J., Sabbe K., Van Hende J., Baré J., Houf K., 2010. Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1566-1578.
- Valster R.M., Wullings B.A., van der Kooij D., 2010. Detection of protozoan hosts for *Legionella pneumophila* in engineered water systems by using a biofilm batch test. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:p. 7144-7153.
- Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R., de Ley J., 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 88-103.
- Varela A.R., Manaia C.M., 2013. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20: 3550-3569.
- Villarino A., Bouvet O.M.M., Regnault B., Martin-Delautre S., Grimont, P.A.D., 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. *Res. Microbiol.*, núm. 151, págs. 755-768.
- Warren J.R., 2002. The discovery of *Helicobacter pylori* in Perth, Western Australia. In: Marshall B, editor. *Helicobacter Pioneers* (Firsthand account from the scientists who discovered helicobacters. 1892-1982). Blackwell Science Asia; p. 151-64.
- Watson C.L., Owen R.J., Lai S., Lee J.V., Surman-Lee S., Nichols G., 2004. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *J. Appl. Microbiol.* 97: 690-698.
- Winiiecka-Krusnell J., Wreiber K., Euler A., Engstrand L., Linder E., 2002. Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.* 34: 253-256.
- Woese C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Yu V.L., Zuravleff J.J., Gavlik L. and Magnussen M.H., 1983. Lack of evidence for person-to-person transmission of legionnaires' disease. *J Infect Dis.* 146:362.

VII. ANEJOS

Anejo A. Medios de cultivo

Anejo A.1. Medios sólidos

Agar Sangre de Caballo (ASC)

Base de Agar Selectivo para Campylobacter exento de sangre (Merk Millipore, ref. 100070)

Composición: Agar Selectivo para Campylobacter 40 g/L

· 10% de Sangre Desfibrinada de Caballo (Oxoid, ref. SR0050C)

Agar Sangre Piruvato (ASP)

· Base de Agar Selectivo para Campylobacter exento de sangre (Merk Millipore, ref. 100070)

Composición: Agar Selectivo para Campylobacter 40 g/L

· 10% de Sangre Desfibrinada de Caballo (Oxoid, ref. SR0050C)

· 0,025% de Piruvato de Sodio (Fisher, ref. BP356-100)

Agar Dent (ADent)

· Base de BBL™ Brucella Broth (BD, ref. 211088)

Composición: Agar Selectivo para Campylobacter 40 g/L

· 10% de Sangre Desfibrinada de Caballo (Oxoid, ref. SR0050C)

· Helicobacter pylori Suplemento Selectivo "Dent" (Oxoid, ref. SR0147E)

Cada vial suplementa 500 ml de medio. Composición por vial:

Vancomicina 5 mg/0,5L

Lactato de trimetoprin 2,5 mg/0,5L

Cefsulodín 2,5 mg/0,5L

Anfotericina 2,5 mg/0,5L

Non Nutrient Agar Page (NNAP)

Agar Bacteriológico Europeo (Conda, ref, 1800)

Composición : Agar 15 g/L

Se disuelve el Agar Bacteriológico Europeo e en 1 L de PAGE, previamente preparado.

Anejo A.2. Medios líquidos o caldos de cultivo

Solución salina amébrica de Page (PAGE)

Composición:

Cloruro de calcio (NaCl) 1,2 g/L

Sulfato de magnesio (MgSO₄) 0,04 g/L

Hidrogenofosfato de sodio (Na₂HPO₄) 1,42 g/L

Dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄) 1,36 g/L

Cloruro de calcio (CaCl₂) 0,04 g/L

Caldo DVC (DVC)

- Caldo BBL™ Brucella Broth (BD, ref. 211088) Composición: BBL™ Brucella Broth 28 g/L
- 5% de Suero Fetal Bovino (PAA Laboratories)
- Novobiocina 0,5 g/L

Anejo B. Reactivos y soluciones

Anejo B.1. Generación de microaerofilia

Sobres con mezclas generadoras de microaerofilia (CampyGen™, Oxoid ref. CN35)

Cuando se coloca un sobre en una jarra de 3,5 L y ésta se cierra, el oxígeno contenido en la misma es absorbido con rapidez mientras que simultáneamente se genera dióxido de carbono, produciendo las condiciones microaerófilas apropiadas. El componente activo de cada sobre es el ácido ascórbico.

Anejo B.2. Aislamiento

PBS 3X

Composición:

NaCl 22,8 g

NaH₂PO₄·H₂O 4,1 g

Na₂HPO₄·2H₂O 5,3 g

Agua destilada 1000 mL

pH 7,2

PBS 1X

Diluir 3 veces el tampón PBS 3X en agua destilada. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Anejo B.3. Hibridación in situ (FISH)

Fijación de las muestras

- PBS 1X
- Paraformaldehído (PFA): Calentar 65 mL de agua destilada hasta 60°C. Añadir 4 g de Paraformaldehído (Panreac, ref. 141451). Adicionar unas gotas de NaOH 5 M para ayudar a la disolución del polvo. Quitar de la fuente de calor y añadir 33 mL de PBS 3X. Ajustar el pH a 7,2 con CIH. Eliminar los posibles cristales mediante filtración y conservar a 4°C durante un máximo de 48 horas, o a -20°C durante varias semanas.
- Etanol absoluto

Gelatinización de los portaobjetos

Composición:

- Gelatina bacteriológica (Panreac, ref. 403902) 0,1%
- Sulfato potásico cromato (Sigma ref. C-5926) 0,01%

Calentar previamente el agua destilada hasta 60°C. Añadir la gelatina y la sal de cromato y mantener calentando en agitación hasta la completa disolución. Atemperar la solución a unos 45°C y sumergir en ella los portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld, ref. 9782100). Escurrir los portaobjetos y dejar secar al aire.

Deshidratación de las muestras

- Etanol 50%: 100 mL Etanol absoluto + 100 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- Etanol 80%: 160 mL Etanol absoluto + 40 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- Etanol 100 %: Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente y a 4°C para fijación.

Tampón de hibridación

Composición:

- NaCl 5M 360 µL (0,9M)
- HCl-Tris 1M 40 µL (20 mM)
- SDS 10% 2 µL (0,01%)
- Formamida (SIGMA F-7503) X µl (0-50%)
- Agua milliQ completar hasta 2 mL

Mezclar todos los componentes y añadir en último lugar el SDS 10%. Completar hasta 2 ml con agua milliQ y agitar.

Sondas (50 ng/ μ l)

Sonda para Eubacterias: EUB338-I, EUB338-II, EUB338-III (Tib Molbiol [®])

Sonda para Helicobacter pylori: HPY-LNA (Exiqon, USA)

Solución de lavado

Composición:

NaCl 5M* (9000-100 μ L)

HCl-Tris 1M 1000 μ L

SDS 10% 50 μ L

EDTA 0.5M** 500 μ L

Agua milliQ completar hasta 50 ml

*La concentración de NaCl depende de la concentración de formamida en el tampón de hibridación.

%Formamida (Tampón hibridación)	μl de NaCl 0.5M de (Tampón de lavado)
0	9000
10	4500
20	2150
30	1020
35	700
40	460

** Sólo se añade en caso de que el tampón de hibridación contenga un 20% de formamida o más.

1- NaCl 5M

Composición:

Cloruro de sodio (NaCl)	292,2 g
Agua destilada	1000 mL

2- Tris-HCl 1M pH 8.0

Composición:

Tris Base	121,1g
HCl	42 mL de HCl concentrado
Agua destilada	Hasta 1000 mL

Pesar el Tris Base y añadir a 800 mL de agua destilada. Añadir 42 mL de HCl concentrado y completar hasta 1000 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y filtrar posteriormente.

3- SDS 10%

Composición:

SDS	10 g
Agua destilada	Hasta 100 mL
Esterilizar por filtración.	

4- EDTA 0.5M

Composición:

EDTA·2H ₂ O	186,1 g
Agua destilada	Hasta 1000 mL

Pesar el EDTA y añadir a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 con NaOH. Completar hasta 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y filtrar posteriormente.

Visualización al microscopio de epifluorescencia

Antirrefractante (FluoroGuard TM Antifade Reagent, Bio-Rad)

Anejo C. Tabla de resultados identificación de FLA, *H. pylori* y *L. pneumophila* en las muestras procesadas

Origen	Muestra	Presencia FLA	FLA identificadas	<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori</i> muestras '	Colonia <i>H. pylori</i>	<i>L. pneumophila</i>	Colonia <i>L. pneumophila</i>
EDAR E	0.2	Sí	<i>A. castellanii</i>	No	No	-	Sí	-
EDAR S	0.3	No**	-	-	-	-	-	-
EDAR E	1.2	Sí	<i>Acanthamoeba</i> spp.	No	Sí	-	Sí, abundante	-
EDAR S	1.3	Sí	Presencia de amebas no identificadas	No	No	-	Sí, abundante	-
EDAR E	2.2	Sí	Presencia de amebas no identificadas	Sí (viables)	No	-	Sí, abundante	No
EDAR S	2.3	Sí	<i>Balamuthia</i> spp.*	Sí (viables)	Sí	-	No	No
EDAR E	3.2	Sí	<i>Acanthamoeba</i> spp.	No	Sí (viables)	Sí	No	Sí, abundantes
EDAR S	3.3	Sí	Presencia de amebas no identificadas	Sí (viables)	Sí	Sí	Sí	-
EDAR E	4.2	Sí	<i>A. castellanii</i> , <i>Balamuthia</i> spp.*, <i>V. vermiformis</i>	No	No	Sí	No	-
EDAR S	4,3	No**	-	-	-	-	-	-
EDAR E	5.2	Sí	Presencia de amebas no identificadas	No	Sí	-	Sí	Sí
EDAR S	5.3	Sí	Presencia de amebas no identificadas	No	Sí (viables)	No	Sí	Sí
Ind. Alim	1	No**	-	-	-	-	-	-
Ind. Alim	2	Sí	Presencia de amebas no identificadas	No	No	-	Sí	-
Ind. Alim	3	Sí	<i>V. vermiformis</i>	Sí	Sí (viables)	-	Sí	-
Ind. Alim	4	Sí	<i>V. vermiformis</i>	No	No	-	Sí	-
Dep. Urbana	5	Sí	Presencia de amebas no identificadas	Sí	No	-	Sí	-
Dep. Urbana	6	Sí	Presencia de amebas no identificadas	No	Sí	-	Sí	-
Potable	DW1	No**	-	-	-	-	-	-
Potable	DW2	Sí	Presencia de amebas no identificadas	Sí	Sí (viables)	-	Sí, abundante	-
Potable	DW3	Sí	<i>A. castellanii</i>	No	No	-	Sí	Sí
Potable	DW4	Sí	Presencia de amebas no identificadas	Sí (viables)	Sí (viables)	-	No	-
Red urbana	DW5	No**	-	-	-	-	-	-
Red urbana	DW6	Sí	<i>Naegleria</i> spp.*	Sí (viables)	No	-	No	-

