

Universidad Politécnica de Valencia

Departamento de Biotecnología



**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS
FENOTÍPICOS Y MOLECULARES DE MYCOLATA FORMADORES
DE ESPUMAS EN ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS
RESIDUALES DOMÉSTICAS CON SISTEMAS DE FANGOS
ACTIVOS**

Tesis Doctoral
Gonzalo Cuesta Amat
Valencia, Julio de 2004



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOS DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
AREA DE MICROBIOLOGÍA**

D. José Luis Alonso Molina, Técnico Superior y responsable del Grupo de Química y Microbiología del Agua del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente y Dña. Yolanda Moreno Trigos, Técnico de laboratorio perteneciente al Área de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos” realizada por Gonzalo Cuesta Amat para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos para su lectura y defensa.

Y para que así conste, firman este certificado en Valencia, a 14 de septiembre de 2004.

Fdo.: Dr. José Luis Alonso Molina

Fdo.: Dra. Yolanda Moreno Trigos

A mi padre

Ha llegado el momento de escribir la última página de esta historia y por tanto de agradecer a las muchas personas que han colaborado directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

En primer lugar tengo que mostrar mi más completo agradecimiento a D. Enrique Hernández, en este año tan especial para él, ya que le debo todas mis andanzas en el mundo de la microbiología, tanto a nivel de empresa como a nivel universitario. Su confianza en mí, su apoyo constante y sus sabios consejos han sido un estímulo importante en este trabajo.

A mi director de tesis, Jose Luis Alonso, le tengo que agradecer el permitirme trabajar en su grupo en un tema tan apasionante y lleno de futuro. Él ha guiado mis pasos, me ha dado consejos, ideas, mucho ánimo, me ha enseñado a trabajar en equipo, ha aceptado mis ideas y las ha mejorado. Gracias José Luis.

A Yolanda Moreno, mi directora, pero además mi compañera y amiga, porque aparte de compartir muchos cafés me enseñó a dar mis primeros pasos en el mundo de la biología molecular.

A Luis Roig, director del Departamento, porque a pesar de la gran cantidad de trabajo que tiene, siempre lo he encontrado cuando lo he necesitado y sus consejos en los momentos delicados han sido de vital importancia para mí.

A Javier, por resolverme unas cuantas cuestiones taxonómicas, y por dejarme usar su ordenador.

A M^a Antonia, mi buena estrella, porque de ella he recibido buenos consejos tanto a nivel investigador como a nivel docente.

A Manolo, que sabe lo que es trabajar con mycolata, ya que siempre ha estado dispuesto a prestarme su ayuda con la máxima prioridad.

A Rosa G., maestra de todos nosotros, porque gracias a ella este laboratorio ha funcionado siempre correctamente.

A Rosa M. le tengo que agradecer tantas cosas que faltan palabras en el diccionario para describirlas (ella sabe a lo que me refiero).

A Salut, M^a Angeles y Ana J., por todos esos cafés tan necesarios y muestras de ánimo y consejos en los momentos difíciles.

A Ana G. y a M^a Carmen, compañeras de doctorado y compañeras en el laboratorio hasta pasada la puesta de sol. Su ayuda ha sido de gran valor para mí.

A Patricia y Jorge, por su compañía y los cafés matutinos tan estimulantes.

A Loli le tengo que agradecer encarecidamente el haberme enseñado todos esos “trucos” sobre actinomicetos que no están en los libros y que fueron tan importantes para mí en los comienzos de este trabajo.

A todo el equipo de la CECT y a Laura, por todos esos ratos “biologando” juntos.

No me puedo olvidar de Federico Uruburu, mi profesor de microbiología ya que gracias a su excelente gestión consiguió las primeras cepas de referencia utilizadas en este trabajo.

A Esperanza Garay, ya que, a pesar de todo el trabajo que se le ha venido encima, siempre ha encontrado un hueco cuando la he necesitado.

A mi madre y hermanos porque han aguantado el largo tiempo de ausencia del “biologo loco” de la familia.

Y por último a Pilar, que siempre es la primera, porque ha sido, es y será todo en mi vida y porque sin su apoyo incondicional este trabajo no habría llegado a su fin. Ella ha soportado con enorme paciencia todas las dificultades surgidas en este largo y tortuoso camino y siempre me ha correspondido con una reconfortante sonrisa. Ha sido transmisora de un estímulo constante. Necesitaré una vida para agradecerlo.

Gracias a todos.

“Los actinomicetos son muy importantes desde el punto de vista médico. Pueden ser molestos, como cuando descomponen productos del caucho, se multiplican en el combustible de los aviones, producen sustancias malolientes que contaminan el suministro de agua, o se desarrollan en las plantas de tratamiento de aguas residuales formando espumas espesas que causan obstrucciones. Sin embargo, los actinomicetos son los productores de la mayoría de antibióticos”

H. A. Lechevalier y M. P. Lechevalier

I.-INTRODUCCIÓN	1
1.- ACTINOMICETOS	1
1.1.- Revisión histórica de los Actinomicetos	2
1.2.- Actinomicetos nocardioformes	3
1.3.- Clasificación actual: phylum y Clase <i>Actinobacteria</i>	4
1.4.- Suborden <i>Corynebacterineae</i>	6
1.4.1.- Familia <i>Corynebacteraceae</i>	6
1.4.2.- Familia <i>Dietziaceae</i>	8
1.4.3.- Familia <i>Gordoniaceae</i>	9
1.4.3.1.- Género <i>Gordonia</i>	9
1.4.3.2.- Género <i>Skermania</i>	11
1.4.4.- Familia <i>Mycobacteriaceae</i>	12
1.4.5.- Familia <i>Nocardiaceae</i>	14
1.4.5.1.- Género <i>Nocardia</i>	14
1.4.5.2.- Género <i>Rhodococcus</i>	16
1.4.6.- Familia <i>Tsukamurellaceae</i>	18
1.4.7.- Familia <i>Williamsiaceae</i>	18
2.- DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES	19
2.1.- Sistema de fangos activos	19
2.2.- El flóculo	20
2.3.- Composición de la microbiota	22
2.4.- Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos	22
2.4.1.- Tasa de crecimiento	23
2.4.2.- Tolerancia a factores abióticos y toxinas	23
2.4.3.- Capacidad para contribuir a la formación del flóculo	24
3.- PROBLEMAS EN SISTEMAS DE FANGOS	
ACTIVOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS	24

3.1.- Formación de espumas biológicas (foaming) y aumento de volumen de los sólidos sedimentables (bulking)	24
3.2.- Microorganismos productores de espumas	27
3.2.1.- Factores que dan lugar a la formación de espumas	30
3.2.1.1.- Burbujas de aire	31
3.2.1.2.- Partículas hidrofóbicas	31
3.2.1.3.- Tensioactivos	33
3.2.2.- Factores que inciden en el crecimiento de los actinomicetos formadores de espuma	34
3.2.2.1.- Requisitos nutricionales	34
3.2.2.2.- Requisitos de oxígeno	35
3.2.2.3.- Temperatura	35
3.2.2.4.- pH	36
3.3.- Métodos de control	36
3.3.1.- Manipulación de la edad del fango	36
3.3.2.- Cloración	37
3.3.3.- Empleo de selectores	37
3.3.4.- Eliminación física	37
3.3.5.- Otros métodos	38
4.- DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MYCOLATA EN FANGOS ACTIVOS	39
4.1.- Aislamiento y recuento	39
4.1.1.- Observación microscópica directa	39
4.1.2.- Recuento en placa	40
4.1.3.- Micromanipulación	41
4.2.- Identificación y caracterización	42
4.2.1.- Métodos clásicos	42
4.2.1.1.- Caracteres morfológicos	42

ÍNDICE

4.2.1.2.- Quimiotaxonomía	43
4.2.2.- Métodos fenotípicos	46
4.2.2.1.- Sistemas miniaturizados	47
4.2.3.- Métodos genotípicos	49
4.2.3.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	49
4.2.3.2.- PCR-RFLP	52
4.2.3.3.- Hibridación " <i>in situ</i> " con sondas marcadas con fluorocromos (FISH)	53
II.- OBJETIVOS	57
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	
1.- Cepas bacterianas de referencia	59
2.- Caracterización de las cepas fenotípicamente	59
2.1.- Sistemas miniaturizados API ZYM y API ID 32C	59
2.2.- Microlog (Biolog, Inc. USA)	61
3.- Detección de ácidos micólicos	64
4.- Preparación de muestras para el microscopio electrónico	65
4.1.- Fijación de células	65
4.2.- Preparación	66
5.- Caracterización de las cepas genotípicamente	66
5.1.- Extracción de DNA	66
5.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	68
5.2.1.- <i>Nocardia</i>	68
5.2.2.- Amplificación del gen de la proteína HSP y análisis con enzimas de restricción (PCR-RFLP-HSP)	70
5.2.3.- <i>Gordonia</i>	71
5.2.4.- <i>Rhodococcus</i>	72

6.- Hibridación con sondas fluorescentes (FISH)	76
6.1.- Diseño y elección de sondas	76
6.2.- Fijación y permeabilización de las cepas de referencia	77
6.3.- Hibridación <i>in situ</i>	79
6.3.1.- Observación al microscopio de epifluorescencia	81
6.3.2.- Análisis de imagen de la señal de hibridación	81
6.4.-Tinción DAPI	82
7.- Estudio de muestras de fangos activos	83
7.1.- Toma de muestras	83
7.2.- Observación microscópica	85
7.3.- Detección directa por FISH	85
7.3.1.- Técnica de enriquecimiento	86
7.4.- Puesta a punto de un método de aislamiento	86
7.4.1.- Descontaminación de las muestras	86
7.4.1.1.- Tratamiento con cloruro de benzalconio	87
7.4.1.2.- Tratamiento con NaOH	91
7.4.1.3.- Tratamiento con N-Acetil-L-Cisteína (NALC)	91
7.4.2.- Selección de medios de cultivo	91
7.4.3.- Aislamiento y recuento	93
7.5.- Caracterización de aislados fenotípicamente	93
7.6.- Caracterización de aislados genotípicamente	94
IV.- RESULTADOS	97
1.- Caracterización de las cepas de referencia fenotípicamente	97
1.1.- Sistemas API ZYM y API ID 32C	97
1.2.- Sistema MicroLog (Biolog, Inc. USA)	104
1.3.- Ácidos micólicos	109

ÍNDICE

1.4.- Observación de cepas al Microscopio electrónico	110
2.- Caracterización de cepas de referencia genotípicamente	112
2.1.- Extracción de DNA	112
2.2.- <i>Nocardia</i>	114
2.3.- PCR-RFLP de la proteína de estrés térmico (HSP)	116
2.4.- <i>Gordonia</i>	118
2.5.- <i>Rhodococcus</i>	121
3.- Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	
en cepas de referencia	124
3.1.- Optimización de la permeabilización de mycolata	124
3.1.1.- Hibridación según el protocolo de los Reyes	124
3.1.2.- Hibridación según el protocolo de Carr	131
3.1.3.- Análisis de la señal de hibridación y tratamiento estadístico	137
4.- Puesta a punto de un método de aislamiento	142
4.1.- Selección de medios de cultivo	142
4.2.- Descontaminación previa de las muestras	144
4.3.- Aislados obtenidos	148
5.- Caracterización de aislados	154
5.1.- Fenotípicamente	154
5.1.1.- <i>Nocardia</i>	154
5.1.2.- <i>Gordonia</i>	155
5.1.3.- <i>Rhodococcus</i>	157
5.1.4.- <i>Mycobacterium</i>	158
5.1.5.- <i>Corynebacterium</i>	158
5.2.- Genotípicamente	159
5.2.1.- <i>Nocardia</i>	159
5.2.2.- <i>Gordonia</i>	161
5.2.3.- <i>Rhodococcus</i>	162

6.- Detección de mycolata por FISH	164
6.1.- Técnica de enriquecimiento de muestras ambientales	164
6.2.- Detección por FISH en muestras ambientales sin enriquecimiento	165
6.3.- Detección por FISH de aislados en cultivo puro	171
V.- DISCUSIÓN	177
VI.- CONCLUSIÓN	185
VII.- BIBLIOGRAFIA	187
VIII.- ANEJOS	
ANEJO I: Medios de cultivo	215
ANEJO II: Reactivos para biología molecular	219
ANEJO III: Abreviaturas empleadas	223
ANEJO IV: Reactivos para microscopía electrónica	225
ANEJO V: Direcciones de internet	227
ANEJO VI: Esquema de plantas depuradoras estudiadas	229

IX.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Actinomicetos nocardioformes incluidos en el <i>Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i> , vol. 4. 1989.	3
Tabla 2: Actinomicetos que contienen ácidos micólicos (mycolata) incluidos en el <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> , 9ª Ed.1994.4	
Tabla 3: Clasificación jerárquica de la clase <i>Actinobacteria</i> , subclase <i>Actinobacteridae</i> , orden <i>Actinomycetales</i> basada en las secuencias de DNA y RNA ribosómico 16S (Stackebrandt <i>et al.</i> , 1997)	5
Tabla 4: Microorganismos dominantes en las espumas de fangos activos identificados por microscopía	28
Tabla 5: Tipos de pared celular según sus constituyentes mayoritarios (Lechevalier y Lechevalier, 1980)	44
Tabla 6: Tipos de pared celular y tipos glucídicos de los actinomicetos aerobios con meso-DAP (Lechevalier y Lechevalier, 1980)	44
Tabla 7: Cepas de referencia utilizadas	60
Tabla 8: Condiciones de cultivo utilizadas con el sistema Microlog	63
Tabla 9: Solución de hibridación según las cantidades de formamida empleadas en este estudio (Anejo II)	79
Tabla 10: Sondas utilizadas en este estudio y su porcentaje de formamida	80
Tabla 11: Solución de lavado según el porcentaje de formamida (Anejo II)	81
Tabla 12: Plantas muestreadas, volumen de agua residual tratado, número de muestreos y cepas aisladas de mycolata	83
Tabla 13: Perfil enzimático obtenido con el sistema API ZYM de las cepas de referencia	98
Tabla 14: Asimilación de fuentes de carbono obtenido con el sistema API ID32C de las cepas de referencia	101

Tabla 15: Perfil numérico obtenido con el sistema API ID32C de las cepas de referencia	103
Tabla 16: Perfil bioquímico de las cepas de referencia obtenido con el sistema Microlog	105
Tabla 17: Comparación de la medida de intensidad entre los protocolos de Reyes y Carr utilizando la sonda EUB 338	139
Tabla 18: Comparación de la medida de intensidad entre los protocolos de Reyes y Carr utilizando la sonda 657	139
Tabla 19: Comparación de la medida de intensidad entre los protocolos de Reyes y Carr utilizando la sonda 736	139
Tabla 20: Comparación de la medida de intensidad entre las sondas EUB y 657 utilizando el protocolo de Reyes	141
Tabla 21: Comparación de la medida de intensidad entre las sondas EUB y 736 utilizando el protocolo de Reyes	141
Tabla 22: Comparación de la medida de intensidad entre las sondas 657 y 736 utilizando el protocolo de Reyes	141
Tabla 23: Crecimiento comparativo de las cepas de referencia en los distintos medios de cultivo seleccionados	142
Tabla 24: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados a una suspensión de <i>N. asteroides</i>	146
Tabla 25: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados a una suspensión de <i>G. amarae</i>	146
Tabla 26: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados a una suspensión de <i>R. rhodochrous</i>	146
Tabla 27: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados a una muestra de fango inoculada con <i>N. asteroides</i>	147
Tabla 28: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados a una muestra de fango inoculada con <i>G. amarae</i>	147

ÍNDICE

Tabla 29: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados a una muestra de fango inoculada con <i>R. rhodochrous</i>	147
Tabla 30: Aislados obtenidos sin descontaminación	150
Tabla 31: Aislados obtenidos con descontaminación	151
Tabla 32: Identificación de cepas de <i>Gordonia</i> con el sistema MicroLog	156
Tabla 33: Identificación de <i>Rhodococcus</i> con el sistema MicroLog	157

X.- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo propuesto por Minnikin para la cubierta de los mycolata	46
Figura 2: Detalle de la espuma de origen biológico producida por bacterias filamentosas	84
Figura 3: Esquema del protocolo de aislamiento de nocardioformes en muestras sin descontaminar	88
Figura 4: Esquema del protocolo de descontaminación con cloruro de benzalconio y con hidróxido sódico	89
Figura 5: Esquema del protocolo de descontaminación con N-Acetil-L-Cisteína	90
Figura 6: Equipo completo de MicroLog y microplaca GP2	108
Figura 7: Cromatoplaaca para la detección de ácidos micólicos	109
Figura 8: Cepas de referencia observadas al microscopio electrónico de barrido	111
Figura 9: Gel de extracción de DNA con los dos métodos ensayados	113
Figura 10: Gel con los productos de amplificación del 16S de <i>Nocardia</i>	114
Figura 11: Productos obtenidos por el análisis de restricción del gen 16S con Hpa II de <i>Nocardia</i>	115
Figura 12: Productos obtenidos por el análisis de restricción del gen 16S con Hae III de <i>Nocardia</i>	115
Figura 13: Productos de amplificación del gen HSP de <i>Nocardia</i>	117
Figura 14: Productos obtenidos por el análisis de restricción del gen HSP con Hpa II de <i>Nocardia</i>	117
Figura 15: Alineamiento de secuencias del iniciador G1	119
Figura 16: Alineamiento de secuencias del iniciador G2	120

ÍNDICE

Figura 17: Gel con los productos de amplificación del 16S de <i>Gordonia</i>	121
Figura 18: Gel con el producto de amplificación del 16S de <i>R. equi</i>	122
Figura 19: Gel con el producto de amplificación del 16S de <i>R. erythropolis</i>	122
Figura 20: Gel con los productos de amplificación del 16S de <i>Rodococcus</i>	123
Figura 21: Hibridación in situ con la sonda EUB 338 según el protocolo de los Reyes	125
Figura 22: Hibridación in situ con la sonda 657 según el protocolo de los Reyes	127
Figura 23: Hibridación in situ con la sonda 736 según el protocolo de los Reyes	129
Figura 24: Hibridación in situ con la sonda EUB según el protocolo de Carr	131
Figura 25: Hibridación in situ con la sonda 657 según el protocolo de Carr	133
Figura 26: Hibridación in situ con la sonda 736 según el protocolo de Carr	135
Figura 27: Medida de la intensidad de la señal utilizando el programa DP-Soft	137
Figura 28: Tinción Gram de una muestra de fango	149
Figura 29: Observación microscópica de un floculo con filamento GALO	149
Figura 30: Cromatoplaca con ácidos micólicos de <i>mycolata</i>	153
Figura 31: Gel de PCR de aislados de <i>Nocardia</i>	159
Figura 32: Productos obtenidos por el analisis de restricción del gen 16S con <i>Hpa</i> II de aislados de <i>Nocardia</i>	160
Figura 33: Productos obtenidos por el analisis de restricción del gen HSP con <i>Hpa</i> II de aislados de <i>Nocardia</i>	160
Figura 34: Gel con los productos de amplificación del 16S de <i>Gordonia</i>	162

Figura 35: Gel con los productos de amplificación del 16S de <i>Rhodococcus</i>	163
Figura 36: Bacteria nocardioforme teñida con DAPI y con EUB 338	165
Figura 37: Hibridación de una muestra de fango activo sin enriquecimiento y con enriquecimiento	167
Figura 38: Hibridación de muestras de fango con EUB y <i>G. am-205</i> sin enriquecimiento	169
Figura 39: Hibridación de aislados de <i>G. amarae</i> con EUB y <i>G. am-205</i>	173

Los actinomicetos nocardioformes que contienen ácidos micólicos (mycolata) pertenecen al suborden *Corynebacterineae*, orden *Actinomycetales*. Este grupo de microorganismos contiene especies filamentosas que causan problemas de formación de espumas biológicas (“foaming”) en plantas de tratamiento de aguas residuales con sistemas de fangos activos. Estas espumas interfieren en el proceso de depuración de aguas residuales, ya que retienen hasta el 40% de los sólidos en suspensión. La presencia de especies patógenas en este grupo de microorganismos implica un riesgo para la salud pública y por lo tanto la necesidad de detectar estas especies.

Para caracterizar mycolata se han utilizado los sistemas miniaturizados API ZYM, API ID32 C y MicroLog que permiten la realización de muchas pruebas bioquímicas en poco tiempo. Las pruebas bioquímicas obtenidas por los sistemas API en ocasiones no diferencian todas las especies de este grupo. El único sistema miniaturizado que permite diferenciar todas las cepas de referencia es el sistema MicroLog. De todos los caracteres quimiotaxonómicos el más importante es la detección de ácidos micólicos, ya que los mycolata son los únicos que contienen estos compuestos.

Con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han caracterizado cepas de *Nocardia* de referencia, así como aislados de muestras de fango utilizando iniciadores previamente descritos. Para caracterizar especies de *Gordonia* aisladas de fangos se han diseñado unos iniciadores específicos que amplifican todas las cepas de *Gordonia* de referencia. Los iniciadores diseñados para *Rhodococcus* amplifican todas las especies de referencia de este género. La detección de la especie patógena

R. equi se realiza con los iniciadores diseñados previamente para esta especie.

El rendimiento en el aislamiento de mycolata se ha mejorado gracias a los tratamientos de descontaminación aplicados a las muestras de fango que reducen la microbiota acompañante de rápido crecimiento. Se han seleccionado tres medios de cultivo con los que se pueden aislar los géneros más importantes en la formación de espumas.

Para detectar las principales especies productoras de espumas sin utilizar métodos dependientes del cultivo se ha utilizado la técnica de la hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH). En primer lugar se ha optimizado el método de permeabilización de las células para facilitar el acceso de la sonda al DNA. Se han utilizado dos métodos de permeabilización y se ha medido la intensidad de la señal utilizando la sonda EUB 338, específica para el dominio *Bacteria*. Aunque con los dos métodos no se han observado diferencias significativas en la señal, el método propuesto por de los Reyes *et al.* (1998) se considera más adecuado ya que no altera tanto la morfología celular como el propuesto por Carr *et al.* (2003). Con las sondas Myb-736 y Myc-657, específicas del grupo mycolata, se ha obtenido señal en todas las cepas de referencia previamente permeabilizadas. Con la sonda *G.am-205*, específica para *Gordonia amarae*, se han detectado cepas de esta especie tanto en cultivo puro como en muestras ambientales. Con la técnica de enriquecimiento se ha conseguido aumentar la señal de hibridación.

Mycolic-acid containing Actinomycetes (mycolata) belong to the suborder *Corynebacterineae* within the order *Actinomycetales*. This group contains filamentous bacteria that produces thick foam or scum in activated wastewater treatment plants. This foam retains up to 40% of the suspended solids affecting the process. Some species of this group are opportunistic human pathogens and there is a need to detect them quickly to avoid that they could become a human health problem.

Several identification systems such as the miniaturized system API ZYM, API ID32 C and MicroLog have been used to characterize mycolata species. Sometimes, biochemistry profiles obtained by API systems cannot be able to distinguish among all the species. However, the MicroLog system is the only one to discriminate at species level. In order to characterize these species this system detects mycolic acids which are only present in mycolata microorganisms.

Nocardia strains have been characterized using primers previously described by other authors with the use of the polimerase chain reaction (PCR). Moreover, *Gordonia* (which is the genus most frequently associated with foam problems) and *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge have been characterized with primers designed in this work. Besides, the opportunistic pathogen species *R. equi* have been detected using specific primers.

The output in the isolation of mycolata species has been improved by three decontamination treatments applied to foam samples reducing the fast growth of the microbiota. Three culture media have been selected to isolate the most important genera of mycolata found in foam.

Fluorescent *in situ* hybridization technique (FISH) has been used to directly detect the main foam-producing species avoiding the tedious and long-time consuming traditional culture methods. Two cell permeabilization methods have been optimized to allow the access of different probes into the target. Initially, the general *Bacteria* specific probe EUB 338 was used to compare the efficiency of both methods. Although with both methods no significant differences have been observed, the method proposed by De los Reyes *et al.* (1998) is considered more suitable than the one proposed by Carr *et al.* (2003) due to the absence of disturbance of the cell morphology.

Furthermore, specific probes (Myb-736 and Myc-657) were used to detect the mycolata group. *Gordonia amarae* have been also detected by the use of a species-specific probe G.am-205. With this probe, *G. amarae* strains have been detected in both pure culture and in environmental samples. It was also observed that enrichment of foam samples increases the hybridization signals.

Els actinomicets nocardioformes que contenen àcids micòlics (mycolata) pertanyen al subordre *Corynebacterineae*, ordre *Actinomycetales*. Aquest grup de microorganismes conté espècies filamentoses que causen problemes de formació de bromeres biològiques (“foaming”) en plantes de tractament d'aigües residuals amb sistemes de fangs actius. Aquestes bromeres interferixen en el procés de depuració d'aigües residuals, ja que retenen fins al 40% dels sòlids en suspensió. La presència d'espècies patògenes en aquest grup de microorganismes implica un risc per a la salut pública i per tant la necessitat de detectar aquestes espècies.

Per a caracteritzar mycolata s'han utilitzat els sistemes miniaturitzats API ZYM, API ID32 C i MicroLog que permeten la realització de moltes proves bioquímiques en poc temps. Les proves bioquímiques obtingudes pels sistemes API en ocasions no diferencien totes les espècies d'aquest grup. L'únic sistema miniaturitzat que permet diferenciar totes les soques de referència és el sistema MicroLog. De tots els caràcters quimiotaxonòmics el més important és la detecció d'àcids micòlics ja que els mycolata són els únics que contenen aquests composts.

Amb la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'han caracteritzades soques de *Nocardia* de referència, així com aïllades de mostres de fang utilitzant iniciadors prèviament descrits. Per a caracteritzar espècies de *Gordonia* aïllades de fangs s'han dissenyat uns iniciadors específics que amplifiquen totes les soques de *Gordonia* de referència. Els iniciadors dissenyats per a *Rhodococcus* amplifiquen totes les espècies de referència d'aquest gènere. La detecció de l'espècie patògena *R. equi* es realitza amb els iniciadors dissenyats prèviament per a aquesta espècie.

El rendiment en l'aïllament de mycolata s'ha millorat gràcies als tractaments de descontaminació aplicats a les mostres de fang que reduïxen la microbiota acompanyant de ràpid creixement. S'han seleccionat tres medis de cultiu amb els què es poden aïllar els gèneres més importants en la formació de bromeres.

Per a detectar les principals espècies productores de bromeres sense utilitzar mètodes dependents del cultiu s'ha utilitzat la tècnica de la hibridació *in situ* amb sondes fluorescents (FISH). En primer lloc s'ha optimitzat el mètode de permeabilizació de les cèl·lules per a facilitar l'accés de la sonda al DNA. S'han utilitzat dos mètodes de permeabilizació i s'ha mesurat la intensitat del senyal utilitzant la sonda EUB 338, específica per al domini *Bacteria*. Encara que amb els dos mètodes no s'han observat diferències significatives en el senyal, el mètode proposat per de los Reyes *et al.* (1998) es considera més adequat ja que no altera tant la morfologia cel·lular com el proposat per Carr *et al.* (2003). Amb les sondes Myb-736 i Myc-657, específiques del grup mycolata, s'ha obtingut senyal en totes les soques de referència prèviament permeabilitzades. Amb la sonda G.am-205, específica per a *Gordonia amarae*, s'han detectat soques d'aquesta espècie tant en cultiu pur com en mostres ambientals. Amb la tècnica d'enriquiment s'ha aconseguit augmentar el senyal d'hibridació.

INTRODUCCIÓN

1.- ACTINOMICETOS

Los actinomicetos constituyen un grupo de microorganismos formado por bacterias generalmente aerobias, Gram-positivas y con alto contenido en G+C. Muchas especies forman filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales. En su morfología general se parecen mucho a los hongos. Probablemente parte de esta similitud es consecuencia de la adaptación a los mismos hábitats.

En este grupo de microorganismos, morfológicamente muy variados, dominan dos tipos principales: los nocardioformes, cuyas hifas se fragmentan en elementos cortos generadores de nuevos filamentos miceliares y los esporoactinomicetos, en los que se diferencia una parte del micelio completo para formar esporas.

Aunque los primeros actinomicetos fueron aislados a partir de hombres y animales por Cohn en 1878 y Nocard en 1888, son el suelo y los sustratos naturales el mayor reservorio de actinomicetos. En el suelo, donde intervienen en los procesos de descomposición de la materia orgánica, los tres géneros más frecuentemente encontrados son *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*. También podemos encontrar actinomicetos en aguas dulces y en sedimentos.

El interés por los actinomicetos comenzó a raíz del descubrimiento de la capacidad de estos microorganismos de producir antibióticos. De hecho,

hoy en día, sigue siendo el grupo más prolífico en cuanto a producción de antibióticos y compuestos bioactivos.

Aunque la búsqueda de compuestos bioactivos sigue en auge, el interés por los actinomicetos se ha diversificado y actualmente ocupa áreas muy diversas. Pueden ser patógenos de plantas, de animales, de humanos, descomponen productos del caucho, crecen en el combustible de los aviones. En las estaciones depuradoras de aguas residuales producen espumas densas que llegan a obstruir las instalaciones. Por la diversidad de hábitats que pueden colonizar este grupo de microorganismos tiene un enorme interés ecológico.

1.1.- Revisión histórica de los Actinomicetos

El orden de los *Actinomycetales* Buchanan 1917, contaba con cinco géneros en 1948 y nueve en 1958. Dado el creciente interés por los actinomicetos en estos últimos años el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams *et al.*, 1989) dedica el volumen 4 de su 1ª edición a la revisión, adaptación y ampliación de la sección 17 del volumen 2 de la misma edición (Sneath *et al.*, 1986). El estudio y clasificación de los actinomicetos en el Manual Bergey's se fundamenta en la división en diferentes secciones supragenéricas basándose principalmente en características quimiotaxonómicas, como el tipo de pared celular, la disposición de los conidios y la presencia o ausencia de esporangio. Existen algunos géneros que no son fáciles de clasificar y por ello se agrupan en la última sección dedicada a los actinomicetos bajo el epígrafe de "Otros Géneros". El resto aparecen en las secciones de la 26 a la 32, recogiendo hasta la fecha de publicación 40 géneros.

La 9ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) engloba a los actinomicetos en diferentes grupos que abarcan del 22 al 29, variando el número de géneros que se incluyen y su división en los distintos subgrupos. El número de géneros integrantes se ve ampliado a 48 a causa de la aparición de 10 nuevos géneros y a la fusión de otros 2. Tal es el caso de varios géneros entre los cuales se encuentran *Gordonia* o *Tsukamurella*, mientras que *Faenia* y *Pasteuria* han sido reclasificadas.

1.2.- Actinomicetos nocardioformes

Los actinomicetos nocardioformes aparecen descritos por H. A. Lechevalier en la Sección 26 de la 1ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams *et al.*, 1989). En esta edición se describen once géneros de nocardioformes de los cuales sólo *Nocardia* y *Rhodococcus* contienen ácidos micólicos (Tabla1).

Tabla 1: Actinomicetos nocardioformes incluidos en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 4. 1989

	Géneros
SECCIÓN 26: Actinomicetos nocardioformes	<i>Nocardia</i>, <i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardiooidies</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Faenia</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Intrasporangium</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Saccharomonospora</i> .

En la 9ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) los actinomicetos nocardioformes están incluidos en el Grupo 22, el cuál está dividido en 4 subgrupos. El subgrupo 1 reúne los actinomicetos que contienen ácidos micólicos (en lo sucesivo mycolata). Hasta la fecha de publicación se incluyen cuatro géneros. (Tabla 2).

Tabla 2: Actinomicetos que contienen ácidos micólicos (mycolata) incluidos en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9ª Ed. 1994

GRUPO 22: Actinomicetos nocardioformes	Subgrupo 1: Bacterias que contienen ácidos micólicos	Géneros
		<i>Gordona</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Tsukamurella</i>

1.3.- Clasificación actual: phylum y clase *Actinobacteria*

Desde hace algún tiempo se ha observado que las secciones del Volumen 4 del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de 1989 no son homogéneas y que no siempre coinciden con los datos de la secuencia del 16S rRNA. Recientemente se ha propuesto ubicar todas estas bacterias en la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997) en base a la secuencia del 16S rRNA. La clase *Actinobacteria* está compuesta por los actinomicetos y sus parientes filogenéticos con un alto contenido en G+C. Contiene cinco subclases, la más amplia de las cuales es la subclase *Actinobacteridae* compuesta a su vez por dos órdenes, *Actinomycetales* y *Bifidobacteriales*. Los géneros incluidos en el Manual *Bergey's* están en el orden de *Actinomycetales*, que se divide en 10 subórdenes. El suborden *Corynebacterineae* engloba los microorganismos estudiados en el presente trabajo.

En la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone *et al.*, 2001) se propone la elevación de la clase *Actinobacteria* al rango de phylum. Dentro del phylum se reconoce una única clase, *Actinobacteria*, que mantiene la estructura jerárquica propuesta por Stackebrandt *et al.* (1997).

Tabla 3: Clasificación jerárquica de la clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Actinomycetales* basada en las secuencias de DNA y RNA ribosómico 16S. (Stackebrandt *et al.*, 1997)

Suborden	Familia
<i>Actinomycineae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
<i>Micrococcineae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i>
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioidaceae</i>
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomyetaceae</i>
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>
<i>Frankineae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i>
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>

En la actualización de la segunda edición del Bergey's Manual (Bergey's Taxonomic Outline, 2002) se incluye dentro del suborden *Corynebacterineae* la nueva familia *Williamsiaceae* (Kämpfer *et al.*, 1999).

1.4.- Suborden *Corynebacterineae*

Este suborden se compone de 7 familias: *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Tsukamurellaceae* y *Williamsiaceae* (Bergey's Taxonomic Outline, 2002).

1.4.1.- Familia *Corynebacteriaceae*

Es la familia tipo del suborden *Corynebacterineae*. Contiene dos géneros, *Corynebacterium* y *Turicella* (Stackebrandt *et al.*, 1997). *Corynebacterium* está incluido en la sección 15 del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Collins y Cummins, 1986) y en el grupo 20 del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994), *Turicella* no está incluida en el Manual Bergey's y es el único género de este suborden que no contiene ácidos micólicos (Funke *et al.*, 1994).

El género *Corynebacterium* contiene bacilos rectos o ligeramente curvados, aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positivos, a menudo de extremos afilados. Se suelen observar formas en maza. Las bacterias permanecen a menudo enlazadas después de la división crepitante, lo que tiene como consecuencia disposiciones de las células en ángulo, análogas a letras chinas, o una disposición en empalizada en la que se alinean hileras de células unidas por sus caras laterales. Las corinebacterias forman gránulos metacrómicos y poseen un quimiotipo de pared celular tipo IV (ácido meso-diaminopimélico, arabinosa y galactosa). Contienen ácidos micólicos de 22-36 átomos de carbono (Collins y Cummins, 1986). Actualmente hay descritas 69 especies pertenecientes a este género (Bergey's Taxonomic Outline, 2004).

Según la similitud del género (pared celular y composición lipídica) *Corynebacterium* está muy estrechamente relacionado con los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* formando el llamado grupo CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*). Esta relación filogenética la respaldan los resultados obtenidos por Stackebrandt en base a los estudios de la secuencia del 16S rRNA (Stackebrandt *et al.*, 1997). Se han realizado diferentes estudios filogenéticos del género basados en la secuencia del 16S rRNA con objeto de establecer la relación intragenérica y de determinar si el género está definido como un grupo monofilético (Ruimy *et al.*, 1995, Pascual *et al.*, 1995).

Corynebacterium es un género muy diverso que se encuentra en gran variedad de ambientes y que contiene importantes especies patógenas humanas como *C. diphtheriae*. Ciertos saprófitos como *C. glutamicum* poseen una larga tradición como microorganismos industriales en procesos de producción biotecnológica debido a la producción de aminoácidos y nucleótidos (Theilleux, J., 2000). Aunque este género pertenece al grupo de los mycolata que frecuentemente ocasionan problemas en estaciones depuradoras con sistemas de fangos activos ninguna especie de *Corynebacterium* se ha visto implicada en estos problemas.

El género *Turicella* fue descrito cuando se aisló un bacilo Gram-positivo corineforme de un paciente con otitis media (Funke *et al.*, 1994). Su pared celular contiene ácido meso-diaminopimérico, arabinosa y galactosa. No contiene ácidos micólicos. Este género fue incluido por Stackebrandt en esta familia en base a la secuencia del 16S rRNA (Stackebrandt, 1997), aunque en la edición del Bergey's Outline de 2004 aparece en el orden

Bifidobacteriales, incluida en una familia de afiliación desconocida (Bergey's Taxonomic Outline, 2004).

1.4.2.-Familia *Dietziaceae*

Cuenta con un único género, *Dietzia*, que no se encuentra incluido en la última edición del Manual Bergey's. Este género apareció como consecuencia de la reclasificación de *Rhodococcus maris* a *Dietzia maris* basándose en la secuencia del 16S rRNA (Rainey *et al.*, 1995). Estos resultados muestran que *R. maris* no es un miembro del género *Rhodococcus* pero se localiza entre el género *Corynebacterium* y miembros del cluster *Rhodococcus-Nocardia-Mycobacterium-Gordonia-Tsakamurella*. El género *Dietzia* está constituido por cocabacilos, Gram-positivos, catalasa positivos, aerobios y no formadores de esporas. La pared celular contiene ácido meso-DAP y los azúcares mayoritarios son galactosa y arabinosa (quimiotipo de pared celular IV). Contiene ácidos micólicos de 34-38 átomos de carbono. Su contenido en G+C expresado en mol% es del 73% (Rainey *et al.*, 1995).

Actualmente se conocen tres especies válidamente descritas de este género *D. maris*, *D. natronolimnaios* y *D. psychralcaliphila*. *Dietzia natronolimnaios* (Duckworth *et al.*, 1998) se aisló de un lago alcalino del Este del continente africano. *Dietzia psychralcaliphila* crece en hidrocarburos con elevada presencia de n-alcanos (Yumoto *et al.*, 2002).

Se conoce un caso en el que *Dietzia maris* ha causado infección nosocomial asociado a prótesis por lo que esta especie debería ser considerada como un potencial patógeno oportunista (Pidoux *et al.*, 2001).

1.4.3.- Familia *Gordoniaceae*

En la publicación de Stackebrandt *et al.* (1997) esta familia contenía un único género, *Gordonia*, ubicado en el Grupo 22 correspondiente a los actinomicetos nocardioformes del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). En la edición del *Bergey's Taxonomic Outline* de 2002 se incluye en esta familia el género *Skermania*.

1.4.3.1.- Género *Gordonia*

Este género fue propuesto originariamente por Tsukamura en 1971 para algunos actinomicetos débilmente ácido-alcohol resistente aislados del suelo y de esputos de pacientes con enfermedades pulmonares. Las tres especies originales *G. bronchialis*, *G. rubropertincta* y *G. terrae* fueron transferidas en 1977 por Goodfellow y Alderson al género *Rhodococcus* desapareciendo como tal el género *Gordonia*. Posteriormente, el descubrimiento de que en el género *Rhodococcus* existían dos grupos filogenéticamente distintos según el análisis de la secuencia del 16S rRNA condujo a Stackebrandt *et al.* (1988) a recuperar el género *Gordonia* para especies clasificadas como *R. bronchialis*, *R. rubropertincta*, *R. sputi*, y *R. terrea* (Riegel *et al.*, 1994, Goodfellow, 1992).

Actualmente existen 19 especies de *Gordonia* válidamente descritas y al menos dos en proceso de clasificación (Arenskötter *et al.*, 2004). *Gordonia amarae* fue transferida desde el género *Nocardia* a este género en base a sus propiedades químicas, microbiológicas y secuencia del 16S rRNA (Klate *et al.*, 1994, Goodfellow *et al.*, 1994). Desde su primera descripción como *N. amarae* (Lechevalier y Lechevalier, 1974) esta especie

ha sido aislada en gran cantidad de plantas depuradoras con sistemas de fangos activos y es uno de los mycolata más frecuentemente implicados en problemas de espumas biológicas (Iwahori *et al.*, 2001, Pagilla *et al.*, 2002).

El género incluye pequeños bacilos y formas cocáceas, pueden formar hifas con ramificaciones en ángulo recto, son aerobios, Gram-positivos o Gram-variable, catalasa positivos y normalmente parcialmente ácido-alcohol resistentes. Forman colonias marronáceas, rosas, naranjas o rojas cuyas células se encuentran en algunos casos formando agregados. La pared celular contiene ácido *meso*-DAP y los azúcares mayoritarios son galactosa y arabinosa (Quimiotipo de pared celular IV). Poseen ácidos micólicos de 48-66 átomos de carbono (Arensköter *et al.*, 2004).

El género *Gordonia* ha sido considerado como patógeno oportunista aislado de esputos de pacientes con afecciones pulmonares como *G. sputi* y *G. bronchialis* (Tsukamura, 1982) o como productor de bacteremias (Pham *et al.*, 2003). Sin embargo, muchas de las especies aisladas presentan una diversidad metabólica considerable y son capaces de degradar xenobióticos como *G. desulfuricans* y *G. amicalis* (Kim *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2000), alcanos como *G. alkanivorans* (Kummer *et al.*, 1999) o caucho como *G. polyisoprenivorans* (Linos *et al.*, 1999), mientras que otras especies como *G. hydrophobica* y *G. hirsuta* (Bendinger *et al.*, 1995, Klate *et al.*, 1996) son capaces de eliminar malos olores en biofiltros. La diversidad metabólica de este género queda reflejada en la revisión realizada por Arensköter *et al.*, (2004). Otra especie de este género, *G. jacobea*, produce pigmentos de aplicación industrial (de Miguel *et al.*, 2000). Esta última especie no está válidamente descrita pero los pigmentos carotenoides que produce están

aprobados por la FDA para su uso como aditivos en comida para peces de piscifactoría y aves de granja (Arensköter *et al.*, 2004)

Con objeto de investigar la coherencia y la relación filogenética de las especies de este género y su relación con otros géneros de mycolata se han realizado diversos estudios basados en la secuencia del 16S rRNA (Ruimy *et al.*, 1994, Bendinger *et al.*, 1995, Rainey *et al.*, 1995).

La etimología del género fue corregida por Stackebrandt en 1997 quedando como *Gordonia* y no *Gordona* (Stackebrandt *et al.*, 1997).

1.4.3.2.- Género *Skermania*

Nocardia pinensis fue propuesta como una de las principales especies de actinomicetos que ocasionan espumas en las superficies de los tanques de aireación de las plantas de tratamiento de aguas residuales de Australia (Blackall *et al.*, 1989). Este microorganismo fue asignado al género *Nocardia* mediante el uso de una combinación de propiedades morfológicas, fisiológicas y químicas. Sin embargo presenta unas características atípicas de las nocardias entre las que se incluyen su lento crecimiento, monoinsaturación de sus ácidos micólicos en la posición 2 y un patrón antimicrobiano distinto. La secuencia completa del 16S rDNA y la estructura de los ácidos micólicos representativos de los mycolata ha sido determinante para clarificar la posición taxonómica de esta especie, ya que pone de manifiesto el error al clasificarla en el género *Nocardia*, a pesar de estar relacionada filogenéticamente con las distintas familias que integran la clase *Actinobacteria*.

En base al estudio realizado por Chun *et al.* (1997), *Nocardia pinensis* fue reclasificada como un nuevo género dentro de la familia *Nocardiaceae*, renombrándose como *Skermania piniformis*, la única especie del género. Estos organismos originariamente eran conocidos como “Pine Tree Like Organism” o PTLO (Blackall, 1989), ya que sus ramificaciones se asemejan a las hojas de un pino.

El género *Skermania* lo componen bacterias filamentosas Gram-positivas, no ácido-alcohol resistentes con un metabolismo oxidativo y catalasa, oxidasa y ureasa positivos. Los componentes mayoritarios de la pared celular son el ácido *meso*-DAP, arabinosa y galactosa. El número de átomos de carbono de sus ácidos micólicos oscila entre 58 y 64, y su DNA tiene un porcentaje muy alto en G+C (Chun *et al.*,1997).

1.4.4.- Familia *Mycobacteriaceae*

Contiene únicamente el género *Mycobacterium* del cual se han contabilizado 95 especies en la edición del Bergey's Taxonomic Outline de 2002. *Mycobacterium* está compuesto por bacilos ligeramente curvos o rectos, que a veces se ramifican o forman filamentos que se fragmentan con facilidad en bacilos y cuerpos cocoides. Son aerobios y catalasa positivos. El quimiotipo de pared celular es IV y el contenido en G+C expresado en mol% es del 62-70%. Sus paredes celulares son muy ricas en lípidos y contienen ceras con ácidos micólicos de 60 a 90 átomos de carbono. La presencia de ácidos micólicos y de otros lípidos por fuera de la capa de peptidoglucano hace que las micobacterias sean fuertemente ácido-alcohol-resistentes (Sneath *et al.*, 1986).

En la edición del Bergey's del 1986 el género *Mycobacterium* está incluido en la sección 16 y en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9ª Ed., 1994 en la sección 21, sin embargo la presencia de ácidos micólicos junto con los estudios basados en la secuencia del 16S rRNA indican que debería estar relacionado con los mycolata (Hartmans y de Bont, 1992).

Las micobacterias suelen crecer muy lentamente y deben ser incubadas desde 2 hasta 40 días tras su inoculación en un medio complejo solidificado para formar colonias visibles de color blanco o crema brillante, aunque existen algunas especies que contienen pigmentos carotenoides. El primer escalón de la taxonomía de las micobacterias es la velocidad de crecimiento. Así se dividen en micobacterias de lento crecimiento y de rápido crecimiento. Las micobacterias patógenas suelen ser de lento crecimiento, como *M. tuberculosis* y *M. leprae*, mientras que las de rápido crecimiento se consideran ambientales y son frecuentemente aisladas del suelo, como *M. moriokaense* (Hartmans y de Bont, 1992). Se ha demostrado que las micobacterias pueden multiplicarse en agua pura aunque la materia orgánica favorece su crecimiento (Dailloux et al., 2000). En sistemas de tratamiento de aguas potables han sido aisladas diversas especies de micobacterias no tuberculosas (Le Dantec et al., 2002, Torvinen et al., 2004) Aunque las micobacterias se pueden observar en fangos activos, no se consideran responsables de formación de espumas biológicas.

Se han realizado estudios filogenéticos del género basados en la secuencia del 16S rRNA para demostrar la similitud de las especies dentro del género (Rogall et al., 1990, Pitulle et al., 1992).

1.4.5.- Familia *Nocardiaceae*

Está compuesta por dos géneros, *Nocardia* y *Rhodococcus* (Stackebrandt *et al.*, 1997, Chun *et al.*,1997). Aparecen descritos en la sección 17 (nocardioformes) y sección 26 (actinomicetos nocardioformes) de la primera edición del Manual Bergey's. El género *Skermania* fue incluido originariamente en esta familia (Chun *et al.*, 1997) aunque actualmente se incluye en la familia *Gordoniaceae* (Bergey's Taxonomic Outline, 2002).

Debido a que estos géneros se parecen a los miembros del género *Nocardia*, son denominados en conjunto como nocardioformes. El término nocardioforme, introducido por Prauser en 1967, hace referencia a los actinomicetos que forman un micelio fugaz que se fragmenta en elementos bacilares o cocoides. Ésta no es una definición satisfactoria ya que se conocen cepas individuales de nocardioformes que no presentan esta característica. Este término intentó unir de una manera informal un número de organismos con características similares sin que esto signifique que sean organismos estrechamente relacionados.

1.4.5.1.- Género *Nocardia*

Son aerobios, catalasa positivos, parcialmente ácido-alcohol resistentes, Gram-positivas o Gram-variables. Forman un micelio aéreo, aunque únicamente visible al microscopio, que se eleva por encima del agar, donde ocasionalmente se pueden encontrar conidios. Las hifas del micelio del sustrato adquieren unas dimensiones de 0.5-1,2 μm de diámetro y la principal característica morfológica de este género es la tendencia a fragmentarse con facilidad en bacilos y elementos cocoides. Las hifas

forman ramificaciones características en ángulo recto. Las colonias tienen un aspecto aterciopelado o calcáreo y pueden ser marrones, rosas, rojas, naranjas, púrpuras, grises o blancas y, además, pueden producir pigmentos solubles de color marrón o amarillo. Los componentes mayoritarios de la pared celular son el ácido *meso*-DAP, arabinosa y galactosa. Contienen ácidos micólicos de 44-60 átomos de carbono y su contenido en G+C expresado en mol% es del 64-72%.

Nocardia está distribuido en el suelo de todo el planeta y se encuentra también en hábitats acuáticos. Se ha llegado a detectar especies de *Nocardia* en aguas oligotróficas radiactivas (Chicote Guerrero, 2004). Aunque en su mayoría son saprófitos de vida libre, algunas especies, en particular *N. asteroides*, son patógenos oportunistas que causan nocardiosis en seres humanos y en algunos animales. Es más frecuente la afectación pulmonar, pero también pueden llegar a invadir el sistema nervioso y otros órganos (McNeil *et al.*, 1994).

La primera *Nocardia* fue aislada en 1888 por el veterinario y bacteriólogo francés Edmond Nocard y fue caracterizada un año después por Trevisan que le dio el nombre de *Nocardia farcinica*. Por desgracia, las muestras de la cepa original de Nocard mantenida en dos colecciones de cultivo resultaron ser marcadamente diferentes. La cepa ATCC 3318 contenía ácidos micólicos típicos de *Nocardia* y la cepa NCTC 4524 contenía ácidos micólicos típicos de *Mycobacterium*. Los estudios taxonómicos llevados a cabo por Gordon y Mihn en 1962 no pudieron distinguir la cepa ATCC 3318 de *N. asteroides* por lo que en 1980 esta última especie sustituyó a *N. farcinica* como especie tipo (Wallace *et al.*, 1990).

Actualmente estas cepas se incluyen en el llamado *Nocardia asteroides* complex constituido por *N. asteroides* "sensu stricto", *N. farcinica* y *N. nova*. Con los métodos de identificación clásicos estas tres especies no se pueden distinguir y tradicionalmente se ha utilizado el patrón de resistencia a antibióticos (Wallace *et al.*, 1988). Otros métodos como el sistema killer de levaduras (Provost *et al.*, 1995) y la opacificación del agar Middlebrook 7H10 (Flores *et al.*, 1993) se han ensayado para marcar diferencias entre las especies de este complejo. Actualmente se dispone de métodos moleculares precisos para diferenciar estas tres especies (Steingrube *et al.*, 1995).

Desde la transferencia de *N. amarae* al género *Gordonia* como *G. amarae* (Goodfellow *et al.*, 1994) y de *N. pinensis* al género *Skermania* como *S. piniformis* (Chun *et al.*, 1997) el género *Nocardia* ha quedado como un taxón homogéneo.

El género *Nocardia* contiene 40 especies válidamente descritas (Bergey's Taxonomic Outline, 2004), muchas de ellas pueden causar enfermedades en humanos y animales como infecciones pulmonares y cutáneas (Roth *et al.*, 2003, Kageyama *et al.*, 2004). Se ha demostrado que una de estas especies, *N. farcinica*, es una de las responsables de formación de espumas en plantas de fangos activos (Stratton *et al.*, 1996).

1.4.5.2.- Género *Rhodococcus*

El género *Rhodococcus* comprende actinomicetos aerobios, Gram-positivos, catalasa positivos y parcialmente ácido-alcohol resistentes en

alguno de sus estados de crecimiento. Son coco-bacilos que pueden formar micelio de sustrato que da lugar a la aparición de extensas hifas, mientras que tan sólo en algunas especies es característico un micelio aéreo visible al microscopio. Las colonias de *Rhodococcus* pueden ser aterciopeladas, rugosas o mucosas, de color rojo, naranja, amarillo o crema. En todas las especies que componen este género el ciclo de crecimiento comienza con un estado de coco o cocobacilo y a partir de este punto los diferentes organismos pueden mostrar una mayor o menor complejidad en sus estados morfológicos: cocos que pueden germinar sólo en pequeños cocobacilos, formas filamentosas con proyecciones laterales, una ramificación elemental o formas diferenciadas que producen hifas muy ramificadas. La siguiente generación se formará por fragmentación de filamentos e hifas.

Los componentes mayoritarios del peptidoglucano de la pared celular son el ácido *meso*-DAP, arabinosa y galactosa. Contiene ácidos micólicos de 32-66 átomos de carbono y su contenido en G+C expresado en mol% es del 73%.

El hábitat de *Rhodococcus* está ampliamente distribuido en la naturaleza y frecuentemente es aislado de suelos, medios acuáticos y excrementos de animales herbívoros. Existen 19 especies de *Rhodococcus* válidamente descritas (Bergey's Taxonomic Outline, 2004) aunque en los fondos marinos se están encontrando nuevas especies de *Rhodococcus* por lo que cabe esperar que este número aumente en los próximos años (Colquhoun *et al.*, 1998). Algunas especies como *R. equi* son patógenos para hombres y animales. Otras especies tienen interés medioambiental ya que son capaces de degradar herbicidas (Parekh *et al.*, 1994) y otros compuestos (Finnerty, 1992, Briglia *et al.*, 1996, Yoon *et al.*, 2000).

1.4.6.- Familia *Tsukamurellaceae*

Aparece en el Grupo 22 correspondiente a los actinomicetos nocardioformes del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* de 1994. Está integrada por un único género, *Tsukamurella*, el cuál fue introducido en 1988 para acomodar dos organismos previamente clasificados como *Corynebacterium paurometabolum* y *Rhodococcus auranticus* y reducirlos a una sola especie *T. paurometabola* mediante el análisis de la secuencia del 16S rRNA (Collins *et al.*, 1988). Actualmente el género contiene 6 especies válidamente descritas (Bergey's Taxonomic Outline, 2004).

El género contiene actinomicetos aerobios, Gram-positivos, catalasa positivos, débilmente ácido-alcohol resistentes y de forma bacilar, que pueden observarse solos, en parejas o en masa. También pueden aparecer elementos cocobacilares. Forman colonias convexas que son secas pero ligeramente emulsificables y cuyos colores van desde el blanco o crema hasta el naranja. El componente mayoritario del peptidoglucano es el ácido meso-DAP, galactosa y arabinosa. La envoltura celular posee ácidos micólicos de 62-78 átomos de carbono y su contenido en G+C expresado en mol% es del 68%. Han sido aisladas mayoritariamente del suelo y de esputos humanos. La especie *T. spumae* ha sido aislada en espumas de fangos activos (Nam *et al.*, 2003).

1.4.7.- Familia *Williamsiaceae*

Este nuevo taxón de mycolata apareció en 1999 con la descripción de un género nuevo aislado de las paredes de una guardería en Finlandia. La familia contiene un solo género y dos especies *Williamsia muralis*

(Kämpfer *et al.*, 1999) y *W. maris* (Statch *et al.*, 2004). Los componentes mayoritarios de la pared celular son el ácido *meso*-DAP, arabinosa, galactosa, manosa y ribosa. El número de átomos de carbono de sus ácidos micólicos oscila entre 50 y 56. La secuencia del 16S rDNA indica que representa un taxón dentro del suborden *Corynebacterineae*. Aunque las propiedades morfológicas y quimiotaxonómicas son parecidas a las del género *Gordonia*, pueden ser diferenciadas por la secuencia del 16S rRNA y la longitud de las cadenas de ácidos micólicos (Kämpfer *et al.*, 1999). Este taxón es reconocido como familia en la edición del Bergey's Taxonomic Outline (2002).

2.- DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES

2.1.- Sistema de fangos activos

El proceso de fangos activos se utiliza desde hace más de medio siglo a partir de la observación de que cualquier agua residual, doméstica o industrial, aireada durante cierto tiempo, reducía su contenido en materia orgánica, al mismo tiempo que se formaba un fluido con flóculos de bacterias. La observación al microscopio de este fluido muestra que se encuentra formado por una población muy heterogénea de microorganismos, que cambia continuamente con el tiempo como respuesta a la variación de la composición del agua residual y a las condiciones ambientales (Soddell y Seviour, 1990).

Este proceso consiste en un tratamiento aeróbico que oxida la materia orgánica hasta CO₂, NH₃ y H₂O y nueva biomasa celular. El aire es aportado por medio de difusores o aireación mecánica. La biomasa celular

obtenida forma flóculos que sedimentan en el tanque de clarificación o sedimentación. Este proceso es utilizado a escala mundial como tratamiento biológico secundario para el tratamiento de aguas residuales domésticas (Bitton, 1999).

En el proceso de fangos activos intervienen cuatro elementos interrelacionados:

- Tanque de aireación: Compuesto por uno o varios recintos dimensionados para proporcionar un tiempo de retención hidráulica entre 0.5-24 horas o más.
- Fuente de oxígeno: Suministra la cantidad adecuada de aire u oxígeno puro necesaria para mantener las condiciones aerobias en el reactor.
- Sedimentador secundario: Permite la separación por gravedad de los fangos floculados del agua residual, obteniéndose un efluente clarificado.
- Purga y recirculación de lodos: Permite evacuar periódicamente el fango floculado sedimentado y recircular una determinada cantidad del mismo hasta el tanque de aireación.

2.2.- El flóculo

Un requerimiento esencial para el correcto funcionamiento de una planta de fangos activos es la formación de un flóculo adecuado de microorganismos en el tanque de aireación que permita la separación de sólidos en suspensión en el tanque de sedimentación produciendo un sobrenadante fluido y claro. Estos sólidos que contienen los flóculos son recirculados al tanque de aireación permitiendo aumentar el nivel de actividad microbiana (Soddell y Seviour, 1990). El flóculo contiene microorganismos, partículas orgánicas e inorgánicas. El tamaño oscila entre

1 y 1000 μm . Aunque algunos autores afirman que la fracción activa de bacterias en el flóculo representa el 1-3% del total de las bacterias, estudios realizados con sondas de oligonucleótidos fluorescentes muestran que el porcentaje de biomasa metabólicamente activa puede ser mayor (Bitton, 1999).

Las bacterias filamentosas actúan como un entramado que da consistencia al flóculo de manera que se pueden formar flóculos grandes y compactos que resisten la turbulencia del sistema de agitación. La presencia moderada de filamentos también ayuda a capturar y mantener atrapadas pequeñas partículas durante la sedimentación. En el flóculo ideal las bacterias filamentosas y las formadoras del flóculo crecen en equilibrio. Los filamentos se desarrollan principalmente en el interior del flóculo proporcionándole resistencia. Además los microorganismos del flóculo están mantenidos juntos gracias a una matriz extracelular de naturaleza variable. Entre otros componentes esta matriz contiene material polisacárido, altos niveles de proteínas, DNA y sustancias húmicas (Kerley y Forster, 1995; Frölund *et al.*, 1995).

Cuando no existen bacterias filamentosas o están presentes en muy bajo número se forman los llamados flóculos en punta de alfiler que son de pequeño tamaño y de consistencia débil por lo que son disgregados por el sistema de aireación. Este tipo de flóculos no sedimentan bien por lo que se producirá un sobrenadante turbio con muchos sólidos en suspensión.

Cuando se produce un crecimiento excesivo de microorganismos filamentosos uniendo flóculos entre sí se produce un defecto en la sedimentación de los sólidos. Este defecto se denomina “bulking” o aumento

de volumen de los sólidos sedimentados por compactación defectuosa (Bitton, 1999). Si estos microorganismos son de naturaleza hidrofóbica, como los mycolata o '*Microthrix parvicella*' se produce la formación de espumas biológicas, fenómeno conocido como "foaming" (Seviour y Blackall, 1998).

2.3.- Composición de la microbiota

El flóculo de los fangos activos contiene un amplio rango de procariotas y eucariotas, muchos de ellos pueden ser observados por las técnicas microscópicas habituales.

Dentro de las bacterias, las Gram-negativas son las más importantes en el flóculo. Son las responsables de la oxidación de la materia orgánica y de la transformación de nutrientes. Se cree que en el flóculo pueden existir cientos de especies bacterianas pero sólo una pequeña fracción puede ser detectada con métodos basados en técnicas de cultivo. Cuando se usan estos métodos se aíslan principalmente *Zooglea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcalígenes*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Comamonas*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, así como bacterias filamentosas como *Sphaerotilus* y *Bigiatoa* entre otras, que son responsables del bulking (Bitton, 1999).

2.4.- Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos

El sistema de fangos activos actúa básicamente como un cultivo continuo con una biomasa que recircula. En estos sistemas se produce una presión selectiva sobre los organismos de manera que aquellos que no sean

capaces de prevalecer en esas condiciones serán eliminados en el efluente (Seviour y Blackall, 1998). Los factores que hacen que un organismo permanezca dentro de este sistema se discuten a continuación.

2.4.1.- Tasa de crecimiento

La tasa específica de crecimiento de un organismo determinará su capacidad para competir con otras poblaciones microbianas. Este parámetro está relacionado con el tiempo medio de residencia celular. La disponibilidad de substratos necesarios para el crecimiento y otros factores pueden afectar a la tasa de crecimiento y por lo tanto al tiempo medio de residencia celular.

Los microorganismos del fango degradadores de materia orgánica requieren fuentes de nitrógeno, sulfuro e iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ para su crecimiento, algunos de los cuales pueden estar en concentraciones limitantes de crecimiento. La capacidad para obtener estos nutrientes afectará claramente a la tasa específica de crecimiento. Sin embargo, existe escasa información sobre la actividad metabólica de las bacterias en el fango activo y sobre la tasa de crecimiento *in situ* (Seviour y Blackall, 1998).

2.4.2.- Tolerancia a factores abióticos y toxinas

La capacidad de tolerar condiciones abióticas en el reactor como temperatura, pH y potencial redox también puede afectar a la tasa de crecimiento, así como la presencia de determinados productos tóxicos incluidos metales pesados que entran en el influente de la planta de tratamiento. Si alguno de estos tóxicos excede el máximo de tolerancia de un organismo se produce la muerte celular (Mazierski *et al.*, 1995, Seviour y

Blackall, 1998). Existen pocos datos experimentales que demuestren *in situ* el efecto tóxico de tales sustancias aunque se ha sugerido que los microorganismos asociados al flóculo pueden estar protegidos de alguna manera de estos tóxicos (Seviour y Blackall, 1998).

2.4.3.- Capacidad para contribuir a la formación del flóculo

Los microorganismos de vida libre que viven suspendidos, independientemente de su tasa de crecimiento, serán eliminados del sistema con el efluente después de la sedimentación. Por el contrario los que forman el flóculo podrán sedimentar tan pronto como éste se haya formado y por lo tanto serán recirculados en el reactor. Esto se traduce en un enriquecimiento de microorganismos con capacidad para formar flóculos (Jenkins *et al.*, 2004).

3.- PROBLEMAS EN SISTEMAS DE FANGOS ACTIVOS PRODUCIDOS POR ACTINOMICETOS

3.1.- Formación de espumas biológicas (“foaming”) y aumento de volumen de los sólidos sedimentados (“bulking”)

De todas las especies microbianas que pueden causar problemas de foaming los mycolata son las más problemáticas, ya que ocasionan espumas de gran consistencia que son difíciles de eliminar sin alterar la calidad del efluente.

El término bulking se aplica cuando se produce un crecimiento de organismos filamentosos en el líquido de mezcla. La presencia de estos

filamentos provoca que los flóculos del reactor sean voluminosos y poco consistentes. Los flóculos así formados no sedimentan bien y suelen ser arrastrados en grandes cantidades en el efluente de los tanques de sedimentación. Las condiciones que favorecen el crecimiento de los organismos filamentosos son muy diversas y varían con cada planta.

Además del bulking, en las plantas de fangos activos frecuentemente aparece otro problema como es el de la aparición de espumas biológicas (foaming) atribuidas principalmente a la presencia de mycolata, '*Microthrix parvicella*' y otras actinobacterias Gram-positivas. Aunque pueden existir otros tipos de espumas producidas por tensioactivos de lenta degradación (Jenkins *et al.*, 1993), las espumas producidas por mycolata son espesas, viscosas y muy estables.

La formación de estas espumas fue descrita por primera vez en 1969. En este estudio se describe el llamado misterio de Milwaukee, por ser esta localidad en donde se observaron por primera vez estas espumas que contenían gran cantidad de actinomicetos ramificados Gram-positivos. Estas bacterias fueron posteriormente identificadas como pertenecientes al género *Nocardia*, concretamente *N. amarae* y *N. rhodochrous* (Lechevalier y Lechevalier, 1974), y por ello a estas espumas se les empezó a conocer como "*Nocardia* foams" (Jenkins *et al.*, 1993). Sin embargo este término no resulta correcto debido a que otros microorganismos también pueden causar este problema, entre ellos los *Rhodococcus*, que se encuentran lejos de ser clasificados como especies de *Nocardia*. Para añadir más confusión *Nocardia amarae* ha sido reclasificada como *Gordonia amarae* (Goodfellow *et al.*, 1994). Hoy en día, se habla de "*Nocardia* foaming" al hacer referencia al problema de espumas producidas por mycolata, pero no para discutir los

microorganismos que ocasionan dichas espumas.

La formación de espumas en las plantas de fangos activos es un problema muy extendido. En América el 66% de las plantas han experimentado algún tipo de foaming (Seviour y Blackall, 1998). En Australia el 68% de las plantas sufren problemas de espumas (Seviour *et al.*, 1994). Un amplio seguimiento realizado en Francia puso de manifiesto que el 19.8% de las plantas, sobre todo las que utilizan intensa aireación, habían presentado problemas de espumas. Este estudio revela que en una de cada tres plantas con espumas de origen biológico el problema es puramente estético, sin embargo en el resto se produce un cambio significativo en la calidad del efluente. El problema del foaming produce, por lo tanto, una serie de consecuencias (Seviour y Blackall, 1998):

- Las espumas pueden llegar a tener más de un metro de espesor, y desbordarse en las pasarelas y áreas circundantes donde se originan peligrosas zonas resbaladizas.
- Se pierden gran cantidad de sólidos sedimentables, ya que las espumas pueden retener más del 40% de los sólidos en suspensión.
- Las espumas son las responsables de la disminución de oxígeno transferido a la superficie de los tanques aireados mecánicamente.
- Los sistemas de eliminación de espumas pueden verse bloqueados y las espumas pueden en algunos casos entrar en el tanque de sedimentación, reduciendo así la calidad del efluente.
- La espuma puede congelarse en climas fríos o pudrirse en climas cálidos.
- La espuma puede introducirse en los digestores anaerobios y ocasionar también problemas de foaming.
- Los aerosoles de los organismos formadores de espumas constituyen un

peligro potencial para la salud. Algunos organismos hallados en las espumas son patógenos oportunistas, tales como *Nocardia asteroides* y *Rhodococcus equi* (Prescott, 1991).

3.2.- Microorganismos productores de espumas

Antes de los 80, los únicos microorganismos reconocidos como formadores de espumas eran los actinomicetos nocardiformes, sin embargo, recientes trabajos han implicado ciertos tipos de microorganismos filamentosos asociados previamente con el aumento de volumen, especialmente '*Microthrix parvicella*' (Blackall *et al.*, 1994; Blackall *et al.*, 1996). La tabla 4 contiene las bacterias que han sido reconocidas en varios estudios como las dominantes en las muestras de espuma de las plantas con problemas de foaming.

Nocardia (Gordonia) es la bacteria filamentosa cuya presencia es más común en fangos activos de EEUU y la mayoría de espumas biológicas están producidas por este género, aunque recientes estudios en otros países sugieren que la situación es más compleja (Jenkins *et al.*, 1993).

Los mycolata son la causa más importante de foaming en Australia, Sudáfrica, los Países Bajos o Francia. Estudios realizados en Australia remarcan una morfología distinguible como *Skermania piniformis*, que no ha sido identificada en ningún otro país europeo, sin embargo, recientemente han sido observadas morfologías PTLO en dos plantas de fangos activos en Dinamarca (Eales *et al.*, 2003)

'*M. parvicella*' y diversos microorganismos todavía no clasificados debido a su imposibilidad de ser aislados en cultivo puro como tipo 0675,

0092, *Thiothrix* o '*Nostocoida limicola*' son, junto a las nocardias, los principales responsables de la formación de espumas en las plantas de fangos activos al crecer en el licor de mezcla y posteriormente acumularse en cantidades considerables en la espuma.

Tabla 4: Microorganismos dominantes identificados en las espumas de fangos activos por microscopía

-
- *Nocardia* (NALO): La mayoría de bacterias filamentosas Gram-positivas han sido relacionadas con las nocardias, algunas veces también conocidas como NALO (*N. amarae*-Like Organism) debido a su similitud morfológica con *N. amarae*, reclasificada actualmente como *Gordonia amarae*, por lo que a este grupo actualmente se le conoce como GALO (*G. amarae*-Like organism) y porque además *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y otros nocardioformes pueden presentar bajo ciertas condiciones una morfología parecida.
 - *Skermania piniformis* (PTLO): Es la única especie con morfología lo suficientemente característica como para identificarla correctamente. Originariamente se llamaba PTLO (Pine Tree- Like Organism) porque sus ramificaciones se semejan a las hojas de un pino.
 - *Rhodococcus*: Cocos Gram-positivos que producen espumas no filamentosas en diversas plantas de tratamiento australianas.
 - "*Microthrix parvicella*": Es el principal causante de espumas en Europa, Australia y Sudáfrica, pero menos frecuente en plantas de EEUU.
 - Tipos morfológicos Eikelboom 0092, 0675, 0041: Son bacterias filamentosas que no han podido ser cultivadas pero que se han caracterizado por la morfología de sus filamentos en fangos activos.
-

Los microorganismos dominantes aislados en cultivo puro de espumas de fangos activos se dividen básicamente en tres grupos:

- Actinomicetos que contienen ácidos micólicos: *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella*.
- Otros actinomicetos: *Amycolatopsis* sp., *Micromonospora* sp., *Actinomadura* sp., *Streptomyces* sp., *Oerskovia* sp.
- “*Microthrix parvicella*” es una bacteria filamentosa, Gram-positiva con una apariencia irregular y unas necesidades nutricionales que hacen que hasta la fecha no se haya conseguido aislar en cultivo puro. Su ubicación taxonómica no está clara todavía aunque su secuencia de 16S rDNA indica un parentesco con los actinomicetos (Blackall *et al.*,1994).

Resulta clara la necesidad de encontrar técnicas que permitan identificar a los microorganismos formadores de espumas de una forma más precisa y rápida, ya que, aunque todos están relacionados de forma taxonómica, difieren substancialmente en su fisiología y tasa de crecimiento. *Rhodococcus* crece relativamente rápido, obteniendo colonias aisladas en una media de 2-3 días, *Nocardia* en 5-7 días, mientras que *G. amarae* tarda más de una semana y *S. piniformis* más de tres semanas. Además es muy importante conocer si los organismos presentes en las espumas son patógenos debido a su potencial propagación a través de la creación de aerosoles.

Aunque los principales actinomicetos formadores de espumas como *G. amarae* y *S. piniformis* no son conocidos como patógenos otros, como *N.*

asteroides, *R. equi* y *T. paurometabolum*, causan enfermedades, particularmente en personas que usan medicación inmunodepresiva o infectados por el virus HIV (Castelli *et al.*, 1994). Las micobacterias, también detectadas en fangos activos, no han sido caracterizadas como especies causantes de espumas, pero pueden representar un peligro potencial serio para la salud (Dailloux *et al.*, 1999). Además, el personal de la planta se encuentra expuesto a los aerosoles de los nocardioformes que son potencialmente patógenos y cuya ruta de infección es probablemente la inhalación (Goodfellow, 1992).

3.2.1.- Factores que dan lugar a la formación de espumas

La formación de una espuma biológica estable y viscosa en los tanques de aireación en las plantas de tratamiento de aguas residuales implica el enriquecimiento selectivo de los organismos en el licor de mezcla mediante un proceso de flotación (Seviour y Blackall, 1998) y resulta de la combinación de elementos relacionados con la flotación de los microorganismos y mecanismos para estabilizar la espuma producida. En un proceso típico de flotación las partículas hidrofóbicas son transportadas desde una suspensión por pequeñas burbujas de gas. El tiempo de contacto entre la burbuja y la partícula hidrofóbica es muy corto y probablemente los tensioactivos faciliten la unión a la burbuja. Una burbuja de aire que atraviese una solución que contenga tensioactivos también ocasionará problemas de espumas, pero estas espumas serán menos estables. Los tensioactivos, pues, juegan un papel importante en el proceso, bien confiriendo hidrofobicidad a las partículas, bien estabilizando la espuma una vez ésta se ha formado.

Para que se produzca la aparición de espumas biológicas se necesita la presencia conjunta de burbujas de aire, partículas hidrofóbicas y tensioactivos. Estos tres componentes están presentes en la mayoría de plantas de fangos activos.

3.2.1.1.- Burbujas de aire

El examen de espumas de fangos activos por microscopía muestra que el foaming consiste en burbujas de aire sujetas en una densa matriz de microorganismos filamentosos en cuyo alrededor se encuentran burbujas individuales que contienen material celular (Foot *et al.*, 1993). La formación de burbujas se ve favorecida por los sistemas de agitación. Se ha examinado también la relación entre el foaming y el tamaño de la burbuja. El tamaño de la burbuja de aire no viene determinado únicamente por el método de aireación empleado, sino que depende a su vez de factores físicos como la viscosidad y la tensión superficial del licor de mezcla (Seviour y Blackall, 1998). Otros gases como el CO₂, N₂ y H₂S también se encuentran presentes en el licor de mezcla como resultado del metabolismo de la microbiota presente, pero el aumento producido es insignificante comparado con el ocasionado por aireación y no contribuyen significativamente a la formación de espumas (Lemmer y Bauman, 1988).

3.2.1.2.- Partículas hidrofóbicas

La mayoría de los microorganismos productores de espumas contienen grandes cantidades de material lipídico hidrofóbico en sus células. El 35% del peso seco de "*M. parvicella*" es material lipídico y los nocardioformes poseen un elevado contenido de ácidos micólicos en su pared celular, lo que

hace que todas las especies exhiban una elevada hidrofobicidad en algún estadio de su ciclo de crecimiento, aunque esta característica varía según las especies y, en algunos casos, con la edad del cultivo y con la riqueza del medio en carbono y nitrógeno. Por ejemplo, se han detectado diferencias en la hidrofobicidad de *Rhodococcus rhodochrous* aislados de espumas y otras especies de *Rhodococcus* incluso sabiendo que sus ácidos micólicos son similares (Sunairi *et al.*, 1997). La composición de los ácidos micólicos de *R. rhodochrous* y de *R. erythropolis* varía con la edad del cultivo, la temperatura de crecimiento y la fuente de carbono (Stratton *et al.*, 1997, Sokolovská *et al.*, 2003).

Las técnicas comúnmente utilizadas para determinar la hidrofobicidad de la superficie celular de una suspensión acuosa de células es la adherencia microbiana a los hidrocarburos. Mediante estas técnicas se examinó la hidrofobicidad de fangos de plantas con y sin problemas de espumas, llegando a la conclusión de que la biomasa presente en el licor de mezcla era normalmente más hidrofóbica en las plantas de tratamiento con foaming que en la de plantas que no tienen este problema (Rosenberg *et al.*, 1980).

Se ha conseguido medir la hidrofobicidad de diferentes especies de *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordonia* y *Mycobacterium* observándose una tendencia a su aumento cuanto mayor es la longitud de la cadena de ácidos micólicos, aunque la hidrofobicidad de las especies de *Mycobacterium* estudiadas no ha sido tan elevada como cabría esperar por su larga cadena de ácidos micólicos. Esto se atribuye a efectos contrarios en la hidrofobicidad del resto de componentes de la superficie celular. Es por ello que la hidrofobicidad de la superficie celular está probablemente

determinada por el balance entre componentes hidrofóbicos e hidrofílicos más que por un solo componente aislado (Stratton *et al.*, 1997).

También se ha comparado la estabilidad de las espumas producidas por *G. amarae* y una especie sin identificar de *Rhodococcus* sp., siendo tres veces más estable la espuma de *Rhodococcus* debido a la mayor longitud de su cadena de ácidos micólicos.

3.2.1.3.- Tensioactivos

Un tensioactivo es una sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones en un sistema, tiene la propiedad de reducir la tensión superficial del agua. Los componentes de la superficie activa se encuentran presentes en fangos activos debido a que ciertos microorganismos, incluyendo los mycolata, producen lípidos que poseen estas propiedades (Seviour y Blackall, 1998). Dichos lípidos producen tanto asociaciones bacteria-tensioactivo, que causan una asociación entre la bacteria y las gotitas de aceite, como tensioactivos extracelulares, que conducen a la emulsión de hidrocarburos en agua. Ambos tipos soportan la entrada de moléculas hidrofóbicas hacia el interior de las células (Goclick *et al.*, 1990).

El licor de mezcla procedente de plantas con problemas de foaming muestra menor tensión superficial que el del resto de plantas sin espumas, sugiriéndose, que grandes cantidades de tensioactivos se encuentran presentes en las plantas con foaming (Goddard y Forster, 1991).

3.2.2.- Factores que inciden en el crecimiento de los actinomicetos formadores de espuma

A pesar de que los microorganismos formadores de espumas, los mycolata y "*M. parvicella*", están considerados de crecimiento lento, de algún modo, logran competir por los nutrientes y producir grandes cantidades de biomasa en las plantas de fangos activos.

3.2.2.1.- Requisitos nutricionales

Diversos estudios taxonómicos han demostrado que los mycolata son capaces de utilizar un amplio rango de sustratos que va desde los azúcares simples hasta componentes orgánicos muy complejos. Otros trabajos revelan que *Nocardia* y los organismos relacionados son también capaces de metabolizar varios hidrocarburos, lípidos complejos, esteroides y fenoles (Klatte *et al.*, 1994). Los mycolata aislados de fangos activos también muestran esta capacidad para metabolizar un amplio rango de sustratos, incluyendo sustratos inusuales como tiofenos y quinolonas (Seviour y Blackall, 1998). Todos los mycolata, y especialmente *Rhodococcus*, son extremadamente versátiles en su capacidad para degradar sustratos y, consecuentemente, mostrarían una exitosa competencia contra otros microorganismos con capacidades metabólicas más limitadas, incluso a pesar de que estos últimos crezcan más rápidamente en sustratos sencillos como la glucosa. Un estudio reciente demuestra que los mycolata aislados de fangos activos crecen pobremente en glucosa y acetato, mientras que el crecimiento es mayor con fructosa como fuente de carbono (Kämpfer *et al.*, 1995).

3.2.2.2.- Requisitos de oxígeno

Los mycolata son aerobios estrictos, esto no significa necesariamente que algunos mycolata no sean capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas, como ciertas especies de *Rhodococcus* que pueden metabolizar anaeróbicamente clorofenoles (Uotila *et al.*, 1992).

3.2.2.3.- Temperatura

Es más probable la aparición de mycolata formadores de espumas en climas cálidos (Eikelboom, 1994), mientras que "*M. parvicella*" es más frecuente en climas fríos (Seviour *et al.*, 1994). Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que los mycolata no puedan crecer a temperaturas más bajas. Los mycolata aislados de fangos activos crecen en un amplio rango de temperaturas. Algunos aislados, particularmente *Rhodococcus*, crecen a temperaturas tan bajas como 5°C, mientras que la temperatura mínima de crecimiento para *G. amarae* es de 15°C. De estos estudios se deduce que el crecimiento de algunas bacterias formadoras de espumas en las plantas de fangos activos puede tener lugar a bajas temperaturas si otros requisitos metabólicos no son limitantes. La temperatura óptima de estos microorganismos es de 25°C, mientras que las temperaturas máximas de crecimiento son, al igual que las mínimas, muy variadas, algunos no pueden crecer con temperaturas de 30°C o superiores y, sin embargo, otros lo hacen a más de 40°C. La capacidad para crecer a altas temperaturas puede ser muy significativa en algunas plantas de tratamiento, ya que la temperatura en las secciones donde aparece la espuma puede aumentar por el contacto directo con el sol.

3.2.2.4.- pH

El pH del licor de mezcla influye de forma importante en el crecimiento de los filamentos. Se ha determinado que los niveles de pH óptimos para el desarrollo de los mycolata se encuentran entre 6 y 8. La mayoría de *Rhodococcus*, exceptuando *R. rhodnii*, *Gordonia* y *Tsukamurella* crecen también a pH alcalinos superiores a 9 (Goodfellow *et al.*, 1991).

3.3.- Métodos de control.

La formación de espumas en los sistemas de fangos activos tiene lugar en muchas de las plantas de tratamiento, las cuáles difieren significativamente en sus parámetros operacionales. La temperatura, los métodos de aireación, la edad del fango, el nivel de sólidos, etc. puede determinar qué microorganismos crecen particularmente en una planta y resulta, pues, difícil determinar los factores específicos que favorecen el crecimiento de las grandes cantidades de organismos formadores de espumas.

3.3.1.- Manipulación de la edad del fango

Debido a que los actinomicetos son considerados microorganismos de crecimiento lento, una reducción en la edad del fango eliminaría al organismo del sistema. Sin embargo, ésta no resulta una medida totalmente efectiva por la variabilidad en la velocidad de crecimiento de los nocardioformes. Aunque esta medida controla el problema en situaciones adversas, la calidad del efluente se ve afectada (Seviour y Blackall, 1998).

3.3.2.- Cloración

La cloración es normalmente utilizada como un método de control no específico para los problemas de bulking y foaming, aunque hoy en día se cree que perjudica a los flóculos que contienen mycolata. Un uso más efectivo de la cloración en el control de espumas reside en su aplicación pulverizando directamente sobre la espuma en el tanque de aireación (Jenkins *et al.*, 1993).

3.3.3.- Empleo de selectores

Este método se basa en la manipulación del crecimiento del filamento a través de una zona de selección previa al tanque de aireación. En esta zona se crea un ambiente anaeróbico donde los aireadores dejan de funcionar durante determinados períodos de tiempo, favoreciéndose así el crecimiento de bacterias formadoras de flóculos a expensas de los mycolata (Seviour y Blackall, 1998).

3.3.4.- Eliminación física

Existen diversas técnicas de eliminación física empleadas en el control del foaming que incluyen desde la eliminación mecánica de la capa superficial del licor de mezcla al uso de nebulizadores o flotación selectiva mediante el incremento de la aireación y eliminación selectiva de las espumas originadas (Pagilla *et al.*, 1996). Los nebulizadores son la opción mayoritaria en las plantas americanas, pero presenta el inconveniente de su baja efectividad ante problemas de espumas moderados o severos (Pitt y Jenkins, 1990).

3.3.5.- Otros métodos

La adición de compuestos antiespumantes ha tenido poco éxito a la hora de combatir problemas de foaming, probablemente debido a que estas espumas biológicas son mucho más estables que las espumas contra las que están diseñados esos antiespumantes (Pitt y Jenkins, 1990, Duchene, 1994). Además estos compuestos suelen tener un precio excesivo. Se ha ensayado también la dosificación de sales metálicas como FeCl_3 o coagulantes basados en aluminio. Pero ensayos de laboratorio realizados muestran que los nocardioformes tienen diferentes niveles de susceptibilidad a los niveles de hierro (Seviour y Blackall 1998).

Diferentes compañías comercializan mezclas de microorganismos conteniendo además nutrientes y enzimas. Estos productos no tienen aplicación práctica porque obligan a un uso continuado y por lo tanto resultan caros (Soddell y Seviour, 1990).

Recientemente se ha propuesto la utilización de actinofagos para controlar las espumas biológicas producidas por nocardioformes. Miembros de la familia viral *Siphoviridae* han sido aislados de géneros de mycolata presentes en muestras de reactores de fangos activos (Thomas *et al.*, 2002).

4.- DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE NOCARDIOFORMES EN FANGOS ACTIVOS

4.1.- Aislamiento y recuento

Aunque los métodos clásicos de recuento y aislamiento de nocardioformes son válidos y se siguen utilizando están siendo desplazados por los métodos modernos puesto que evitan en gran medida los largos tiempos de incubación y se reduce la manipulación. No obstante, para poder poner a punto los métodos moleculares de detección e identificación como la PCR o el FISH es necesario trabajar inicialmente con cultivos puros por lo que el aislamiento por métodos clásicos es necesario como primer escalón en este tipo de investigaciones.

4.1.1.- Observación microscópica directa

Determinados grupos de mycolata tienen una morfología particular que podemos utilizar para identificarlos. La morfología conocida como GALO (*Gordonia amarae*-like-organism) es fácilmente reconocida por sus ramificaciones en ángulo recto producida por especies de *Gordonia* y de *Nocardia*. En el caso de *Skermania* la morfología se conoce como PTLO (Pine-Tree-Like-Organism) porque se observan ramificaciones en ángulo agudo.

Jenkins utiliza un método microscópico para contar microorganismos filamentosos en fangos. En este método se miden las ramificaciones observadas por campo del microscopio y por medio de la aplicación de unas

formulas se obtiene una estimación del número de microorganismos filamentosos en el fango (Jenkins *et al.*,1993).

4.1.2.- Recuento en placa

El recuento directo en placa de la muestra de fango activo ha sido el método más frecuentemente empleado para aislar nocardioformes. Los medios de cultivo más usados son el GYEA, Czapeck modificado, TYEA, Sauton (Goodfellow *et al.*, 1992, Goodfellow *et al.*, 1996, Goodfellow, 1998). Todos estos medios son suplementados con ácido nalidíxico.

Debido a las limitaciones de este método, sólo han sido aislados los nocardioformes más abundantes y de crecimiento más rápido. Éste es uno de los principales inconvenientes de esta técnica, ya que la gran cantidad de microbiota acompañante presente en la muestra enmascara el crecimiento de los nocardioformes más lentos como *Skermania piniformis*. Para este tipo de especies este método no sería el más adecuado.

En el aislamiento de especies de *Nocardia* en muestras clínicas se han ensayado diversos tratamientos previos de descontaminación con idea de eliminar la microbiota acompañante como, por ejemplo, tratamiento alcalino, cloruro de benzalconio y N-acetil cisteina (Murray *et al.*, 1987, Garret *et al.*,1992).

Actualmente se sabe de la existencia de formas microbianas viables pero no cultivables en determinados ambientes naturales por lo que es posible que con métodos clásicos basados en cultivo se detecte sólo una

pequeña proporción de las especies que realmente existen (Zengler *et al.*, 2002, Head *et al.*, 1998).

4.1.3.- Micromanipulación

Para evitar los problemas del aislamiento de bacterias filamentosas de lento crecimiento se utiliza la técnica de la micromanipulación que permite el aislamiento en cultivo puro de filamentos observados directamente en la muestra.

Se han conseguido aislar filamentos de *Gordonia amarae* directamente de la muestra de fango activo utilizando el micromanipulador de Skerman (Blackall, 1991, Tandoi *et al.*, 1992). En el proceso de aislamiento por micromanipulación una gota de fango se coloca en el centro de una placa Petri conteniendo un medio adecuado. Con el asa del micromanipulador se capturan filamentos y se depositan en zonas estériles de la placa que originarán colonias aisladas que pueden ser sembradas.

Este método es adecuado para el aislamiento de *Skermania piniformis* que frecuentemente causa problemas de espumas en plantas australianas. El aislamiento de este microorganismo por recuento en placa es difícil debido a que se necesitan tiempos de incubación prolongados, de hasta 3 ó 4 semanas, para obtener colonias aisladas. En numerosas plantas australianas con problemas de espumas se han aislado filamentos de este microorganismo por micromanipulación y se han conseguido cultivos puros para su posterior caracterización (Soddell *et al.*, 1994).

Con este método se han conseguido aislar otras bacterias filamentosas como "*Microthrix parvicella*", *Nostocoida limicola*, *Haliscomenobacter hydrosis* y las formas filamentosas conocidas *Thiotrix*, Tipo 0092 y Tipo 0411 entre otras (Seviour *et al.*, 1994).

4.2.- Identificación y caracterización

4.2.1.- Métodos clásicos

La distinción entre los diversos grupos de actinomicetos se ha establecido tradicionalmente basándose en criterios fisiológicos, morfológicos y quimiotaxonómicos.

Los criterios fisiológicos se limitan al tipo de metabolismo oxidativo o fermentativo. Los caracteres morfológicos y quimiotaxonómicos son los más importantes. Estos últimos se han utilizado tanto para distinguir grupos supragenéricos como para distinguir especies (Williams *et al.*, 1989).

4.2.1.1.- Caracteres morfológicos

Los caracteres morfológicos son todavía muy utilizados para caracterizar el género. Los principales tratan sobre el modo de septación de las hifas, la estabilidad o fugacidad, importancia y disposición de las hifas del micelio del sustrato o del micelio aéreo, la presencia de esporangios o de las diversas formas de los conidios, la presencia de esporas, su número, su movilidad, su disposición en las hifas y su forma. La observación microscópica de estos caracteres debe realizarse alterando lo menos posible

las estructuras morfológicas de las cepas examinadas. Esto es posible empleando objetivos a gran distancia focal que permiten el estudio de las colonias desarrolladas sobre medios sólidos translúcidos.

Pero, aunque a veces sea posible clasificar una cepa en base a criterios morfológicos completamente evidentes, éstos no son suficientes para establecer una determinación correcta y es indispensable considerar otros caracteres (Lechevalier *et al.*, 1980).

4.2.1.2.- Quimiotaxonomía

El estudio de los constituyentes mayoritarios de la pared celular de los actinomicetos tiene una importancia taxonómica considerable. De esta forma se muestra que estos microorganismos se pueden dividir en ocho tipos, de los cuales los más frecuentes son los cuatro primeros.

Los actinomicetos con paredes celulares del tipo I poseen principalmente ácido diaminopimérico de la forma L, mientras que la forma *meso* de este mismo ácido es característica de los tipos II, III y IV. Por otra parte, la presencia o ausencia de cuatro azúcares, arabinosa, galactosa, xilosa y madurosa, en los hidrolizados ácidos de células enteras permite clasificar los actinomicetos de los tipos II, III y IV que contienen ácido *meso*-diaminopimérico (Ver Tablas 5 y 6).

Tabla 5: Tipos de pared celular según sus constituyentes mayoritarios (Lechevalier y Lechevalier, 1980)

Tipo de Pared	Constituyentes distintivos mayoritarios	Ejemplo de géneros
I	L-DAP, glicina	<i>Streptomyces</i>
II	Meso-DAP, glicina	<i>Micromonospora</i>
III	Meso-DAP	<i>Actinomadura</i>
IV	Meso-DAP, arabinosa, galactosa	<i>Nocardia</i> , <i>Saccharopolyspora</i>
V	Lisina, ornitina	<i>Actinomyces</i>
VI	Acido aspártico y galactosa	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, glicina	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornitina	<i>Cellulomonas</i>

Para completar los caracteres citados se han utilizado otros caracteres químicos. Es el caso de los fosfolípidos de la membrana, de los ácidos micólicos y de las menaquinonas. Se han definido de este modo cinco perfiles fosfolipídidos característicos de los actinomicetos (Lechevalier *et al.*, 1980), así como cuatro perfiles basados en los tipos de ácidos grasos presentes en estos fosfolípidos.

Tabla 6: Tipos de pared celular y tipos glucídicos de los actinomicetos aerobios con *meso*-DAP (Lechevalier y Lechevalier, 1980)

Tipo de pared	Constituyentes distintivos mayoritarios	Tipo glucídico celular	Constituyentes glucídicos característicos
II	Glicina	D	Xilosa, arabinosa
III	Ninguno	B	Madurosa
		C	Ninguno o ramnosa
IV	Arabinosa, galactosa	A	Arabinosa, galactosa

Los ácidos micólicos (3-hidroxi-ácidos grasos con un sustituyente alifático de cadena moderadamente larga en la posición 2) son únicos y característicos constituyentes de la pared celular de los géneros *Nocardia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Tsukamurella*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, *Skermania* y *Williamsia*. Los únicos actinomicetos que contienen ácidos micólicos pertenecen al suborden *Corynebacterineae* al que pertenecen todos los microorganismos estudiados en el presente trabajo. Los ácidos micólicos tienen un amplio rango de longitudes, un número variable de dobles enlaces y grupos funcionales dependiendo de las especies o del género (Baba *et al.*, 1997, Nishiuchi *et al.*, 1999). Están unidos covalentemente a una molécula de arabinosa del arabinogalactano. Este polímero está unido a su vez a una molécula de ácido N-glucolilmurámico. El modelo propuesto por Minnikin para la estructura de la cubierta celular los mycolata está descrito en el trabajo de Sutcliffe (1998). En este modelo, los ácidos micólicos pueden llegar al 30% del peso de la pared celular (Figura 1).

La detección de ácidos micólicos se realiza por cromatografía en capa fina (Hecht *et al.*, 1976, Minnikin *et al.*, 1980, Cardinali *et al.*, 1995) y por HPLC y cromatografía de gases (Chou *et al.* 1998, Baba *et al.*, 1997). Recientes estudios han demostrado que el medio de cultivo puede influir en el perfil de ácidos micólicos en micobacterias (Wick *et al.*, 2002) y en nocardioformes (Stratton *et al.*, 1993, Stratton *et al.*, 1997, Sokolovská *et al.*, 2003).

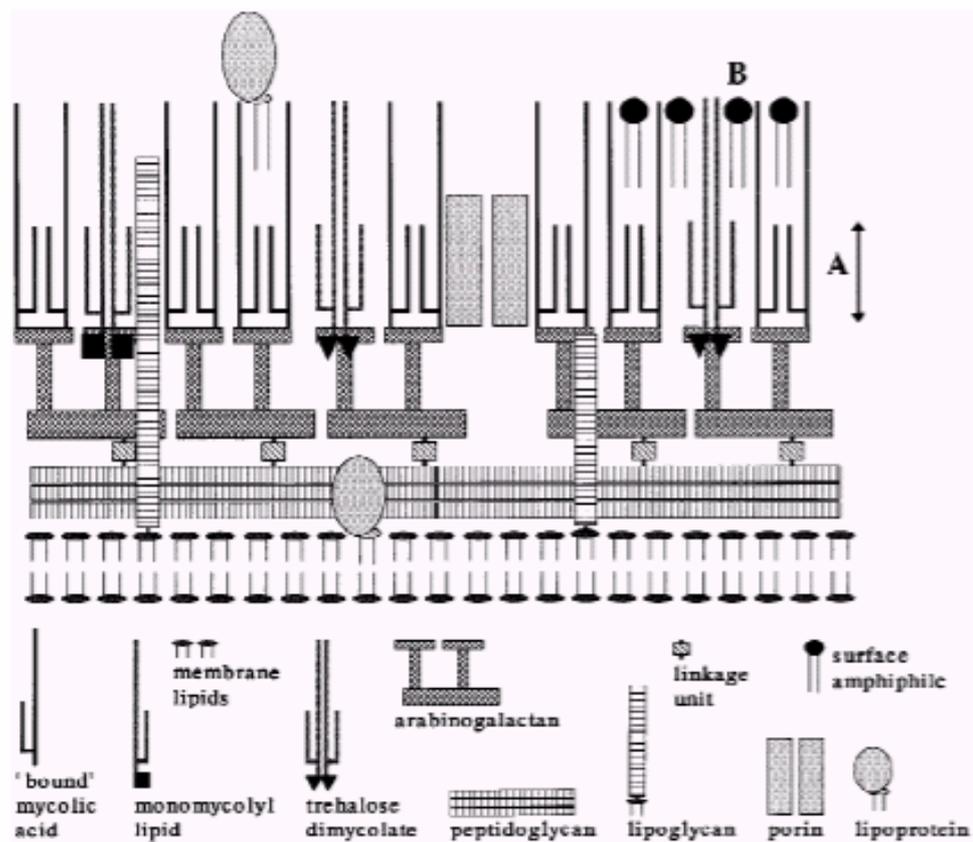


Figura 1: Modelo propuesto por Minnikin para la cubierta de los mycolata (Sutcliffe, I. C., 1998)

4.2.2.- Métodos fenotípicos

Debido a la lentitud de crecimiento de la mayoría de actinomicetos nocardioformes es de gran interés disponer de métodos que nos permitan obtener resultados en el menor tiempo posible para poder actuar cuando aparezcan problemas operacionales en las plantas de fangos activos. Los

métodos clásicos de identificación y caracterización son demasiado lentos y tediosos para ofrecer una utilidad práctica en este tipo de procesos. A modo de ejemplo, los principales sistemas de identificación de especies de *Nocardia* son los test de Gordon y de Goodfellow que utilizan 40 y 150 caracteres fenotípicos respectivamente (Goodfellow *et al.*, 1989). Los sistemas miniaturizados e informatizados ofrecen rapidez en el sentido de que realizan muchas pruebas bioquímicas en poco tiempo pero no dejan de ser sistemas dependientes de cultivo.

4.2.2.1.- Sistemas miniaturizados

Los sistemas miniaturizados son de gran ayuda en microbiología por su rapidez, fiabilidad y la gran cantidad de pruebas bioquímicas que se pueden realizar en poco tiempo y con un bajo coste. Por desgracia no existe ningún sistema miniaturizado específico para actinomicetos nocardioformes, no obstante se han empleado diversos sistemas para la caracterización de cepas aisladas en fangos activos.

La firma BioMérieux ofrece distintos sistemas para identificar microorganismos, algunos de los cuales se han utilizado frecuentemente en actinomicetos nocardioformes. El sistema API Coryne, basado en la fermentación de carbohidratos, está diseñado para corynebacterias y en su banco de datos incluye *Rhodococcus equi* pero no incluye las bacterias filamentosas de los géneros *Nocardia* y *Gordonia*.

El sistema API ZYM, basado en actividades enzimáticas, no está diseñado para ningún grupo de microorganismos específico y ha sido ampliamente utilizado para caracterizar actinomicetos nocardioformes

(Soddell y Seviour, 1994, Boiron y Provost, 1990, Chun *et al.*, 1997, Godreuil *et al.*, 2003).

Para evaluar la utilización de fuentes de carbono se han utilizado principalmente los sistemas API ID 32C y API 20C AUX. El sistema API ID 32C diseñado originariamente para levaduras incluye más substratos que el API 20C AUX y ha sido utilizado para caracterizar actinomicetos nocardioformes de interés clínico (Muir y Pritchard, 1997).

El sistema MicroLog (Biolog, Inc. USA) dispone de tests metabólicos rápidos para diversos grupos microbianos como Gram-positivos, Gram-negativos, levaduras y mohos filamentosos. Este test se presenta en forma de microplacas conteniendo cada una 95 pruebas de utilización de carbohidratos. La lectura de la microplacas se realiza mediante un lector óptico de manera que los datos obtenidos son objetivos. Cuando un microorganismo utiliza un carbohidrato se produce el proceso de respiración que reduce el tetrazolio a formazán de manera que aparece un color púrpura. Para los organismos filamentosos el tetrazolio es tóxico de manera que estas placas no llevan este producto y en este caso la lectura se realiza midiendo la turbidez de cada pocillo.

Actualmente, la base de datos de las especies microbianas del sistema Microlog es extensa. Incluye especies de *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* pero no incluye ninguna especie de *Nocardia*. La especie *G. amarae* tampoco esta incluida en la base de datos. En cualquier caso el sistema se puede utilizar para obtener un patrón único que resultará de la lectura de 95 pruebas bioquímicas con un resultado que puede ser positivo o negativo de manera que se puede obtener un perfil

bioquímico entre 2^{95} combinaciones posibles. Este perfil se puede guardar en el sistema para usarlo como referencia cuando se requiera.

4.2.3.- Métodos genotípicos

De los métodos moleculares disponibles los mejores son aquellos que no dependen de cultivo. Entre éstos se puede destacar la técnica de la PCR que se puede realizar directamente de la muestra si los cebadores diseñados son suficientemente específicos. De los métodos moleculares no dependientes de cultivo el que más información aporta es, sin lugar a dudas, el FISH, ya que combina técnicas morfológicas con la especificidad de las técnicas moleculares.

4.2.3.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las bases para el método de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos fueron descritas por Kleppe *et al.* (1971), quienes describieron una síntesis extensiva de DNA catalizada por DNA polimerasas en la reparación de la replicación. Pero fue K. Mullis, científico de la compañía Cetus, quien en 1983 desarrolló un proceso de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos, apoyándose en la teoría de la síntesis automatizada de oligonucleótidos, patentándose la técnica en 1987. En 1991, la empresa Hoffmann La Roche adquirió la patente, así como los derechos de la PCR y en 1993, Mullis, autor inicial de la idea, recibió el Premio Nobel de Química.

La PCR es un proceso de amplificación enzimática *in vitro* del DNA o RNA, iniciada por unos fragmentos cortos de DNA llamados iniciadores o cebadores (primers). Este proceso se lleva a cabo cíclicamente. Cada ciclo

está dividido temporalmente en tres fases térmicas: desnaturalización de la doble cadena de DNA, acoplamiento o unión de los iniciadores y polimerización mediante la adición de dNTPs por la enzima *Taq* polimerasa. Los productos de la PCR, llamados amplicones, se detectan normalmente por electroforesis en gel de agarosa y se visualizan bajo luz ultravioleta.

Debido a su sencillez, sensibilidad y rapidez, su uso en laboratorios clínicos ha supuesto una revolución en el concepto de la detección de patógenos. Muchos problemas derivados de la detección mediante las técnicas tradicionales pueden obviarse mediante la PCR, lo que ha hecho que esta técnica suponga una alternativa muy eficaz en microbiología. Además, la versatilidad de esta técnica ha permitido su aplicación a otros campos de interés económico, como la identificación genética, la medicina forense o el control de calidad en las industrias.

Recientemente el proceso de PCR se ha automatizado, permitiendo además la cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real. Esta nueva técnica conocida como "Real-Time PCR" no requiere el análisis posterior de la muestra, evitando contaminaciones y minimizando el tiempo de análisis de las muestras. Esta técnica se ha usado para cuantificar poblaciones microbianas en fangos activos (Hall *et al.*, 2002, Dionisi *et al.*, 2003).

En algunos casos para la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra basta con el tratamiento por ebullición para conseguir la lisis celular. En general, la mayoría de protocolos para la extracción de ácidos nucleicos en bacterias Gram-positivas utilizan la lisozima seguida de la proteinasa k y la purificación con fenol-cloroformo. Los sistemas comerciales para la

extracción y purificación del DNA incorporan, además de los reactivos ya preparados, unas columnas con filtros de polipropileno que facilitan la labor.

Para poder diseñar los iniciadores es necesario conocer la secuencia del fragmento o gen de DNA o RNA que se va amplificar. En muchos casos conocer la secuencia completa del organismo que nos interesa es un proceso caro y difícil, por lo que se recurre a información generada por otros investigadores y almacenada en los numerosos bancos de datos para esta finalidad. La información generada por los genetistas, al secuenciar y analizar las secuencias de DNA para determinar las relaciones entre los diferentes grupos bacterianos, basándose en las diferencias en sus secuencias, se utiliza para identificar organismos a nivel de especie. De los tres genes que forman el rRNA, son el 16S y el 23S los que se estudian para establecer diferencias entre microorganismos. El 5S es demasiado corto (150-200 pb) para ser relevante como portador de variaciones genéticas entre bacterias. La recopilación de varias secuencias del 16S y del 23S en los bancos de datos es una excelente ayuda a los investigadores en el desarrollo de iniciadores para la detección mediante PCR.

La PCR ha sido aplicada con éxito para caracterizar actinomicetos nocardioformes principalmente en muestras clínicas. En el caso del género *Nocardia* se disponen de iniciadores específicos de género (Laurent *et al.*, 2000) que son de gran utilidad para el diagnóstico de casos de nocardiosis.

El análisis de enzimas de restricción (REA) de la porción de 65-kDa de la proteína de stress térmico (HSP) se ha utilizado con éxito para diferenciar especies de *Nocardia* incluso dentro del complejo *N. asteroides* (Steingrube *et al.*, 1995).

A la rapidez de la técnica se puede añadir, además, la posibilidad de detectar varias especies o varios genes de una misma especie a la vez en una misma muestra, lo que se conoce como PCR múltiple, utilizando varios pares de iniciadores en una misma reacción de amplificación (Cormican *et al.*, 1995, Cheng *et al.*, 2004).

Otra modificación de la PCR es la “nested PCR”, que consiste en una doble amplificación con dos parejas de iniciadores, en donde la segunda pareja reconoce y amplifica una región interna del primer producto amplificado siendo así de mayor sensibilidad y especificidad, especialmente útil en el caso de muestras ambientales. Esta técnica se ha utilizado para identificar *N. restricta* en monumentos de piedra biodegradados (Palla *et al.*, 2002).

Recientemente se ha empleado esta técnica para amplificar un elemento extragénico repetitivo para detectar *N. asteroides* en diferentes ambientes (Yamamura, H. *et al.*, 2004).

4.2.3.2.- PCR-RFLP

Esta técnica se basa en la amplificación específica del gen que codifica para el 16S o 23S rRNA y la posterior digestión del fragmento amplificado mediante uno o varios enzimas de restricción. Su poder discriminatorio no llega a ser tan alto como el de otras técnicas, tales como el PFGE (campo pulsante), pero es una técnica rápida y sencilla apropiada para estudios epidemiológicos. En la mayoría de los estudios es la región 16S la que se examina, debido a que es una región altamente conservada y propicia para el diseño de iniciadores universales que amplifican regiones

con un número variable de pares de bases en función de la especie (Ludwig y Schleifer, 1994).

En el caso de nocardioformes, varios son los autores que han utilizado el gen que codifica para el 16S rRNA con el fin de realizar estudios taxonómicos y de describir aislados nuevos (Conville *et al.*, 2000). Esta técnica es muy adecuada para efectuar estudios taxonómicos en cepas de lento crecimiento y difícil aislamiento y también para bacterias no cultivables (Schuppler *et al.*, 1995). En el caso de nocardias patógenas la técnica de la PCR-16S es de gran utilidad por su rapidez y reproducibilidad (Conville *et al.*, 2000).

4.2.3.3.- Hibridación *in situ* con sondas marcadas con fluorocromos (FISH)

La hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos de DNA marcadas con fluorocromos (FISH) ha sido una técnica común para la detección e identificación de microorganismos en diferentes ambientes microbianos, incluyendo comunidades mixtas (Amann *et al.*, 1995).

Esta técnica, basada en la hibridación directa de la bacteria con una sonda complementaria de una región del 16S o 23S rRNA, es una excelente herramienta para la detección, ya que cada microorganismo posee un número elevado de copias de moléculas de rRNA a la que se puede unir una sonda, produciendo una amplificación de la señal. Este método presenta ventajas sobre otros como la hibridación de DNA y la detección con anticuerpos al no necesitar el cultivo previo de la bacteria ni la extracción de los ácidos nucleicos, además la hibridación inespecífica con otros

microorganismos presentes en la muestra no es habitual y por tanto no se dan como resultado falsos positivos. Otro aspecto positivo de la técnica es que no parecen existir sustancias inhibitoras que interfieran en la reacción de hibridación. Mediante la técnica FISH podemos obtener información que no ofrecen otros métodos, como son la morfología, el número y la distribución espacial de la bacteria en el medio en el que se encuentra.

La mayor limitación del método es la sensibilidad, que depende del número de ribosomas existentes, de la penetración de la propia sonda y de la matriz donde estemos hibridando, ya que en muchos casos matrices complejas hacen necesario un tratamiento previo de la muestra. El medio utilizado para el crecimiento bacteriano, los métodos de fijación de la bacteria y los agentes utilizados para embeber la muestra antes de visualizarla parecen ejercer una importante influencia en la intensidad de la señal. La accesibilidad de la sonda al rRNA es distinta según la molécula de rRNA de que se trate (23S o 16S) y la zona del mismo de la que sea complementaria, lo que hay que tener en cuenta para el diseño de la sonda (Fuchs *et al.*, 2001). La morfología celular debe estabilizarse y las paredes y membranas celulares han de ser permeabilizadas para que la sonda penetre. Esto se lleva a cabo con fijadores que normalmente son alcoholes y aldehídos. Últimamente se han desarrollado numerosos métodos para solucionar este problema, incrementando la señal hasta 20 veces mediante una reacción enzimática de amplificación (Schönhuber *et al.*, 1997), aunque parece que las sondas marcadas mediante este sistema presentan mayores problemas de penetración en la célula.

Más reciente ha sido el desarrollo de sondas de polirribonucleótidos marcados con varias moléculas de fluorocromos, lo que incrementa

considerablemente la sensibilidad de las mismas (DeLong *et al.*, 1999). Aunque, posiblemente, la técnica más sensible desarrollada haya sido la que combina el uso de sondas de polirribonucleótidos internamente marcadas con dioxigenina con el sistema de amplificación de la tiramida (Wagner *et al.*, 1998).

En el caso de los mycolata esta técnica está limitada por la dificultad en permeabilizar las células para hacerlas accesibles a las sondas marcadas. La dificultad en la permeabilización radica en el elevado contenido en ácidos micólicos. Se han ensayado diferentes procedimientos para conseguir permeabilizar este tipo de células utilizando mutanolisina, lisozima, lipasa, proteinasa k, hidrólisis ácida con diferentes resultados (Macnaughton *et al.*, 1994, Carr *et al.*, 2003).

La parte más crítica de esta técnica es el diseño de las sondas, que deben ser lo suficientemente específicas para unirse únicamente a la bacteria que queremos detectar en presencia de otras, en muchos casos con moléculas de rRNA muy homólogas. El tamaño de las sondas oscila entre 15 y 40 pb y las más cortas son las que presentan una mayor accesibilidad al sitio de unión. Para asegurar la especificidad de las sondas los tres parámetros determinantes van a ser la temperatura, la concentración de NaCl y la concentración de formamida en el tampón de hibridación. En la mayoría de los protocolos la temperatura de hibridación se mantiene constante y es la concentración de formamida la que va a dar lugar a unas condiciones más o menos astringentes. La formamida hace que disminuya la temperatura de unión de las sondas mediante el debilitamiento de los puentes de hidrógeno, permitiendo temperaturas más bajas con concentraciones astringentes (Moter y Göbel, 2000).

Actualmente el número de fluorocromos, así como las distintas técnicas de marcaje, facilita que con una única hibridación podamos detectar varias especies o géneros en una misma muestra utilizando una sonda para cada especie, género o grupo marcada con fluorocromos distintos. Los fluorocromos de última generación emiten una señal fluorescente más intensa y son mucho más fotoestables. El marcaje directo resulta el más rápido, sencillo y barato. En éste, el fluorocromo se une covalentemente al extremo 5' mediante una técnica rutinaria que no requiere un gasto excesivo.

A pesar de la validación teórica de una sonda, la especificidad y la eficacia de la hibridación debe ser extensamente evaluada para definir su utilidad (Amann *et al.*, 1995). Estas pruebas empíricas son laboriosas y requieren un consumo de tiempo importante. Han sido numerosas las sondas que se han diseñado por comparación de secuencias de rRNA en los bancos de datos para la detección de patógenos humanos tales como *Salmonella* (Lin y Tsen, 1995), *Yersinia* (Trebesius *et al.*, 1998), *Legionella* (Grimm *et al.*, 1998), *Campylobacter* en aguas y biopelículas (Buswell *et al.*, 1998) y *Arcobacter* en fangos activos (Snaidr *et al.*, 1997). Esta técnica es de gran utilidad para detectar nocardioformes causantes de foaming en plantas depuradoras con sistemas de fangos activos (Schuppler *et al.*, 1995, Schuppler *et al.*, 1998, de los Reyes *et al.*, 2002, Carr *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

La depuración de aguas residuales por el sistema de fangos activos es un proceso biotecnológico donde intervienen multitud de parámetros operacionales, todos ellos interrelacionados. Tradicionalmente se han controlado los parámetros físico-químicos como si de un sistema inerte se tratara aunque actualmente se conoce el papel crucial que realizan los microorganismos.

Según se ha explicado en la introducción, el crecimiento indeseado de actinomicetos filamentosos productores de ácidos micólicos puede interferir seriamente en el funcionamiento correcto del sistema de fangos activos. En muchas plantas de tratamiento europeas, australianas y americanas se han estudiado con detalle estos microorganismos. En las plantas de tratamiento españolas no existe ningún estudio que vaya más allá de la observación microscópica de la muestra de fango activo.

Por lo tanto, en el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Puesta a punto de métodos de aislamiento de actinomicetos nocardioformes de lento crecimiento: selección de medios de cultivo y ensayos de descontaminación.
- 2.- Utilización de sistemas rápidos miniaturizados para caracterizar las especies más importantes productoras de espumas.

OBJETIVOS

- 3.- Detección de nocardioformes procedentes de distintas muestras mediante la técnica PCR. Diseño de iniciadores y puesta a punto de la técnica.
- 4.- Puesta a punto de técnicas de permeabilización de mycolata como paso previo a la hibridación "*in situ*" con sondas fluorescentes (FISH).
- 5.- Detección directa por FISH en muestras ambientales.

En consecuencia, el objetivo general será la puesta a punto de un protocolo de aislamiento, identificación y detección de actinomicetos nocardioformes formadores de espumas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Cepas bacterianas de referencia

En este trabajo se han utilizado un total de 19 cepas de referencia suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Esta colección de cepas contiene especies pertenecientes a todas las familias del suborden *Corynebacterineae*. Entre las cepas del género *Gordonia* se encuentra la especie *G. amarae* que es la especie aislada con más frecuencia en muestras de espuma. De los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus* se incluyen las especies patógenas *N. asteroides* y *R. equi*. En la tabla 7 se muestra la relación de cepas de referencia utilizadas.

Todas las cepas se incubaron en medio YEME en condiciones de aerobiosis de 3 a 10 días dependiendo de la cepa. En el caso de *Skermania piniformis* se utilizó el medio 180 (Anexo I) según recomienda la CECT. Esta especie necesita un tiempo de incubación de 20-25 días para obtener colonias visibles. Todas las cepas se mantuvieron en crioviales con caldo nutritivo con un 20% de glicerol a -20°C . Antes de proceder a su congelación, así como después de recuperar una cepa, se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción Gram. Los cultivos crecidos en agar inclinado se mantuvieron durante varias semanas a 4°C .

2.- Caracterización de las cepas fenotípicamente

2.1.- Sistemas miniaturizados API ZYM y API ID 32C

El sistema API ZYM permite determinar la presencia de 19 enzimas microbianos y ha sido empleado por diversos autores para caracterizar

especies de mycolata (Boiron y Provost, 1990; Soddell y Seviour, 1994; Khan *et al.*, 1999). El sistema API ID 32C, diseñado para identificar levaduras, se basa en la utilización de 31 fuentes de carbono. Este sistema ha sido utilizado para caracterizar actinomicetos aerobios de interés clínico (Muir *et al.*, 1997) por lo que se ha modificado el protocolo indicado por el fabricante en cuanto a temperatura y tiempo de incubación para adaptarlo a cepas de actinomicetos ambientales

Tabla 7: Cepas de referencia utilizadas

Bacteria	Número de la CECT
<i>Corynebacterium xerosis</i>	4160
<i>Dietzia maris</i>	4617
<i>Gordonia amarae</i>	5704
<i>Gordonia rubropertincta</i>	5393
<i>Gordonia terrae</i>	5707
<i>Mycobacterium komossense</i>	3034
<i>Nocardia asteroides</i>	3051
<i>Nocardia brasiliensis</i>	3052
<i>Nocardia carnea</i>	3374
<i>Nocardia farcinica</i>	3053
<i>Nocardia nova</i>	3056
<i>Nocardia soli</i>	3375
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	5751
<i>Rhodococcus equi</i>	555
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	3013
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	5750
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	5749
<i>Skermania piniformis</i>	3057
<i>Tsukamurella paurometabola</i>	3055

Para inocular las tiras API ZYM y API ID 32C se preparan tubos con suero fisiológico que contienen perlas de vidrio que ayudan a disgregar el micelio y obtener suspensiones homogéneas. Para inocular las tiras API ZYM se realiza una suspensión de la bacteria hasta la escala 5 de McFarland, se inoculan los pocillos y se incuban durante 4 horas a 37°C. La lectura se realiza añadiendo los reactivos ZYM A y ZYM B. Al cabo de 5-10 minutos se desarrolla el color en los pocillos y se compara con la tabla de colores suministrada por el fabricante. La escala de intensidad es de 0 a 5. Para tonalidades superiores a 2 se considera la prueba positiva. Para tonalidades inferiores a 2 la prueba se considera negativa. Cuando la intensidad producida está en torno a 2 la prueba se considera débil (W).

Para las tiras API ID 32C se ha estandarizado un protocolo para adaptarlo a cepas ambientales. En este caso se realiza una suspensión homogénea hasta la escala 2 de McFarland y se transfieren 250 µl al Medio C proporcionado por el fabricante. Con el Medio C homogeneizado se inoculan 175 µl en cada pocillo y se incuban en atmósfera húmeda para evitar la desecación de los pocillos. Se realizan lecturas a los 7 y 10 días comparando el grado de turbidez con el pocillo control.

2.2.- Microlog (Biolog)

El sistema Microlog (Biolog, Inc. USA) consiste en un test de utilización de fuentes de carbono en una placa multipocillos conteniendo cada pocillo un carbohidrato deshidratado. En bacterias, el proceso de respiración reduce el tetrazolio y en aquellos pocillos donde se produce crecimiento aparece un color púrpura. Para bacterias filamentosas, las microplacas no contienen tetrazolio porque es tóxico para muchas especies. En este caso el crecimiento es detectado por el incremento de turbidez en el

pocillo. En ambos casos las microplacas se leen con un lector de fibra óptica obteniendo una lectura objetiva.

Para los géneros incluidos en la base de datos del sistema *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Tsukamurella*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium* se han seguido las instrucciones del fabricante (Tabla 8). Básicamente las cepas se incubaron en BUG (Biolog Universal Growth) suplementado con sangre a 30°C. A continuación se realizó una suspensión del 20% de turbidez en el fluido de inoculación GN/GP suplementado con tioglicolato para evitar la formación de cápsulas. Las microplacas utilizadas en este caso son las GP2 y se inocularon 150 µl en cada pocillo con una pipeta multicanal. La incubación se realizó a 30°C durante 48 h.

La base de datos del sistema Microlog no contiene especies de *Nocardia* por lo tanto se siguieron las instrucciones para bacterias filamentosas con modificaciones. En este caso las cepas se incubaron en agar YEME a 30°C durante 5-7 días. Para disgregar el micelio y obtener suspensiones homogéneas, varias colonias se suspendieron en suero fisiológico con perlas de vidrio y se agitó vigorosamente. Se dejaron unos minutos para que sedimenten las partículas sin disgregar y de esta suspensión se inoculó un tubo con carragenato al 0,2% hasta una turbidez del 60%. En este caso se utilizaron placas SFP2 inoculando en cada pocillo 100 µl. Las condiciones de cultivo fueron 30°C durante 7 días en cámara húmeda para evitar la desecación de los pocillos.

La base de datos del sistema Microlog incluye varias especies del género *Gordonia* pero la especie *G. amarae* no está incluida. Este género contiene especies filamentosas y no filamentosas de manera que hemos

Tabla 8: Condiciones de cultivo utilizadas con el sistema Microlog

Género	Medio de cultivo	Tª	Fluido de inoculación	Turbidez del inóculo	Microplaca	Tiempo de incubación
<i>Corynebacterium</i>	BUG+Sangre	30°C	GN/GP+Ti	20%	GP2 (150µl)	5 días
<i>Dietzia</i>	BUG+Sangre	30°C	GN/GP+Ti	20%	GP2 (150µl)	48 horas
<i>Mycobacterium</i>	BUG+Sangre	30°C	GN/GP+Ti	20%	GP2 (150µl)	48 horas
<i>Rhodococcus</i>	BUG+Sangre	30°C	GN/GP+Ti	20%	GP2 (150µl)	48 horas
<i>Tsukamurella</i>	BUG+Sangre	30°C	GN/GP+Ti	20%	GP2 (150µl)	48 horas
<i>Gordonia</i>	BUG+Sangre	30°C	GN/GP+Ti	20%	GP2 (150µl)	48 horas
	YEME	30°C	Carragenato 0,2%	60%	SFP2(100µl)	7 días
<i>Nocardia</i>	YEME	30°C	Carragenato 0,2%	60%	SFP2(100µl)	7 días

Abreviaturas: BUG: medio de cultivo universal del sistema Microlog; Ti: Tioglicolato

comparado el método para bacterias filamentosas (SFP2) con el método para bacterias Gram-positivas (GP2).

3.- Detección de ácidos micólicos

La detección de ácidos micólicos se ha realizado siguiendo el método propuesto por Minnikin *et al.* (1980). Las cepas se incubaron en 50 ml de medio YEME a 28°C en agitación durante 3-7 días. Para matar las bacterias se añade formol a una concentración final del 1% y se agita durante 1-2 horas. Las células se recogen por centrifugación, se realizan dos lavados y se secan en estufa a 45°C.

Para realizar la hidrólisis se pesan 50 mg de células secas en un tubo de vidrio de tapón de rosca y se añade 1 ml de metanol-tolueno-ácido sulfúrico (30:15:1) y se incuba a 70°C durante 16 horas. Se deja enfriar y se añade 1 ml de hexano. Se centrifuga para ayudar a separar las fases y el sobrenadante de hexano se recoge en otro vial y se evapora hasta sequedad con nitrógeno. El residuo se disuelve en 200 µl de dietil éter.

La cromatografía se realiza en una placa de silicagel (Merck) depositando 5 µl de cada muestra. El líquido de desarrollo utilizado es hexano-éter (85:15). El tiempo de desarrollo es de una hora aproximadamente. La placa se saca de la cubeta y se revela pulverizando ácido fosfomolibdico (Sigma) al 10% en etanol. A continuación se calientan a 110°C durante 10-15 minutos. Los lípidos se ven como manchas azules sobre fondo amarillo. Todas las manchas con un Rf comprendido entre 0,2 y 0,5 son metil ésteres de los ácidos micólicos. Las manchas con un Rf

superior a 0,6 corresponden a metil ésteres de ácidos grasos monohidroxilados (Minnikin *et al.*, 1980)

Como control negativo se utilizan las cepas *Streptomyces albus* CECT 3077 y *Pseudonocardia autothrophyca* CECT 3044.

4.- Preparación de muestras para el microscopio electrónico

4.1.- Fijación de células

Para ser observadas al microscopio electrónico de barrido (SEM) las células deben ser fijadas para transformarlas en estructuras estáticas y rígidas. Esto se consigue con la fijación con tetróxido de osmio y glutaraldehído.

Las células se cultivan en medio líquido durante 3-5 días. Se centrifuga 1 ml de cultivo en un eppendorf y se resuspenden en 500 µl de tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 (Anexo IV). Se centrifuga, se elimina el sobrenadante y se añaden 100 µl de tetróxido de osmio al 2% (Aldrich) y 100 µl de glutaraldehído (Sigma) al 6%. El glutaraldehído mata las bacterias y produce uniones cruzadas entre polímeros orgánicos aumentando la resistencia de las estructuras (Robards *et al.*, 1998). Para favorecer la fijación se mantienen 24 horas en refrigeración y posteriormente se realizan dos lavados con tampón fosfato 0,1 M pH 7,2. Finalmente las células fijadas se resuspenden en el mismo tampón y se conservan a 4° C.

4.2.- Preparación

La preparación consiste en depositar las muestras en unas membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 0,2 μm de diámetro colocadas sobre un papel de filtro empapado en tampón fosfato 0,1M pH 7,2. Posteriormente se corta un pequeño cuadrado de 3 a 4 mm y se deposita en el tornillo portamuestras de cobre y se adhiere con el Tissue Freezing Medium (Triangle Biomedical Sciences). La muestra se somete a una congelación y sublimación y, posteriormente, se sombrea con oro. Las muestras se han estudiado en un microscopio electrónico de barrido modelo Jeol JSM-5410.

5.- Caracterización de las cepas genotípicamente

5.1.- Extracción de DNA

Los nocardioformes filamentosos forman agrupaciones de hifas fuertemente unidas que es necesario disgregar para conseguir rendimientos adecuados en la extracción de DNA. Además, muchas especies crecen fuertemente adheridas al agar debido al micelio de sustrato que producen. En este caso las cepas se cultivan en medio líquido en agitación a 28°C durante 3-5 días, se recogen las células por centrifugación se lavan y se homogeneizan en tampón TE en un tubo de vidrio con tapón de rosca con perlas de vidrio para deshacer agregados de hifas. Estas células se someten a dos pasos de congelación para ayudar a romper la pared.

En las cepas que no forman micelio y que no se adhieren al agar se puede suspender las células directamente del medio sólido en tampón TE sin perlas de vidrio.

Una vez suspendidas en tampón TE (500 μ l), las células se lisan añadiendo 100 μ l de lisozima (50 mg/ml) y se incuba durante 30 minutos a 37°C agitando cada 5-10 minutos en vortex para deshacer agregados y facilitar la acción de la lisozima. Posteriormente se añaden 30 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml). Se agita y se incuba 1 hora a 37°C.

Pasado este tiempo se añaden 100 μ l de NaCl 5 M, se agita y se añaden 80 μ l de una solución de CTAB/NaCl, se agita bien en vortex y se incuba a 65°C durante 10 minutos.

La purificación del DNA se realiza añadiendo un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) equivalente al del volumen anterior (700 μ l), se agita y se centrifuga a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar los complejos formados por el CTAB. El sobrenadante se transfiere a un nuevo microtubo eppendorf y se añade un volumen equivalente de fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico (25:24:1). Se agita bien y se centrifuga para eliminar los restos de complejos con el CTAB (proteínas y polisacáridos).

El sobrenadante, que contiene los ácidos nucleicos, se transfiere a otro eppendorf y se le añaden 300 μ l de isopropanol para precipitar el DNA. El DNA precipitado se centrifuga para eliminar el isopropanol y se añaden 500 μ l de etanol al 70% agitando suavemente. Finalmente, se centrifuga

para eliminar el etanol, se seca y se resuspende en 50 µl de tampón TE. Para eliminar los restos de RNA extraído se añade 1 µl de RNAsa (25 mg/ml). Se puede realizar un gel de comprobación de extracción o, lo que es más preciso, cuantificar midiendo la razón entre absorbancia a 260 nm y 280 nm. El DNA absorbe a 260 nm y las proteínas a 280 nm de manera que valores comprendidos entre 1,8 y 1,9 son aceptables. El DNA puede conservarse 48 horas a 4°C o varios meses a -20°C.

El método de extracción de DNA propuesto por Torres *et al.* (1996) para especies de *Nocardia* patógenas también se ha ensayado en el presente trabajo. El protocolo es similar al anterior con las siguientes diferencias: después de la incubación de la muestra con SDS y proteinasa K, se añaden dos volúmenes de tampón Tris (pH 8) saturado con fenol, se agita, se centrifuga y se transfiere la fase acuosa a un nuevo eppendorf. La purificación del DNA se realiza primero con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y después con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La precipitación del DNA y posterior lavado se realiza según el método del CTAB descrito anteriormente.

5.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.2.1.- *Nocardia*

En el caso de *Nocardia* se utilizaron los iniciadores descritos por Laurent *et al.* (2000), que amplifican una región de 596 pb del gen 16S rRNA. Estos iniciadores han sido usados para identificar especies de *Nocardia* de interés clínico. El iniciador NG1 (5´-ACC GAC CAC AAC GGG G-3´) se corresponde con los nucleótidos 966 a 982 y el reverso

MATERIAL Y MÉTODOS

NG2 (5'-GGT TGT AAA CCT CTT TCG A-3') con los nucleótidos 386 a 405. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50 μ l conteniendo 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada nucleótido, 1 μ M de cada iniciador y 1 U del enzima *Taq* polimerasa (Ecogen). En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua estéril y como control positivo se utilizó DNA de *N. asteroides*. La reacción de PCR se realizó en un termociclador automático (Techne-Progene).

La reacción de amplificación consiste en un primer paso de desnaturalización (94°C - 11 min.) seguido de 30 ciclos compuestos de una desnaturalización (94°C - 1 min.), unión de iniciadores (55°C - 20 s) y elongación (72°C - 1 min.). Para terminar se produce un ciclo final de extensión (72°C - 10 min.).

1 ciclo	94°C	11 min.	Desnaturalización
30 ciclos	94°C	1 min.	Desnaturalización
	55°C	20 s	Unión de iniciadores
	72°C	1 min.	Elongación
1 ciclo	72°C	10 min.	Extensión

Los productos generados por la PCR (10 μ l) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa) al 1% en tampón TAE 1X, sometido a 100 V durante 60 minutos. Los fragmentos de DNA se visualizaron con un transiluminador de UV tras teñirlos con bromuro de etidio. Con este fragmento amplificado se realiza una digestión con enzimas de restricción. Los enzimas utilizados son: *Hpa* II, *Hin* I, *Bst*E II, *Bam*HI, *Mbo* II, *Hpy*F10, *Acs* I, *Taq* I, *Hae* II, *Dra* II (Roche).

5.2.2.- Amplificación del gen de la proteína HSP y análisis con enzimas de restricción (PCR-RFLP-HSP)

La amplificación del gen que codifica para la proteína de estrés térmico de 65-kDa (HSP) y su posterior análisis de los sitios de restricción fue propuesta por Telenti *et al.* (1993) como un método rápido para identificar micobacterias a nivel de especie.

Diversos autores (Steingrube *et al.*, 1997, Wilson *et al.*, 1998) han utilizado el método propuesto por Telenti para identificar actinomicetos aerobios a nivel de especie de interés clínico. Steingrube *et al.* (1995) utilizó este método para diferenciar especies dentro del género *Nocardia*.

Los iniciadores propuestos por Telenti *et al.* (1993), Tb11 (5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT) y Tb12 (5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT) amplifican un fragmento de 439 pb entre las posiciones 398 y 836 de la secuencia del gen de estrés térmico. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 µl conteniendo 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de de cada nucleótido, 1µM de cada iniciador y 1 U de *Taq* polimerasa.

En este caso la amplificación consiste en 45 ciclos compuestos de un paso de desnaturalización (94°C – 1 min.), unión de iniciadores (55°C – 1 min.) y elongación (72°C - 1min.). Al final se produce un único ciclo final de extensión (72°C - 10 min.).

45 ciclos	94°C	1 min.	Desnaturalización
	55°C	1 min.	Unión de iniciadores
	72°C	1 min.	Elongación
1 ciclo	72°C	10 min.	Extensión

Por electroforesis se comprueba la amplificación del fragmento de 439 pb y a continuación se realiza la digestión con enzimas de restricción. Los enzimas utilizados son: *Hpa* II, *Hin* I, *Bst*E II, *Bam*HI, *Mbo* II, *Hpy*F10, *Acs* I, *Taq* I, *Hae* II, *Dra* II (Roche).

5.2.3.- *Gordonia*

En el caso de *Gordonia* se diseñaron unos iniciadores específicos a nivel de género. La especificidad se comprobó mediante alineamiento con las secuencias de la base de datos del programa BLAST. El primero de los iniciadores G1 (5'-CGC GTC GTC TGT GAA ATT CT-3') se corresponde con los nucleótidos 551 a 570 y el segundo iniciador reverso G2 (5'- CTC CTG CAA GTC CCC GGC ATA ACC C-3') se corresponde con los nucleótidos 1090 a 1114 (según la numeración del gen 16S del rRNA de *Gordonia amarae*) por lo tanto el fragmento amplificado tiene un tamaño de 563 pb. Se utilizaron las cepas de referencia *G. amarae*, *G. rubropertincta* y *G. terrae* como control positivo y en la puesta a punto de la reacción de PCR.

Las condiciones óptimas de la PCR se establecieron probando diferentes concentraciones de MgCl₂ y diferentes temperaturas de unión de los iniciadores. La reacción se realizó en un volumen total de 50 µl conteniendo 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada nucleótido, 1 µM de cada

iniciador y 1 U del enzima *Taq* polimerasa (Ecogen). En cada reacción de amplificación se incluyó un control negativo en el que el DNA se reemplazó por agua estéril y como control positivo DNA de *G. amarae*.

A continuación se realizó la reacción de amplificación que comenzó con un paso inicial de desnaturalización (94°C - 5 min.), seguido de 35 ciclos compuestos de una desnaturalización (94°C - 1 min.), unión de iniciadores (66°C – 1 min.) y elongación (72°C – 1 min.). Por último se produce un ciclo final de extensión (72°C – 10 min.).

1 ciclo	94°C	5 min.	Desnaturalización
35 ciclos	94°C	1 min.	Desnaturalización
	66°C	1 min.	Unión de iniciadores
	72°C	1 min.	Elongación
1 ciclo	72°C	10 min.	Extensión

Los productos generados se analizaron después de realizar una electroforesis en las mismas condiciones descritas para *Nocardia*.

5.2.4.- *Rhodococcus*

El género *Rhodococcus* se encuentra frecuentemente en fangos activos pero no suele causar espumas estables debido a la escasa capacidad de formar filamentos.

De las especies de *Rhodococcus* que han sido descritas, *R. equi* tiene mayor significado clínico como patógeno en animales y humanos. En

los últimos años se ha producido un aumento de infecciones por esta especie en inmunodeprimidos (Prescott, 1991, McNeil y Brown, 1994).

Para detectar *R. equi* se han utilizado los iniciadores propuestos por Bell *et al.* (1996), que amplifican un fragmento de 450 pb del 16S rRNA. El iniciador Rq1 (5'-GGT CTA ATA CCG GAT ATG AGC TCC TGT C-3') es complementario de los nucleótidos 156 a 183 y el reverso Rq2 (5'-CGC AAG CTT GGG GTT GAG CCC CAA-3') de los nucleótidos 582 a 605. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50 µl conteniendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleótido, 1µM de cada iniciador y 1 U de la enzima *Taq* polimerasa (Ecogen). Igual que en los casos anteriores se incluyó un control negativo en el que se sustituyó el DNA por agua estéril y DNA de *R. equi* como control positivo.

La reacción de amplificación comienza con una desnaturalización (94°C - 10 min.) seguida de 35 ciclos compuestos de una desnaturalización (94°C - 30 s), unión de iniciadores (64°C - 30 s) y elongación (74°C - 1 min.). Un ciclo de extensión final (74°C - 10 min.) finaliza con la reacción de amplificación (Bell *et al.*, 1996).

1 ciclo	94°C	10 min.	Desnaturalización
35 ciclos	94°C	30 s	Desnaturalización
	64°C	30 s	Unión de iniciadores
	74°C	1 min.	Elongación
1 ciclo	74°C	10 min.	Extensión

Otra de las especies para la que hay iniciadores descritos es *R. erythropolis* (Bell *et al.*, 1999) que ha sido aislada en muestras de espuma. *R. erythropolis* es considerada como una especie no filamentosa productora de espumas (Soddell *et al.*, 1998). En este caso el producto amplificado es un fragmento de 449 pb del 16S rRNA. El iniciador Re1 (5'-CGT CTA ATA CCG GAT ATG ACC TCC TAT C-3') es complementario de los nucleótidos 165 a 192 y el reverso Re2 (5'-GCA AGC TAG CAG TTG AGC TGC TGG T-3') de los nucleótidos 609 a 633. La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50 µl conteniendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleótido, 1µM de cada iniciador y 1 U de la enzima *Taq* polimerasa (Ecogen).

Los ciclos de la reacción de amplificación son los mismos que para el caso de *R. equi* (Bell *et al.*, 1999). Los productos generados en las reacciones de amplificación se analizaron como en los casos anteriormente descritos.

No han sido descritos iniciadores específicos a nivel de género *Rhodococcus*, por lo que se han diseñado unos iniciadores específicos a nivel de género utilizando el programa informático BLAST. El iniciador Rg1 (5'-GGT CTA ATA CCG GAT ATG AGC TCC TGT C) es complementario de los nucleótidos 143 a 170 y el reverso Rg2 (5'-AGC CTC CTG CGA GTC CCC GCC ATT AC) es complementario de los nucleótidos 1093 a 1118 por lo que el producto amplificado tiene un tamaño de 980 pb.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50 µl conteniendo 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada nucleótido, 1µM de cada iniciador y 1 U de la enzima *Taq* polimerasa (Ecogen). Igual que en los

MATERIAL Y MÉTODOS

casos anteriores se incluyó un control negativo en el que se sustituyó el DNA por agua estéril y como control positivo la especie *R. rhodochrous*.

La reacción de amplificación comienza con una desnaturalización (94°C - 10 min.) seguida de 35 ciclos compuestos de una desnaturalización (94°C - 30 s), unión de iniciadores (66°C - 30 s) y elongación (74°C - 1 min.). Un ciclo de extensión final (74°C - 10 min.) termina con la reacción de amplificación (Bell *et al.*, 1996).

1 ciclo	94°C	10 min.	Desnaturalización
35 ciclos	94°C	30 s	Desnaturalización
	66°C	30 s	Unión de iniciadores
	74°C	1 min.	Elongación
1 ciclo	74°C	10 min.	Extensión

Los productos generados en estas reacciones de amplificación se analizan como en los casos anteriores.

6.- Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

6.1.- Diseño y elección de sondas

Para la detección de mycolata mediante hibridación *in situ* se han utilizado diferentes sondas de DNA con secuencias complementarias de regiones conservadas del 16S rRNA en todo el grupo de mycolata. Así mismo, se utilizaron sondas específicas para *Gordonia* tanto a nivel de género como a nivel de especie.

La sonda S^{*}-Myb-0736-b-A-22 fue diseñada por de los Reyes *et al.* (1997) para mejorar la eficacia de la sonda S^{*}-Myb-0736-a-A-22. Esta última tenía dos desapareamientos en la posición 743 (numeración correspondiente a *E. coli*) con 93 especies del grupo. La sonda S^{*}-Myb-0736-b-A-22 incorpora en la posición 743 una base análoga, el 5-Nitroindol, para reducir el efecto de estos emparejamientos erróneos. Esta sonda mejorada hibrida perfectamente con muchos organismos del grupo mycolata y sólo presenta un desapareamiento con pocas especies del grupo (de los Reyes *et al.*,1997).

La sonda S^{*}-Myc-0657-a-A-16 diseñada por Davenport *et al.* (2000), está dirigida a una región del rRNA 16S específica para todos los mycolata. Esta sonda hibrida con la gran mayoría de los mycolata, tiene un desapareamiento con 22 especies del grupo y dos emparejamientos erróneos con una especie de *Nocardia* y dos de *Rhodococcus*. Las secuencias de los organismos no-diana contienen dos o más emparejamientos erróneos con esta sonda. Las condiciones de hibridación utilizadas para esta sonda son 30% de formamida y 46°C (de los Reyes *et al.*, 1998).

Se han utilizado dos sondas para detectar el género *Gordonia* por la técnica FISH. La sonda S-G-Gor-0596-a-A-22, diseñada por de los Reyes *et al.* (1997) es específica para todas las especies del género *Gordonia* aunque tiene un desapareamiento con *G. terrae* y con *G. bronchialis*. Los organismos no-diana de esta sonda tienen dos o más emparejamientos erróneos. Las condiciones de hibridación utilizadas para esta sonda son 20% de formamida y 46°C (de los Reyes *et al.*, 1998).

La sonda S-S-G.am-0205-a-A-19 diseñada por de los Reyes *et al.* (1998) es específica para la especie *G. amarae*. Esta sonda tiene al menos dos desapareamientos consecutivos con los organismos no-diana. Las condiciones óptimas de hibridación para esta sonda son 30% de formamida y 46°C (de los Reyes *et al.*, 1998)

La sonda S-D-Bact-0338-a-A-18, complementaria de una región del rRNA 16S del dominio Eubacteria se usó como control positivo al hibridar con todas las bacterias (Amann *et al.*, 1995). Esta sonda se utilizó en la puesta a punto del método de permeabilización de los mycolata.

6.2.- Fijación y permeabilización de las cepas de referencia

La permeabilización de los mycolata presenta muchas dificultades debido al elevado contenido en ácidos micólicos en sus membranas. En el presente trabajo se han comparado dos métodos de permeabilización.

El primero, propuesto por de los Reyes *et al.* (1998), consiste en fijar las células con paraformaldehído (PFA) al 4% y un posterior tratamiento enzimático de las células fijadas. Las células cultivadas en medio líquido se lavan con 500 µl PBS 1X y se resuspenden en 250 µl de PBS 1X. Se añaden

750 μ l de PFA, se centrifuga y se elimina el sobrenadante. El tiempo de contacto con el PFA no debe superar 1 minuto. Posteriormente las células se resuspenden en PBS y etanol (1:1). Estas células se pueden conservar a -20° C o se depositan en los portaobjetos de hibridación de 10 pocillos (Erie Scientific Company), tratados con gelatina para adherirlas a la superficie de los pocillos del portaobjetos, se dejan secar al aire y a continuación se deshidratan en etanol al 50, 80 y 100%, 3 minutos cada uno. Una vez deshidratadas se añade sobre cada pocillo 10 μ l de mutanolisina (5000 U/ml, Sigma) y se incuban a 37° C durante 20 minutos en cámara húmeda. Pasado este tiempo se lavan y se vuelven a deshidratar con alcohol al 50, 80, y 100%.

El segundo método propuesto por Carr *et al.* (2003) comienza depositando 3 μ l de células suspendidas en PBS 1X en los pocillos de portaobjetos gelatinizados. Se secan al aire y se someten a deshidrataciones seriadas como se describe en el párrafo anterior. A continuación, se realiza una hidrólisis ácida con HCl 1M durante 30 minutos a 37° C. Se lava con agua MiliQ, se seca y se añaden sobre cada pocillo 10 μ l de mutanolisina (5000 U/ml) y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos en cámara húmeda. Se lava para eliminar la mutanolisina y se seca. A continuación se añaden a cada pocillo 10 μ l de lisozima (1 mg/ml) y se incuba durante 10 minutos a 4° C en cámara húmeda. Se lava y se seca a temperatura ambiente. La fijación se realiza cubriendo cada pocillo con etanol/formaldehído (90:10) durante 30 minutos a 4° C.

6.3.-Hibridación *in situ*

Una vez fijadas y permeabilizadas las células por los dos procedimientos se realiza un mismo protocolo de hibridación que comienza con la preparación de 2000 μl de la solución de hibridación según el porcentaje de formamida (Tabla 9). Este porcentaje dependerá de la sonda utilizada.

Tabla 9: Solución de hibridación según las cantidades de formamida empleadas en este estudio (Anejo II)

Reactivo	% de Formamida	
	20%	30%
NaCl 5M	360 μl	360 μl
HCl-Tris 1M	40 μl	40 μl
Formamida	400 μl	600 μl
H ₂ O MiliQ	1198 μl	998 μl
SDS 10%	2 μl	2 μl
Volumen final	2000 μl	2000 μl

Si utilizamos una sonda y un portaobjetos con 10 pocillos separamos de la solución de hibridación 90 μl y le añadimos 10 μl de sonda. Con el resto de la solución de hibridación se humedece el papel absorbente para conseguir una cámara húmeda en el tubo falcon donde se introduce el portaobjetos.

A continuación se añaden en cada pocillo 9 μl de la solución de hibridación más 1 μl de la sonda (50 ng/ml) y se incuba en cámara húmeda a 46°C durante tres horas.

Las sondas utilizadas en el presente trabajo (Tabla 10) están marcadas con el fluorocromo TAMRA (Rodamina) con una longitud de onda

de absorción de 555 nm y de emisión de 580 nm (rojo) y con el fluorocromo FAM (Fluoresceína) con una longitud de onda de absorción de 494 nm y de emisión de 518 nm (verde).

Tabla 10: Sondas utilizadas en este estudio y su porcentaje de formamida

Nombre de la sonda y fluorocromo	% de formamida	Especificidad	Referencia
S-D-Bact-0338-a-A-18 (EUB 338) – Tamra y Fam	20	Eubacteria	Amann <i>et al.</i> , 1990
S*-Myb-0736-b-A-22 (Myb 736b) – Tamra	30	Mycolata	De los Reyes <i>et al.</i> , 2002
S*-Myc-0657-a-A-16 (Myc 657) – Tamra	30	Mycolata	Davenport <i>et al.</i> , 2000
S-G-Gor-0596-a-A-22 (Gor 596) - Tamra	20	<i>Gordonia</i>	De los Reyes <i>et al.</i> , 1997
S-S-G.am-0205-a-A-19 (G.am 205) – Tamra y Fam	30	<i>G. amarae</i>	De los Reyes <i>et al.</i> , 1998

Una vez terminado el tiempo de incubación se saca el portaobjetos rápidamente, se lava con la solución de lavado y se introduce en el tubo falcon con el resto de la solución de lavado atemperada y se incuba en baño a 48°C durante 15 minutos. A continuación se lava con agua MiliQ y se seca rápidamente en oscuridad. Si la preparación no va a ser observada inmediatamente se puede congelar a –20°C.

La solución de lavado se prepara, igualmente, según el porcentaje de formamida empleado (Tabla 11). Se preparan 50 ml de esta solución en un tubo falcon y se atempera en un baño a 48°C.

Tabla 11: Solución de lavado según el porcentaje de formamida (Anejo II)

Reactivo	% de formamida	
	20%	30%
NaCl 5M	2150 μ l	1020 μ l
EDTA 0,5M	500 μ l	500 μ l
HCl-Tris 1M	1000 μ l	1000 μ l
H ₂ O MiliQ	46,3 ml	47,43 ml
SDS 10%	50 μ l	50 μ l
Volumen final	50 ml	50 ml

6.3.1.- Observación al microscopio de epifluorescencia

Para observar la muestra al microscopio se coloca en cada pocillo del porta con la muestra una gota del reactivo FluoroGuard Antifade Reagent (Bio-Rad), que evita el deterioro y pérdida de fluorescencia al ser observada al microscopio. Se coloca un cubreobjetos sobre la muestra y se observa a 1000 X con aceite de inmersión para microscopía de fluorescencia.

El microscopio utilizado para la observación de las muestras ha sido un Olympus BX 50 con los filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG. Las fotografías en color se realizaron con una cámara digital Olympus DP 10 acoplada al microscopio.

6.3.2.- Análisis de imagen de la señal de hibridación

Con el programa DP Soft 12 se ha medido la intensidad de la señal de hibridación del fluorocromo unido a la sonda, verde para la fluoresceína y rojo para la rodamina. Se han realizado seis medidas de intensidad y se ha

calculado la media. Este valor se utiliza para comparar la intensidad de la señal de los dos procedimientos de hibridación. Se ha realizado un análisis ANOVA y se estudian los intervalos LSD (Least Significant Differences).

6.4.-Tinción DAPI

En las técnicas de hibridación *in situ* la cantidad total de material genético de la célula se puede teñir independientemente del marcaje de la sonda. Esta tinción nos da una idea de la cantidad total de bacterias presentes en la muestra. Uno de los compuestos más utilizados es el DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol) que es una molécula fluorescente que se une al DNA de doble cadena. Esta unión aumenta su fluorescencia y se observa al microscopio de epifluorescencia de color azul intenso. La longitud de onda de máxima absorción para el DAPI es de 358 nm y la de emisión de 461nm.

La solución DAPI se prepara en PBS 1X a una concentración de 1mg/ml. Para realizar la tinción con DAPI se añaden 10 µl de solución DAPI a cada pocillo durante 5 minutos en oscuridad. Se lava y se seca en oscuridad. Si no va a ser observada inmediatamente se puede conservar en congelación.

7.- Estudio de muestras de fangos activos

7.1.-Toma de muestras

La toma de muestras se realizó por el propio personal de la planta. Se tomaron muestras de espumas del reactor biológico en recipientes estériles y se enviaron al laboratorio. En la Tabla 12 se presentan las plantas estudiadas en el presente trabajo.

Tabla 12: Plantas muestreadas, volumen de agua residual tratado, número de muestreos y cepas aisladas de mycolata.

Nombre de la EDAR	Caudal (m ³ /día)	Nº de muestras	Nº de cepas aisladas.
Gandía-La Safor	41.160	8	16
Quart	39.515	1	1
Játiva	7.538	1	9
Cuenca del Carraixet	36.662	1	4
Castellón	39.299	2	8
Masquefa	ND	1	5
Vall d'Uxó	4.660	3	6
Viver	869	1	3
Rojales	851	1	2
Montesinos	397	1	1
Mora d'Ebre	ND	1	1
Formentera del Segura	353	1	1
Sagunto	14.047	1	1

ND: Datos no disponibles

Todas las plantas estudiadas realizan el proceso basado en el sistema de fangos activos y realizan la depuración de aguas residuales

urbanas. En el Anejo VI se muestran las fichas técnicas de las plantas depuradoras estudiadas de la Comunidad Valenciana (Sanejament d'Aigües). Estas plantas han tenido problemas de formación de espumas de origen biológico causados por bacterias filamentosas (Figura 2).



Figura 2: Detalle de la espuma de origen biológico producida por bacterias filamentosas.

Todas las plantas estudiadas tratan aguas residuales domésticas y su funcionamiento es similar. El proceso comienza con un tratamiento de desbaste, desarenado y desengrasado. A continuación, el agua pasa al reactor donde es sometida a aireación durante varias horas. Aquí se produce la digestión biológica y la materia orgánica se estabiliza. En este proceso es donde pueden aparecer los problemas de foaming. La digestión finaliza cuando la DBO_5 ha sido reducida al mínimo y entonces el agua pasa al sedimentador secundario en donde los fangos floculados se separan por gravedad para obtener un efluente clarificado. En esta etapa es donde se observa principalmente el problema del bulking filamentoso y en ocasiones

problemas de foaming. Una determinada cantidad de estos fangos son recirculados al reactor para que la digestión continúe con la máxima eficacia.

7.2.- Observación microscópica

Como paso previo a la descontaminación y posterior aislamiento, todas las muestras de fango activo fueron observadas al microscopio para detectar la presencia de morfologías típicas de GALO (*Gordonia amarae*-Like-Organism). Se trata de filamentos Gram-positivos o Gram-variables con ramificaciones típicas en ángulo recto. Los nocardioformes especialmente *Nocardia* y *Gordonia* son las únicas bacterias filamentosas presentes en fangos que presentan este tipo de ramificación. Las ramificaciones formadas por *Skermania* se diferencian fácilmente ya que son en ángulo agudo y se asemejan a las agujas de un pino. El género *Rhodococcus* contiene especies que en ocasiones forman micelio pobremente ramificado.

En las muestras de fango también se realizó tinción de ácido-alcohol resistencia para detectar la posible presencia de *Mycobacterium*.

7.3.- Detección directa por FISH

Las muestras de fango recibidas en el laboratorio que presentaban morfologías tipo GALO se fijaron siguiendo el procedimiento de los Reyes *et al.* (1998). (Ver apartado 6.2)

7.3.1.- Técnica de enriquecimiento

Debido a que el estado metabólico de las células se refleja en la cantidad de RNA, en ocasiones, la hibridación *in situ* no detecta o lo hace con una señal muy débil aquellas células con un bajo contenido en ribosomas en el momento del muestreo.

En el presente trabajo realizamos un enriquecimiento de algunas muestras de fango activo incubándolas a 28°C durante 24 h y 48 h en caldo YEME en agitación. Posteriormente se siguió el protocolo propuesto por de los Reyes *et al.* (1998) para fijar y permeabilizar las muestras (ver apartado 6.2). La hibridación se realizó con la sonda S-*Myb-0736-b-A-22 y con la sonda S-S-G.am-205-a-A-19 utilizando en ambos casos el 30% de formamida.

7.4.- Puesta a punto de un método de aislamiento

Las primeras muestras estudiadas en el presente trabajo fueron analizadas realizando un recuento en placa sobre diversos medios de cultivo seleccionados (Figura 3). Posteriormente, con objeto de eliminar parte de la flora acompañante de rápido crecimiento, se ensayaron diversos procedimientos de descontaminación de las muestras previos al recuento en medios selectivos. Dichos procedimientos se explican a continuación.

7.4.1.- Descontaminación de las muestras

Las muestras de agua residual contienen una microbiota muy compleja que normalmente interfiere en el aislamiento de bacterias de lento

crecimiento como los nocardioformes. En este trabajo se han ensayado diversos procedimientos de descontaminación que, hasta la fecha, sólo se han utilizado en la descontaminación de muestras clínicas con elevado grado de contaminación, principalmente esputos (Murray *et al.*, 1987, Kerr *et al.*, 1992, Garret *et al.*, 1992).

Los tratamientos descontaminantes se han evaluado previamente con suspensiones de *N. asteroides*, *G. amarae* y *R. rhodochrous*. Para evaluar el grado de resistencia de dichas cepas se realizaron recuentos de dichas suspensiones antes y después del tratamiento de descontaminación. Posteriormente se ensayaron con aguas residuales inoculadas y finalmente cuando disponemos de un protocolo adecuado se aplica a las muestras procedentes de depuradoras (Figuras 4 y 5).

7.4.1.1.- Tratamiento con cloruro de benzalconio

Este tratamiento de descontaminación ha sido usado con éxito para el aislamiento de *Mycobacterium* y *Nocardia* en muestras clínicas de esputos (Murray *et al.*, 1987).

Con muestras de aguas residuales se ensayaron dos concentraciones finales de cloruro de benzalconio (Guinama) 0,03% y 0,015%. Los tiempos de contacto ensayados fueron 1 min, 10 min, 30 min. y 1 h. Posteriormente se han realizado recuentos en los medios seleccionados (Figura 4).

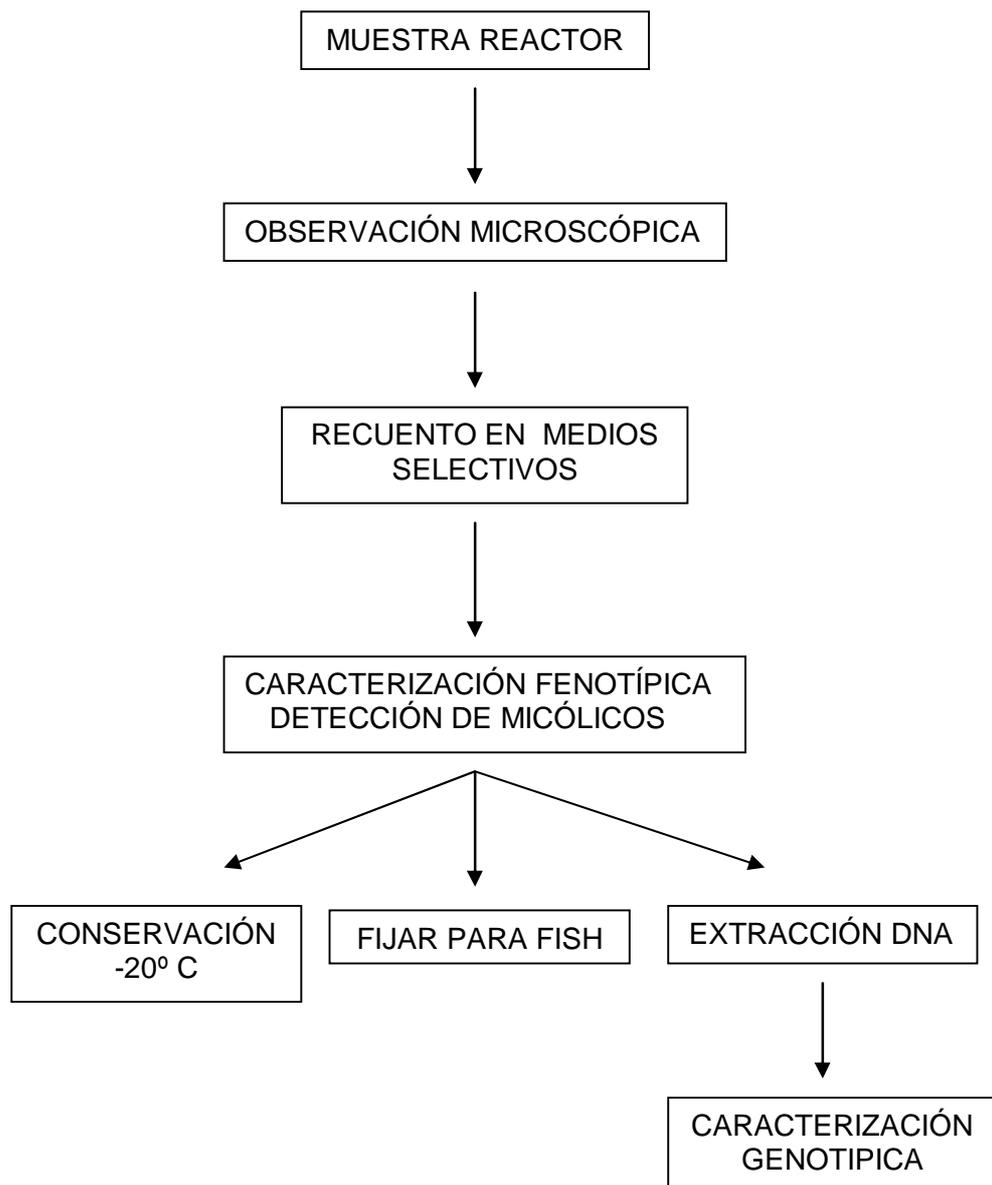


Figura 3: Esquema del protocolo de aislamiento de nocardioformes en muestras sin descontaminar.

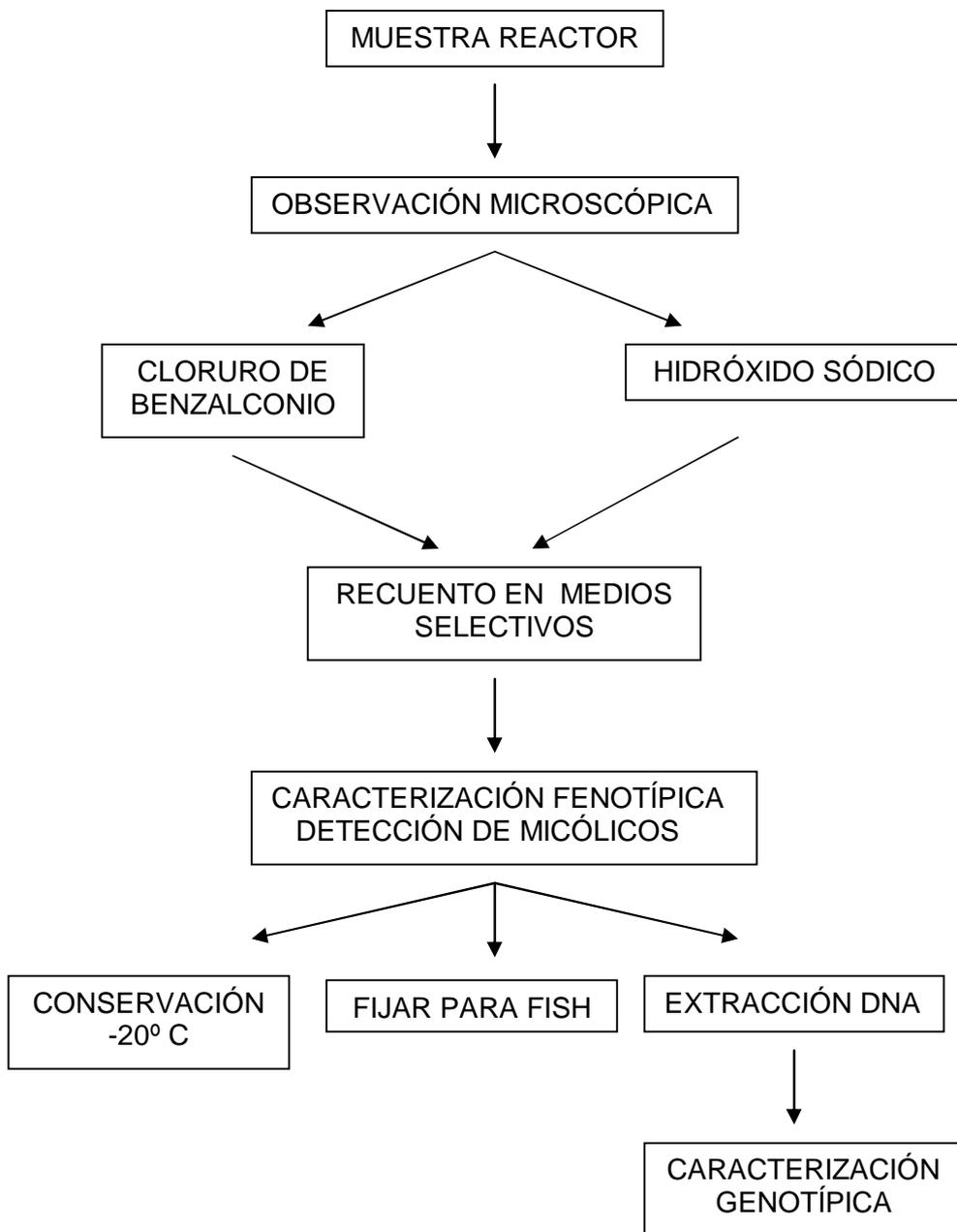


Figura 4: Esquema del protocolo de descontaminación con cloruro de benzalconio y con hidróxido sódico.

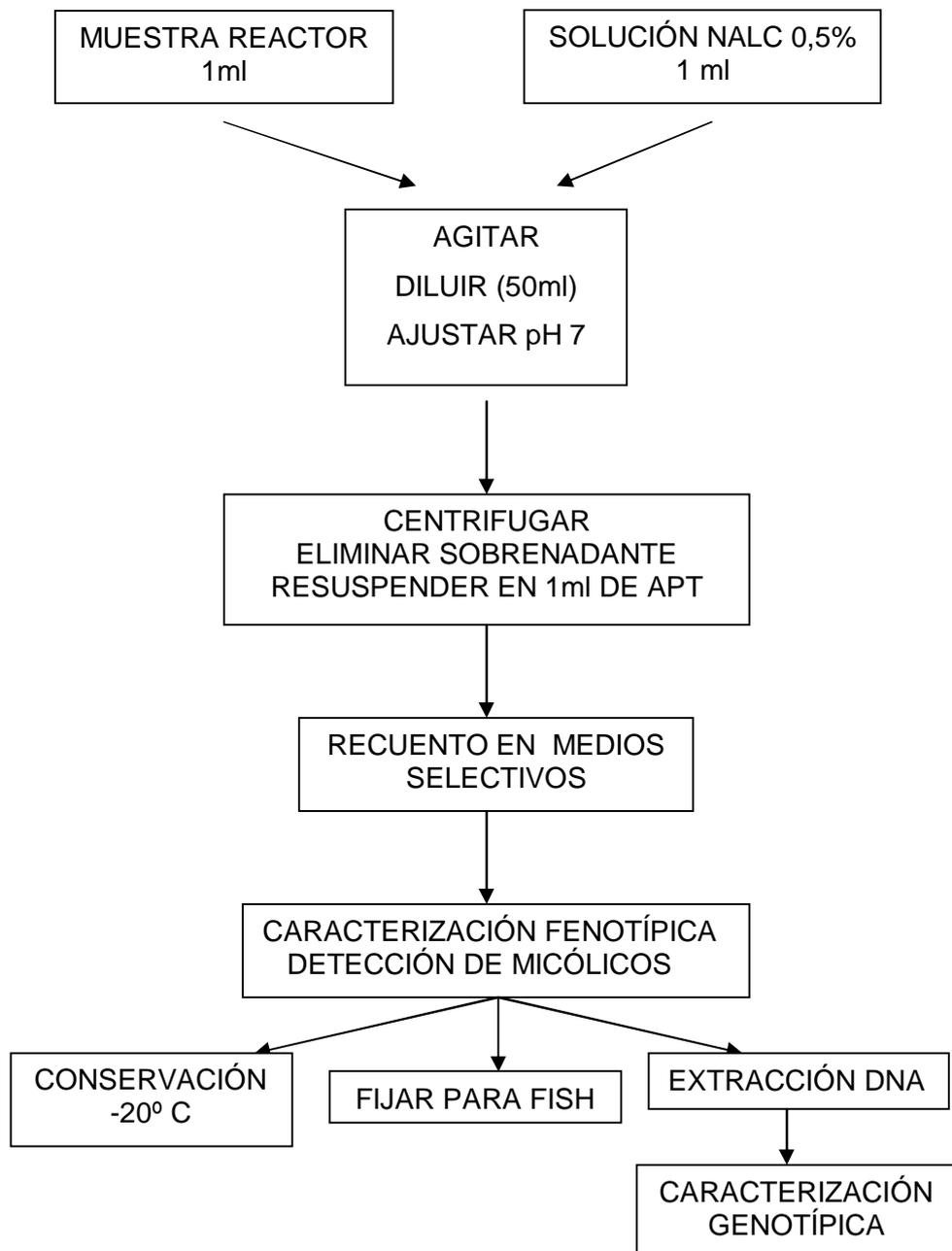


Figura 5: Esquema del protocolo de descontaminación con N-Acetil-L-Cisteína (NALC).

7.4.1.2.- Tratamiento con NaOH

En este caso la concentración final ensayada fue del 2%. Los tiempos de contacto ensayados fueron 1min, 10 min, 30 min. y 1h. Posteriormente, se efectuaron recuentos en los medios seleccionados (Fig. 4).

7.4.1.3.- Tratamiento con N-Acetil-L-Cisteína (NALC)

Se preparan separadamente la Solución I (Citrato de sodio dihidratado 1,29 g/l) y Solución II (NaOH 40g/l). Se mezclan volúmenes iguales de ambas soluciones y se esterilizan. Cuando se ha atemperado se añade un 0,5% de NALC.

Para realizar la descontaminación se mezclan en un tubo falcon volúmenes iguales (5ml) de fango activo y de la solución anterior y se agita. Los tiempos de contacto ensayados fueron 1min, 10 min, 30 min. y 1h. Posteriormente se diluye en 50 ml agua estéril y se ajusta el pH a 6,8-7. Se centrifuga durante 10-15 min., eliminamos el sobrenadante y se resuspende en agua de peptona tamponada y se realiza el recuento en placa en los medios seleccionados (Fig. 5).

7.4.2.- Selección de medios de cultivo

Se realiza una revisión bibliográfica de los medios más utilizados para el aislamiento de nocardioformes (Goodfellow *et al.*, 1992, Goodfellow *et al.*, 1996, Schupper *et al.*, 1995, Kerr *et al.*, 1992). Se seleccionan un total de 9 medios:

- Agar de Czapeck Modificado (MC)
- Agar Glucosa Extracto de Levadura (GY)
- Agar Triptona Extracto de Levadura (TY)
- Agar Bennett (B)
- Actinomycete Isolation Agar (Difco) (AC)
- Agar de Sauton Modificado (S)
- Agar de Sauton Medium con Tiamina (ST)
- Agar de Münz con Parafina
- Selectivo BCYE Agar.

La composición de estos medios puede verse en el Anexo I. Los medios Modified Czapeck's, GY, TY y Bennett's son considerados medios generales para actinomicetos. El medio Actinomycete Isolation Agar es un medio diseñado para aislar actinomicetos del suelo. El medio de Sauton está diseñado para el aislamiento de *Rhodococcus* y debe ser suplementado con 50 mg/l de tiamina para facilitar su aislamiento. El medio de Münz se caracteriza porque contiene como única fuente de carbono el aceite de parafina que puede ser utilizado por especies del género *Nocardia*. El medio Selective BCYE Agar fue diseñado para el aislamiento de *Legionella*, sin embargo se ha comprobado su efectividad como medio para el aislamiento de especies de *Nocardia* en muestras clínicas (Kerr *et al.*, 1992, Garret *et al.*, 1992).

Para comprobar la eficacia de los medios seleccionados se realizan siembras de las cepas de referencia para observar el tiempo de crecimiento y aspecto macroscópico.

7.4.3.- Aislamiento y recuento

Con los medios anteriores se realizan recuentos en placa de las muestras de fango activo. Todos los medios de cultivo, excepto el de Münz que contiene parafina y el Selectivo BCYE, son suplementados con ácido nalidíxico (20 mg/l) para inhibir las bacterias Gram-negativas.

Las placas se siembran en superficie y se incuban a 28°C durante 14 días realizando lecturas periódicas para detectar la presencia de colonias con morfología característica. La morfología de las colonias del género *Gordonia* es muy variable. Pueden originar colonias blanquecinas, rosadas, naranja o rojas y una textura mate o arrugada aunque también pueden observarse colonias mucosas y brillantes. Las colonias típicas del género *Nocardia* tienen un aspecto aterciopelado o calcáreo y pueden ser blancas, marrones, rosas, rojas o grises. Pueden formar un micelio aéreo visible únicamente al microscopio. Forman micelio de sustrato, lo que hace que las colonias estén incrustadas en el agar. Las colonias típicas de *Rhodococcus* suelen estar pigmentadas de rojo, rosa, naranja o salmón y la mayoría son brillantes o satinadas.

7.5.- Caracterización de aislados fenotípicamente

A todos los aislados que presentan morfología macroscópica característica se les realiza tinción Gram, tinción de ácido-alcohol resistencia, la prueba de la catalasa y detección de ácidos micólicos (Apartado 3). Las cepas que contienen ácidos micólicos (mycolata) se conservan en cultivo puro a 4°C y a -20°C.

A continuación se procede a la caracterización de los aislados con los sistemas miniaturizados API ZYM y API ID32C (Apartado 2.1). Algunos de los aislados obtenidos se caracterizan con el sistema Microlog (Apartado 2.2)

Como pruebas adicionales se realiza la resistencia a la lisozima (50 µg/ml), producción de ureasa, utilización del citrato como única fuente de carbono, reducción de nitratos y crecimiento a 45°C.

7.6.- Caracterización de aislados genotípicamente

Con las pruebas anteriormente descritas los aislados se caracterizan fenotípicamente como pertenecientes a los distintos géneros de mycolata. Según el resultado de esta caracterización, los aislados se caracterizan genotípicamente según se describe en el apartado 5.

A los aislados caracterizados fenotípicamente como *Nocardia* se les realiza la PCR específica para este género (ver apartado 5.2.1).

A los aislados cuyas características fenotípicas nos permiten asignarlos al género *Gordonia* se les realiza la PCR a nivel de género con los iniciadores diseñados en este trabajo (ver apartado 5.2.3.). De todas las cepas de *Gordonia* caracterizadas genotípicamente, a las que presentaban mayor similitud con la especie *G. amarae* se les realizó la técnica de FISH con la sonda (G. am 205) específica de especie (ver apartado 6.3)

Los aislados con morfología cocácea y características fenotípicas similares a *Rhodococcus* se someten a PCR para detectar tanto la especie

MATERIAL Y MÉTODOS

patógena *R. equi* como la especie *R. erythropolis*. Así mismo con estos aislados se realiza la PCR específica a nivel de género con los iniciadores diseñados en este trabajo (ver apartado 5.2.3).

RESULTADOS

1.- Caracterización de las cepas de referencia fenotípicamente

Como paso previo, en este trabajo se han obtenido perfiles bioquímicos de todas las cepas de referencia suministradas por la CECT. Los sistemas miniaturizados son rápidos, económicos y ofrecen perfiles bioquímicos reproducibles si las condiciones han sido previamente estandarizadas. Estos datos se utilizarán posteriormente para compararlos con los obtenidos de los aislados.

1.1.- Sistemas API ZYM y API ID 32C

La utilización conjunta de los sistemas API ZYM y API ID 32C permite obtener un perfil bioquímico de 50 pruebas de cada una de las cepas de referencia. Para comprobar la reproducibilidad de los resultados se realizaron repeticiones en la mitad de las cepas, elegidas al azar, cultivadas en las mismas condiciones obteniéndose los mismos resultados.

Con el sistema API ZYM se investiga la presencia de 19 actividades enzimáticas. En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos con las cepas de referencia. Con objeto de realizar comparaciones entre cepas se han considerado las reacciones W (débiles) como positivas ya que, aunque débil, la actividad enzimática existe.

Teniendo en cuenta esta consideración *G. amarae* y *G. rubropertincta* comparten el mismo perfil enzimático. La diferenciación de estas cepas se puede realizar por la morfología tanto a nivel macroscópico como a nivel

microscópico. *G. amarae* produce colonias color crema-amarillentas formando unas circunvoluciones características. Esta especie forma filamentos con ramificaciones en ángulo recto. *G. rubropertincta* forma colonias naranjas, mucosas y brillantes y raramente forma filamentos complejos. Además estas dos especies se pueden diferenciar por la reducción de nitratos ya que *G. amarae* es capaz de reducirlos mientras que *G. rubropertincta* no.

Tabla 13: Perfil enzimático obtenido con el sistema API ZYM de las cepas de referencia. Se indica el número de la cepa de la CECT

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	4160	4617	5704	5393	5707	3034	3051	3052	3374
Fosfatasa alcalina	-	+	+	+	+	W	+	+	+
Estearasa(C1)	W	+	+	+	+	+	+	+	+
Estearasa lipasa (C8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa (C14)	+	+	+	W	+	W	+	+	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	W	W	W	+	+	W	W	+	-
Cistina arilamidasa	W	W	+	+	+	+	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-	W	W	-	-
α -quimotripsina	-	-	-	-	-	W	-	-	-
Fosfatasa ácida	W	+	+	+	+	+	+	+	+
Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa	-	W	+	+	W	W	+	+	+
α -galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	-	-	W	+	-	-	+	W	-
β -glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -glucosidasa	-	-	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-	-	-	+	-
α -manosidasa	-	-	-	-	-	-	-	+	-
α -fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W: reacción débil

RESULTADOS

Las especies *Mycobacterium komossense*, *Rhodococcus rhodochrous* y *R. equi* también comparten el mismo perfil enzimático. La diferenciación entre *Mycobacterium* y *Rhodococcus* se puede realizar por tinción de ácido-alcohol resistencia. La diferenciación de las dos especies de *Rhodococcus* se puede realizar con la prueba de utilización del citrato. *R. equi* es incapaz de utilizarlo mientras que *R. rhodochrous* si que puede usarlo.

Tabla 13 (Continuación): Perfil enzimático obtenido con el sistema API ZYM de las cepas de referencia

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	3053	3056	3375	5751	555	3013	5750	5749	3057	3055
Fosfatasa alcalina	+	W	W	+	+	+	-	W	-	+
Estearasa(C1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Estearasa lipasa (C8)	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa (C14)	-	W	W	+	+	+	+	W	+	+
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	+	W	-	W	+	+	+	+	+	+
Cistina arilamidasa	+	W	-	+	+	+	+	+	W	W
Tripsina	+	W	-	-	+	+	W	W	+	-
α -quimotripsina	-	-	-	-	W	+	-	W	-	-
Fosfatasa ácida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+	+	W	W	+	+
α -galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	W	+	-	-	-	+	-	-	-	+
β -glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidasa	+	W	+	+	+	+	-	+	+	+
β -glucosidasa	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -manosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
α -fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W: reacción débil

Otras cepas que comparten el mismo perfil son *Dietzia maris* y *R. coprophilus*. Estas cepas se pueden diferenciar según la asimilación del sorbitol (Tabla 14). *R. coprophilus* puede asimilarlo mientras que *D. Maris* no.

Con el sistema API ID 32C se estudia la capacidad de las cepas microbianas para utilizar distintos tipos de fuentes de carbono. Cada cepa de referencia presentó un perfil distinto y reproducible excepto las cepas *R. equi* y *R. rhodochrous* que tienen el mismo perfil (Tabla 14). *Skermania piniformis* (CECT 3057) no dio positivo para ninguna prueba ya que por ser una cepa de muy lento crecimiento (de tres a cuatro semanas), los pocillos se deshidratan antes de poder observar el crecimiento.

La manera más cómoda de trabajar con estas tablas es utilizar el perfil numérico obtenido de sumar las pruebas positivas de cada triplete de pruebas bioquímicas dando un valor de 1, 2 ó 4 a la primera, segunda y tercera prueba respectivamente. De esta manera los datos se resumen en tablas más sencillas.

Como puede verse en la tabla 15 de una manera más clara, los perfiles numéricos son únicos excepto para *R. equi* y *R. rhodochrous*. Aunque este sistema discrimina más entre especies que el sistema API ZYM hay que tener en cuenta que Muir y Pritchard (1997) obtuvieron perfiles distintos en distintas cepas de la misma especie.

Tabla 14: Asimilación de fuentes de carbono obtenido con el sistema API ID32C de las cepas de referencia. Se indica el número de la cepa de la CECT

FUENTE DE CARBONO	4160	4617	5704	5393	5707	3034	3051	3052	3374
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Actidiona	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	+	+	+	+	-	-	-
N-acetil-glucosamina	-	-	-	-	-	-	-	+	-
DL-Lactato	+	-	-	-	+	+	-	-	-
L-arabinosa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	-	+	+	+	+	-	+	-
2-ceto-gluconato	-	-	-	+	-	-	-	-	-
α -metil-D-glucósido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Xilosa	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Ribosa	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Glycerol	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Ramnosa	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Palatinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucuronato	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Levulinato	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosamina	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Esculina	-	-	+	-	-	-	+	+	+

Tabla 14 (Continuación): Asimilación de fuentes de carbono obtenido con el sistema API ID32C de las cepas de referencia.

FUENTE DE CARBONO	3053	3056	3375	5751	555	3013	5750	5749	3055
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Actidiona	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	+	-	-	+
N-acetil-glucosamina	-	-	+	-	-	+	-	-	+
DL-Lactato	+	-	-	-	+	+	+	+	-
L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	-	-	-	-	+	-	-	+
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-metil-D-glucósido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	+	+	+	+	+	-
D-Xilosa	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Ribosa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Glycerol	-	+	+	-	-	+	-	-	+
Ramnosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Palatinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glucuronato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Levulinato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosalina	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Esculina	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Tabla 15: Perfil numérico obtenido con el sistema API ID 32C de las cepas de referencia.

Bacteria	Nº CECT	Perfil
<i>Corynebacterium xerosis</i>	4160	6241040001
<i>Dietzia maris</i>	4617	2000000041
<i>Gordonia amarae</i>	5704	6041502061
<i>Gordonia rubropertincta</i>	5393	6003123061
<i>Gordonia terrae</i>	5707	6201102041
<i>Mycobacterium komossense</i>	3034	6601520161
<i>Nocardia asteroides</i>	3051	2000101045
<i>Nocardia brasiliensis</i>	3052	3101541405
<i>Nocardia carnea</i>	3374	2000110041
<i>Nocardia farcinica</i>	3053	2201002041
<i>Nocardia nova</i>	3056	2000111041
<i>Nocardia soli</i>	3375	0100021040
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	5751	2000010041
<i>Rhodococcus equi</i>	555	2200110041
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	3013	6301551065
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	5750	0200330060
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	5749	2200110041
<i>Tsukamurella paurometabola</i>	3055	7121201265

Los perfiles obtenidos por Muir y Pritchard (1999) con este sistema son de 8 dígitos, según indica el fabricante cuando queremos identificar levaduras. Los perfiles obtenidos en el presente trabajo son de 10 dígitos porque se han utilizado las últimas 6 fuentes de carbono, por lo tanto, con un

perfil de 10 dígitos se puede obtener más resolución. La prueba de la esculina no está incluida en este perfil.

1.2.- Sistema MicroLog (Biolog, Inc. USA)

En los sistemas anteriormente descritos la lectura de los resultados se realiza de manera visual por lo tanto cabe la posibilidad de que dos mismas pruebas sean interpretadas de manera distinta por dos personas. En el sistema MicroLog (Biolog) la lectura de las pruebas se realiza con un lector óptico obteniendo una reproducibilidad más fiable (Fig. 6). Además con este equipo se pueden realizar 95 pruebas bioquímicas con lo cual el nivel de discriminación entre cepas puede ser mayor.

Con este equipo se pueden realizar dos tipos de lecturas. La primera es la llamada “manual” en donde sólo se indican las pruebas positivas, negativas y las llamadas “borderline” que son pruebas que tienen un alto grado de crecimiento, expresado en forma de turbidez o en forma de reducción del tetrazolio, pero que el sistema todavía no las considera como positiva. El segundo tipo de lectura es la llamada “automática” en donde solo se expresan grados de turbidez o de color. El grado mínimo es el del control negativo (Pocillo A1), sin fuente de carbono, mientras que el grado máximo es el pocillo que presenta más turbidez o color. Las pruebas consideradas como “borderline” son aquellas que tiene un grado de turbidez o de color en torno al 80% pero sin sobrepasarlo.

En la tabla 16 se presentan los datos obtenidos para todas las cepas de referencia. Las pruebas bioquímicas que no discriminan entre ninguna de las cepas estudiadas han sido omitidas.

RESULTADOS

Tabla 16: Perfil bioquímico de las cepas de referencia obtenido con el sistema Microlog. Se indica el número de cepa de la CECT.

FUENTE DE CARBONO	4160	4617	5704	5393	5707	3034	3051	3052	3374	3053	3056	3375	5751	555	3013	5750	5749	3055
Dextrin	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Mannan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Tween 40	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
N-acetyl-D-mannosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-arabinose	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D-arabitol	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Cellobiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
L-fucose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-gluconic acid	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
α-D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
m-inositol	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltotriose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannitol	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3-methyl glucose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Palatinose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-psicose	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
L-rhamnose	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribose	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
D-tagatose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-trehalose	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Turanose	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Xylitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetic acid	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

Tabla 16 (Continuación): Perfil bioquímico de las cepas de referencia obtenido con el sistema Microlog.

FUENTE DE CARBONO	4160	4617	5704	5393	5707	3034	3051	3052	3374	3053	3056	3375	5751	555	3013	5750	5749	3055
α-hydroxybutyric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
β-hydroxybutyric acid	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
γ-hydroxybutyric acid	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
p-hydroxyphenyl acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
α-ketoglutaric acid	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
α-ketovaleric acid	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Lactamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L-lactic acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
D-malic acid	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-malic acid	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Methyl pyruvate	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
Mono-methyl succinate	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Propionic acid	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Pyruvic acid	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Succinic acid	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Alaninamide	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
D-alanine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-alanine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-alanyl-glycine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-asparagine	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-glutamic acid	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Glycyl-L-glutamic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-pyroglutamic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-serine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Putrescine	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Glycerol	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Adenosine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2'-deoxyadenosine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Inosine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymidine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Uridine	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Thymidine-5'-monophosphate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fructose-6-phosphate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Todas las especies de *Rhodococcus* estudiadas presentan un perfil bioquímico único y diferenciable entre ellas. Estos perfiles se corresponden con la máxima probabilidad con la base de datos del sistema.

Puesto que el sistema no incluye el género *Nocardia* en su base de datos se ha seguido el protocolo indicado por el fabricante para bacterias Gram-positivas filamentosas con algunas modificaciones (Tabla 8). Se han optimizado las condiciones de crecimiento obteniendo un patrón característico y reproducible para cada especie logrando así aumentar la base de datos para este género.

Con las especies de *Gordonia* se siguieron las especificaciones para bacilos Gram-positivos según indica el sistema. Debido a la similitud morfológica de este género con el género *Nocardia* se realizó el estudio paralelo según el protocolo empleado para este último género. Los perfiles bioquímicos obtenidos con ambos métodos fueron idénticos por lo que se decide utilizar para este género el protocolo para especies filamentosas ya que la principal especie que causa problemas en depuradoras, *G amarae*, es filamentosas al igual que muchas gordonias aisladas de fangos.

El perfil obtenido para la especie *G. terrae* siguiendo las especificaciones del sistema para dicho género presenta la máxima probabilidad con base de datos de la misma especie. En el caso de *G. rubropertincta* el perfil obtenido no coincide con la base de datos para esta especie. En este estudio se ha incluido la especie *G. amarae* que no está recogida en la base de datos y presenta un perfil distinto a todas las especies con lo que aumentamos la base de datos para este género.

Para completar el estudio del suborden *Corynebacterineae* se han incluido las especies *Corynebacterium xerosis*, *Dietzia maris*, *Mycobacterium komossense* y *Tsukamurella paurometabola* siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se ha conseguido caracterizar estas especies no incluidas en el sistema.

En el caso de las cepas no incluidas en el banco de datos del MicroLog se realizaron repeticiones para ver la reproducibilidad. En estos casos se obtuvieron los mismos resultados con la lectura “manual”, sin embargo se observaron diferencias en el grado de turbidez según la lectura “automática”.

A diferencia de lo que ocurre con el sistema API ZYM, con este sistema se han obtenido perfiles únicos para cada una de las cepas de referencia ya que el número de pruebas con el que trabaja el sistema (95) permite discriminaciones más altas.



Figura 6: Izquierda: Microplaca GP2 donde se observan los pocillos positivos por la reducción del tetrazolio. Derecha: Equipo completo de MicroLog.

1.3.-Ácidos Micólicos

El método propuesto por Minnikin *et al.* (1980) es el método más utilizado para detectar ácidos micólicos por cromatografía en capa fina (TLC). El revelado se realiza pulverizando la placa con ácido fosfomolibdico (Sigma) y calentando a 110°C. De esta manera las manchas se ven azuladas sobre un fondo amarillo. Todas las manchas pertenecientes a metil ésteres de los ácidos micólicos presentan un Rf comprendido entre 0,2 y 0,5. Las manchas con un Rf superior a 0,6 son metil ésteres de los ácidos grasos monohidroxilados. En todas las cepas de referencia se han detectado ácidos micólicos. En las cepas utilizadas como control negativo *Streptomyces albus* CECT 3077 y *Pseudonocardia autothrophyca* CECT 3044 no se detectaron ácidos micólicos (Figura 7).

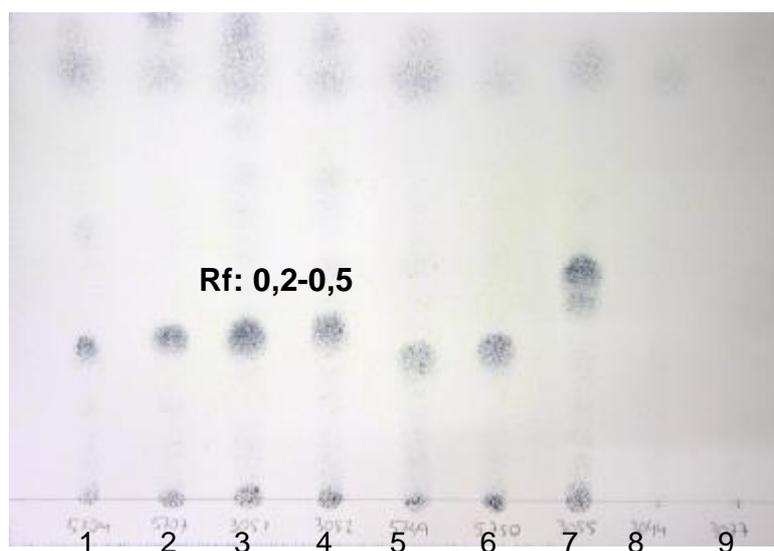


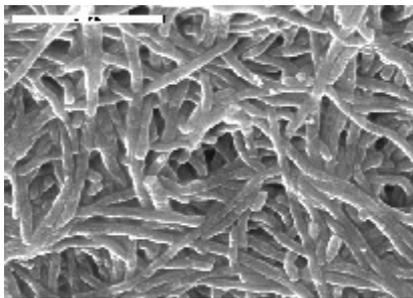
Figura 7: Cromatoplaqueta utilizada para la detección de ácidos micólicos. 1: *Gordonia amarae*, 2: *G. terrae*, 3: *Nocardia asteroides*, 4: *N. brasiliensis*, 5: *Rhodococcus rhodochrous*, 6: *R. rhodnii*, 7: *Tsakamurella pauremetabola*, 8: *Pseudonocardia autothrophyca*, 9: *Streptomyces albus*.

La importancia de esta prueba radica en que los mycolata son las únicas bacterias que contienen ácidos micólicos, por lo tanto este marcador quimiotaxonómico es el mas útil para detectar cepas pertenecientes al suborden *Corynebacterineae*.

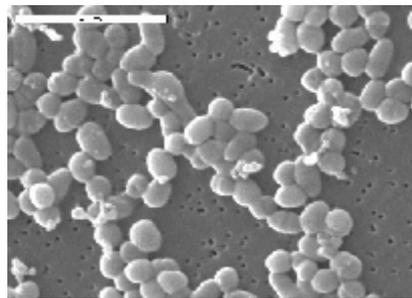
1.4.- Observación de cepas al Microscopio Electrónico

Todas las cepas han sido observadas al microscopio electrónico de barrido (SEM). Como puede verse en la figura 8 los nocardioformes filamentosos pueden formar hifas formando entramados muy complejos. Este conjunto de hifas con propiedades hidrofóbicas pueden atrapar burbujas de aire produciendo problemas de foaming. Los filamentos producidos por las especies de *Rhodococcus* no son tan complejos y se fragmentan fácilmente en elementos cocobacilares por lo que los problemas de foaming producidos por *Rhodococcus* no son tan severos.

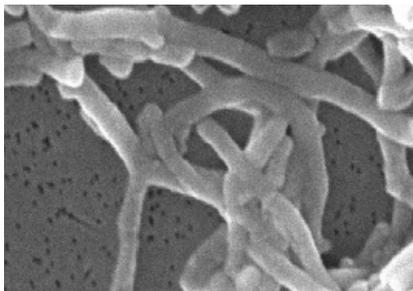
Como puede observarse en la figura 8 las especies del género *Rhodococcus* tienen gran diversidad morfológica. Este género se caracteriza por presentar un ciclo de crecimiento secuencial. En unas especies como *R. equi* este ciclo es muy sencillo y comienza con formas cocoides que evolucionan a formas bacilares que nuevamente originan formas cocoides. En otros casos como *R. rhodochrous* se puede llegar a formar un rudimentario micelio y en el caso de *R. coprophilus* se pueden llegar a formar verdaderas hifas que terminan, para cerrar el ciclo, fragmentándose en elementos cocobacilares.



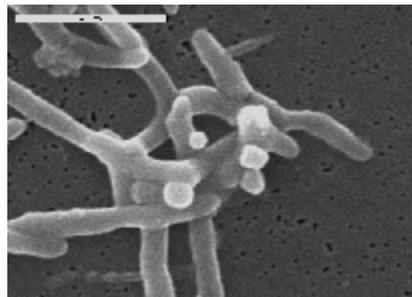
A



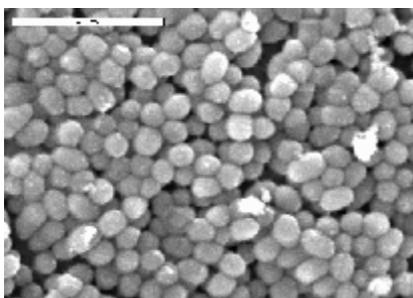
B



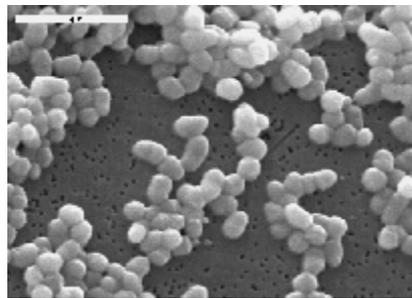
C



D



E



F

Figura 8: Cepas de referencia observadas al microscopio electrónico de barrido. A: *Nocardia farcinica*; B: *Rhodococcus equi*; C: *Nocardia asteroides*; D: *Gordonia amarae*; E: *Dietzia maris*; F: *R. rhodochrous*; G y H: *R. coprophilus*.

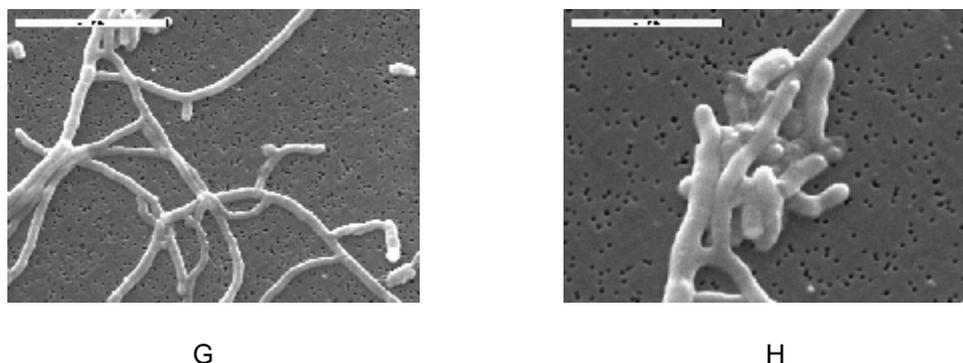


Figura 8 (Continuación): Cepas de referencia observadas al microscopio electrónico de barrido.

2.- Caracterización de las cepas de referencia genotípicamente

2.1.- Extracción de DNA

La cubierta lipídica de los mycolata les confiere resistencia e hidrofobicidad. Además protege al peptidoglucano de la lisis por lisozima. La extracción de DNA mejoró notablemente si antes se congelan y descongelan las células dos veces. La primera congelación se realiza en el tubo con TE y perlas de vidrio para disgregar el micelio por agitación en vortex. Se descongelan y se reparten las células en eppendorf con 500 μ l y se vuelve a congelar hasta su utilización para la extracción. Estos dos pasos de congelación-descongelación ayudan a romper la pared y aumentan el rendimiento de extracción de DNA. La agitación periódica de los tubos eppendorf durante la incubación con lisozima también mejoró la extracción.

Con los dos métodos de extracción ensayados, el método del CTAB y el propuesto por Torres *et al.* (1996) se han obtenido resultados similares. En la figura 9 se observa cinco extracciones de DNA con los dos métodos. Las cepas utilizadas son *Mycobacterium komossense* (que posee la cubierta lipídica más compleja), *Gordonia amarae*, *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus rhodochrous* y *Tsukamurella paurometabola*. Se puede observar que en el caso de *Mycobacterium* el método del CTAB produce más rendimiento de DNA. En el resto de las cepas el rendimiento de DNA fue similar, por la tanto, en todos las cepas estudiadas en el presente trabajo se ha seguido el protocolo del CTAB con los pretratamientos previamente explicados.

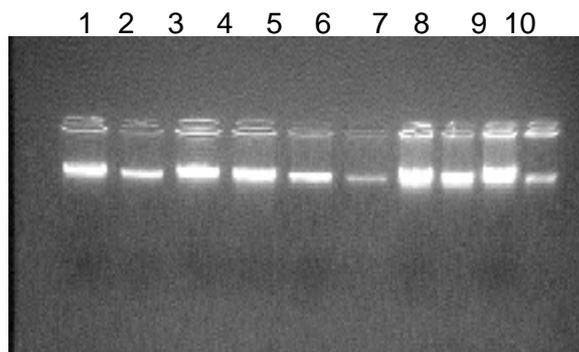


Figura 9: Gel de extracción de DNA con los dos métodos ensayados. Calles 1 a 5: método del CTAB, calles 6 a 10 método de Torres *et al.* (1996). 1 y 6 *Mycobacterium komosense*, 2 y 7: *Tsukamurella paurometabola*, 3 y 8: *Rhodococcus rhodochrous*, 4 y 9: *Gordonia amarae*, 5 y 10: *Nocardia asteroides*.

2.2.- *Nocardia*

Con los iniciadores descritos por Laurent *et al.* (2000) se ha conseguido amplificar una banda de 596 pb en todas las cepas de referencia (Figura 10).

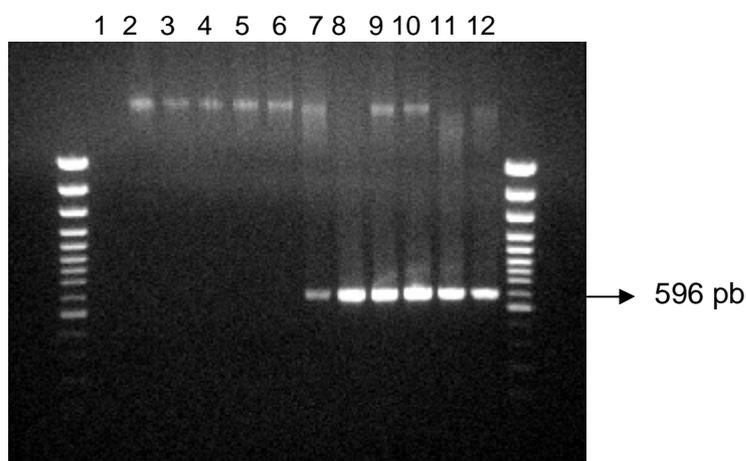


Figura 10: Gel con los productos de amplificación del 16S de *Nocardia* comparado con otros mycolata relacionados. 1: Blanco sin DNA, 2: *Tsukamurella paurometabola*, 3: *Rhodococcus rhodochrous*, 4: *Gordonia amarae*, 5: *G. terrae*, 6: *Mycobacterium komossense*, 7: *N. soli*, 8: *N. carnea*, 9: *N. nova*, 10: *N. farcinica*, 11: *N. brasiliensis*, 12: *N. asteroides*.

En el trabajo de Laurent *et al.* (2000) no se realizan digestiones con enzimas de restricción para diferenciar especies. En este trabajo se han utilizado 10 enzimas con este propósito. Las enzimas utilizadas son: *Hpa* II, *Hin* 1 I, *BstE* II, *Bam*HI, *Mbo* II, *Hpy*F10, *Acs* I, *Taq* I, *Hae* II, *Dra* II. Únicamente con dos enzimas se pueden diferenciar las especies *N. asteroides* y *N. farcinica* (Fig. 11 y 12) En la figura 11 se observa la digestión del fragmento con la enzima *Hpa* II que nos permite diferenciar *N. asteroides*

del resto de especies. Esta especie tiene el mismo número de cortes que las otras nocardias pero uno de ellos en distinta posición de manera que se obtiene una banda con tamaño inferior a 300 pb.

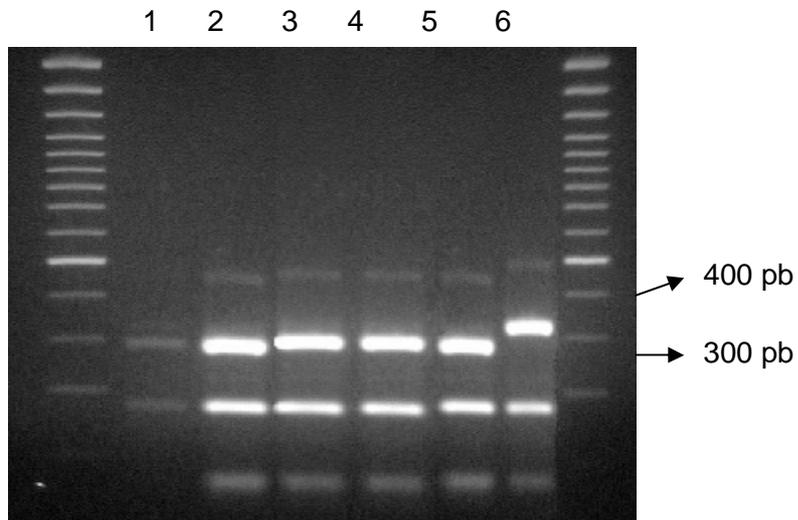


Figura 11: Productos obtenidos por el análisis de restricción del gen 16S con *Hpa* II de *Nocardia*: 1: *N. soli*; 2: *N. carneae*; 3: *N. nova*; 4: *N. farcinica*; 5: *N. brasiliensis*; 6: *N. asteroides*

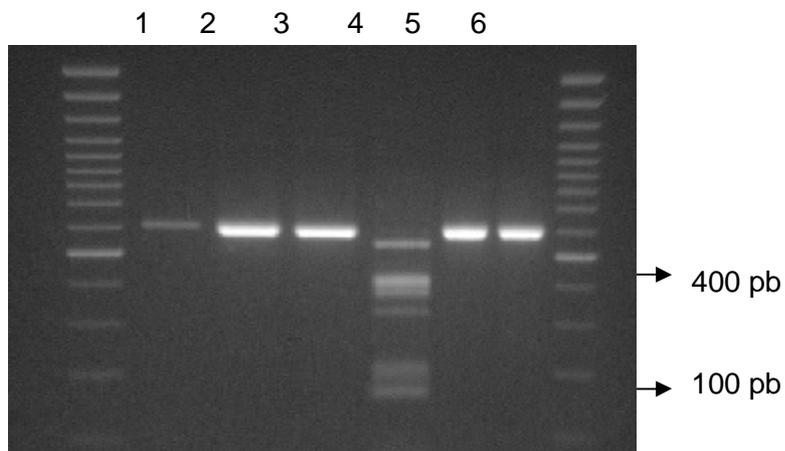


Figura 12: Productos obtenidos por el análisis de restricción del gen 16S con *Hae* III de *Nocardia*: 1: *N. soli*; 2: *N. carneae*; 3: *N. nova*; 4: *N. farcinica*; 5: *N. brasiliensis*; 6: *N. asteroides*

En la figura 12, puede observarse la digestión del mismo fragmento con la enzima *Hae* II. Esta enzima no corta en ninguna especie de referencia excepto en *N. farcinica* que tiene sitios de corte de manera que se obtienen 6 bandas con un tamaño comprendido entre 100 y 400 pb. Se ha demostrado que esta especie es causante de espumas biológicas (Stratton *et al.*, 1996).

2.3.- PCR-RFLP de la proteína de estrés térmico (HSP)

Con los iniciadores propuestos por Telenti *et al.* (1993) se ha conseguido amplificar un fragmento de 439 pb del gen HSP en todas las especies de *Nocardia* (Fig. 13). Este gen no es exclusivo del grupo mycolata y se encuentra en otras especies como *Streptomyces*, pero su naturaleza conservada permite diferenciación entre ciertas especies mediante enzimas de restricción (Telenti *et al.*, 1993). Con este fragmento se realizó una digestión con enzimas de restricción con objeto de distinguir especies del género *Nocardia* según ha descrito Steingrube *et al.* (1997). Los enzimas utilizados son los mismos que en el caso anterior (*Hpa* II, *Hin* 1 I, *Bst*E II, *Bam*HI, *Mbo* II, *Hpy*F10, *Acs* I, *Taq* I, *Hae* II, *Dra* II).

La digestión con la enzima *Hpa* II nos permite diferenciar las tres especies pertenecientes al llamado “*Nocardia asteroides* complex”, *N. asteroides*, *N. farcinica* y *N. nova*. Estas tres especies presentan un perfil de restricción con esta enzima distinto entre ellas y diferenciable del resto de especies de *Nocardia*. En la figura 14 puede verse el perfil obtenido con *Hpa* II. El resto de enzimas no permiten diferenciar estas especies ya que, o no cortan en ninguna especie, o cortan en el mismo sitio en todas las especies. En el caso de *Dra* II nos permite diferenciar la especie *N. soli*.

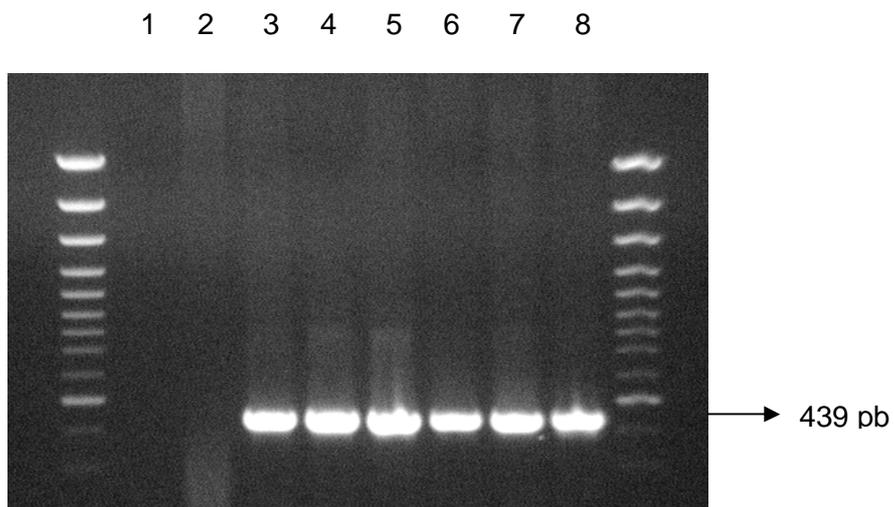


Figura 13: Gel con los productos de amplificación del gen HSP de *Nocardia*: 1: Blanco sin DNA, 2: *Streptomyces albus*, 3: *N. soli*, 4: *N. carnea*, 5: *N. nova*, 6: *N. farcinica*, 7: *N. brasiliensis*, 8: *N. asteroides*.

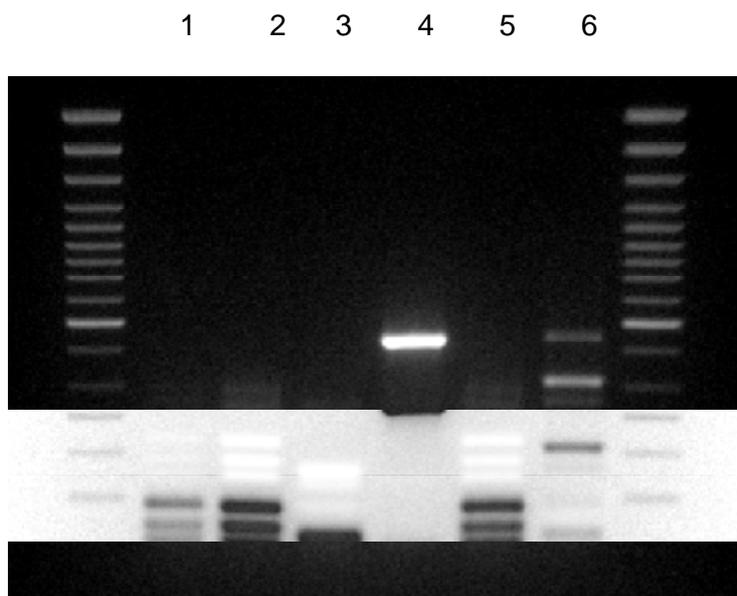


Figura 14: Productos obtenidos por el análisis de restricción del gen HSP con *Hpa* II de *Nocardia*: 1: *N. soli*; 2: *N. carnea*; 3: *N. nova*; 4: *N. farcinica*; 5: *N. brasiliensis*; 6: *N. asteroides*

2.4.- *Gordonia*

El alineamiento de las secuencias de *Gordonia* con la de otros microorganismos relacionados indica que los iniciadores diseñados en el presente trabajo, G1 y G2, son adecuados para la detección de las especies de *Gordonia* utilizadas como referencia. El alineamiento se realizó con el programa informático BLAST. En las figuras 15 y 16 se observa el alineamiento con las especies de *Gordonia*.

Tanto el iniciador G1 como el G2 presentan un alineamiento al 100% con 18 de las 19 especies de *Gordonia* válidamente descritas. La única especie que no presenta alineamiento con estos iniciadores es *G. hirsuta*. Entre estas especies se encuentran, además de *G. amarae*, las patógenas oportunistas *G. sputi* y *G. bronchialis* que es la especie tipo del género.

Los iniciadores G1 y G2 amplificaron un fragmento de 563 pb en las tres cepas de *Gordonia* de referencia utilizadas en el presente trabajo (Fig. 17). El resto de especies de referencia utilizadas en este trabajo no fueron amplificadas con estos iniciadores.

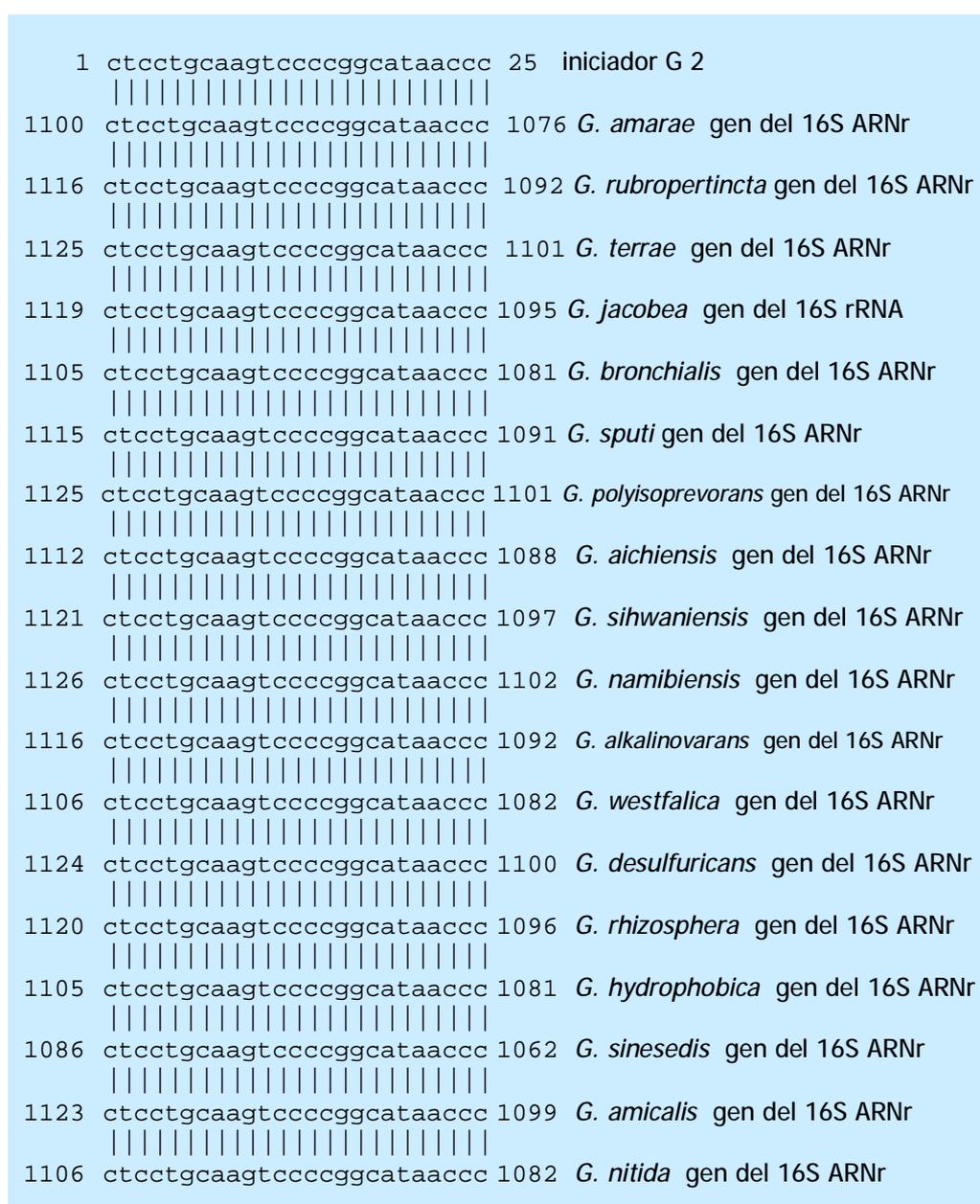


Figura 16: Alinaeamiento de secuencias del iniciador G 2.

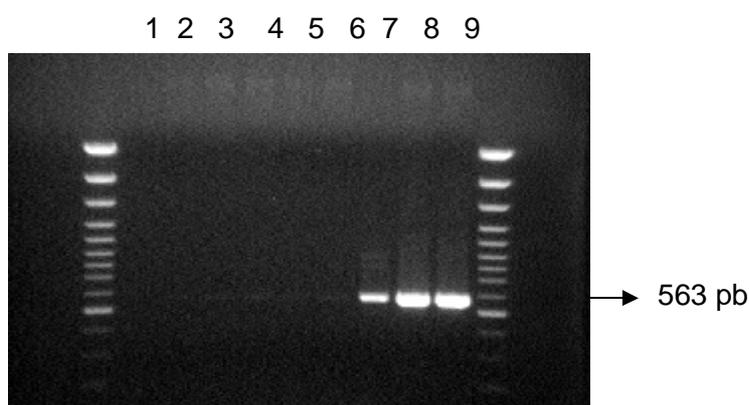


Figura 17: Gel con los productos de amplificación del 16S de *Gordonia* comparado con otros mycolata relacionados. 1: Blanco sin DNA, 2: *Tsukamurella paurometabola*, 3: *Rhodococcus rhodochrous*, 4: *R. rhodnii*, 5: *Nocardia brasiliensis*, 6: *N. asteroides*. 7: *Gordonia rubropertincta*, 8: *G. terrae* 9: *G. amarae*.

2.5.- *Rhodococcus*

Los iniciadores Rq1 y Rq2 propuestos por Bell *et al.* (1996) son específicos para *R. equi* que es la especie más importante desde el punto de vista clínico. La especificidad de los iniciadores se ha comprobado con el programa informático BLAST. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 450 pb únicamente en la especie *R. equi*. Se ha comprobado la eficacia de estos iniciadores con otras cepas de mycolata (Fig. 18).

Los iniciadores Re1 y Re2 propuestos por Bell *et al.* (1999) son específicos para *R. erythropolis*. Se ha demostrado que esta especie es responsable de la formación de espumas en sistemas de fangos activos (Soddell *et al.*, 1998). La especificidad de los iniciadores se ha comprobado con el programa informático BLAST. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 449 pb únicamente en la especie *R. erythropolis*. Al igual que

en el caso de *R. equi* se ha comprobado la eficacia de estos iniciadores con otras cepas de mycolata (Figura 19).

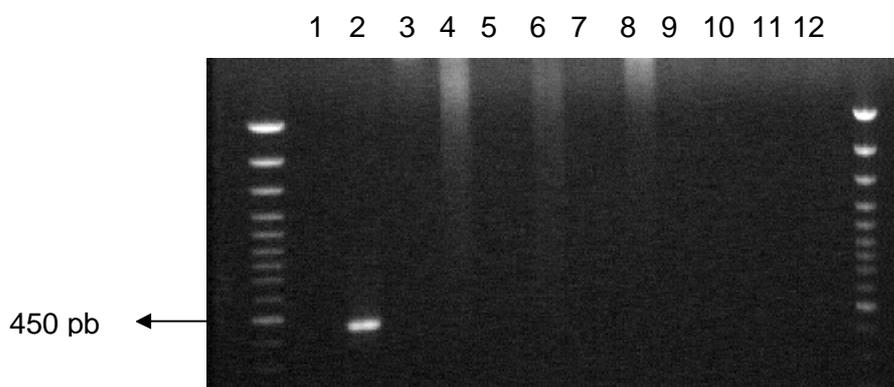


Figura 18: Gel con el producto de amplificación de *R. equi* comparado con otros *Rhodococcus* y otros mycolata. 1: Blanco sin DNA, 2: *R. equi*, 3: *R. rhodochrous*, 4: *R. rhodni*, 5: *R. erythropolis*, 6: *R. coprophilus*, 7: *D. maris*, 8: *G. rubropertincta*, 9: *G. amarae*, 10: *N. asteroides*, 11: *T. paurometabola*, 12: *C. xerosis*.

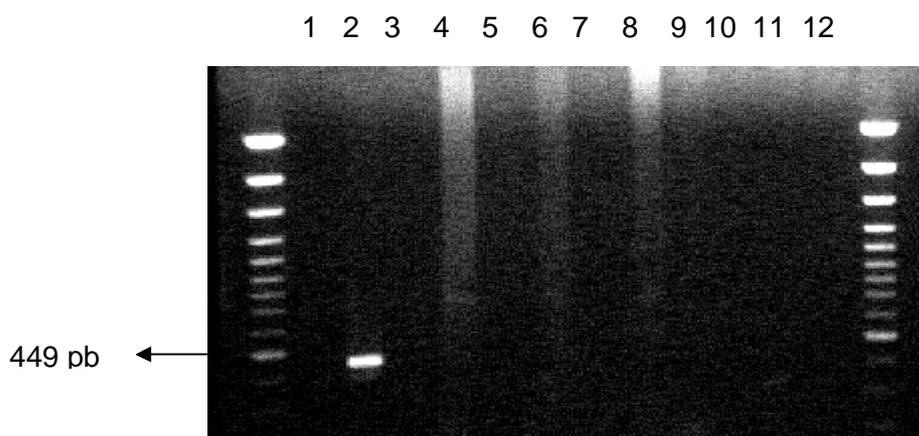


Figura 19: Gel con el producto de amplificación de *R. erythropolis* comparado con otros *Rhodococcus* y otros mycolata. 1: Blanco sin DNA, 2: *R. erythropolis*, 3: *R. rhodochrous*, 4: *R. rhodni*, 5: *R. erythropolis*, 6: *R. coprophilus*, 7: *D. maris*, 8: *G. rubropertincta*, 9: *G. amarae*, 10: *N. asteroides*, 11: *T. paurometabola*, 12: *C. xerosis*.

RESULTADOS

Se han diseñado unos iniciadores específicos a nivel de género *Rhodococcus* que permiten caracterizar los aislados obtenidos cuyas características fenotípicas coinciden con este género. Utilizando el programa informático BLAST se ha comprobado la especificidad de estos iniciadores. Estos iniciadores no presentan alineamiento con la especie *R. erythropolis* y contienen un desapareamiento interno con las especies *R. rhodnii* y *R. rhodochrous*. Los iniciadores Rg1 y Rg2 amplifican un fragmento de 980 pb en todas las especies de *Rhodococcus* de referencia (excepto *R. erythropolis*) y *Dietzia maris* (Figura 20).

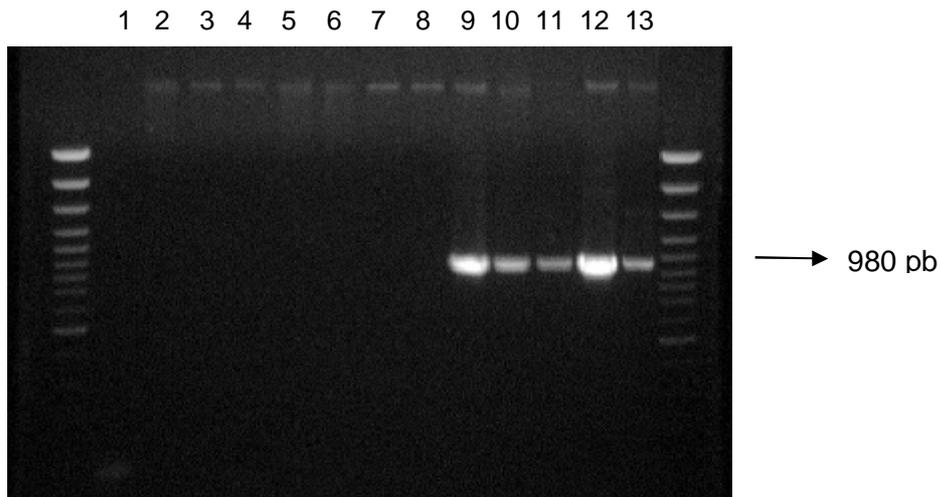


Figura 20: Gel con los productos de amplificación del fragmento del 16S DNA de *Rhodococcus* comparado con otros mycolata. 1: Blanco sin DNA, 2: *Corynebacterium xerosis*, 3: *Tsukamurella paurometabola*, 4: *Nocardia brasiliensis*, 5: *N. asteroides*, 6: *Gordonia terrae*, 7: *G. amarae*, 8: *R. erythropolis*, 9: *Dietzia maris*, 10: *R. coprophilus*, 11: *R. equi*, 12: *R. rhodnii*, 13: *R. rhodochrous*.

3.- Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) en cepas de referencia

3.1.- Optimización de la permeabilización de mycolata

El protocolo más utilizado para detectar por FISH mycolata en muestras de fango es el propuesto por de los Reyes *et al.* (1997). En este caso las células se fijan con paraformaldehído y se permeabilizan con mutanolisina. El protocolo propuesto por Carr *et al.* (2003) consiste básicamente en una hidrólisis ácida seguida de dos tratamientos con mutanolisina y lisozima. La fijación con formaldehído se realiza al final del proceso (ver apartado 6.2 de material y métodos). Los resultados de ambos procedimientos se presentan a continuación.

3.1.1.- Hibridación según el protocolo de los Reyes

Con la sonda general EUB 338, utilizada como control positivo para la puesta a punto de la permeabilización, se detectó señal de hibridación en todas las cepas de referencia excepto en *T. paurometabola*. En la figura 21 se pueden ver algunos ejemplos. Se utilizó como control *Streptomyces albus*. La sonda EUB 338 está marcada con rodamina por lo tanto la señal observada es de color rojo.

Con la sonda Myc 657 marcada con rodamina se detectó señal en todas las cepas de referencia excepto en *Tsukamurella paurometabola*, *Nocardia carnea* y *N. soli*. (Fig. 22). Con la sonda Myb 736 se detectó señal en todas las cepas excepto en *N. carnea* y *N. soli*. Con esta última sonda la señal detectada fue menor que con las otras dos sondas (Fig. 23). En *Streptomyces albus* utilizada como control negativo con estas dos últimas sondas no se obtuvo señal.

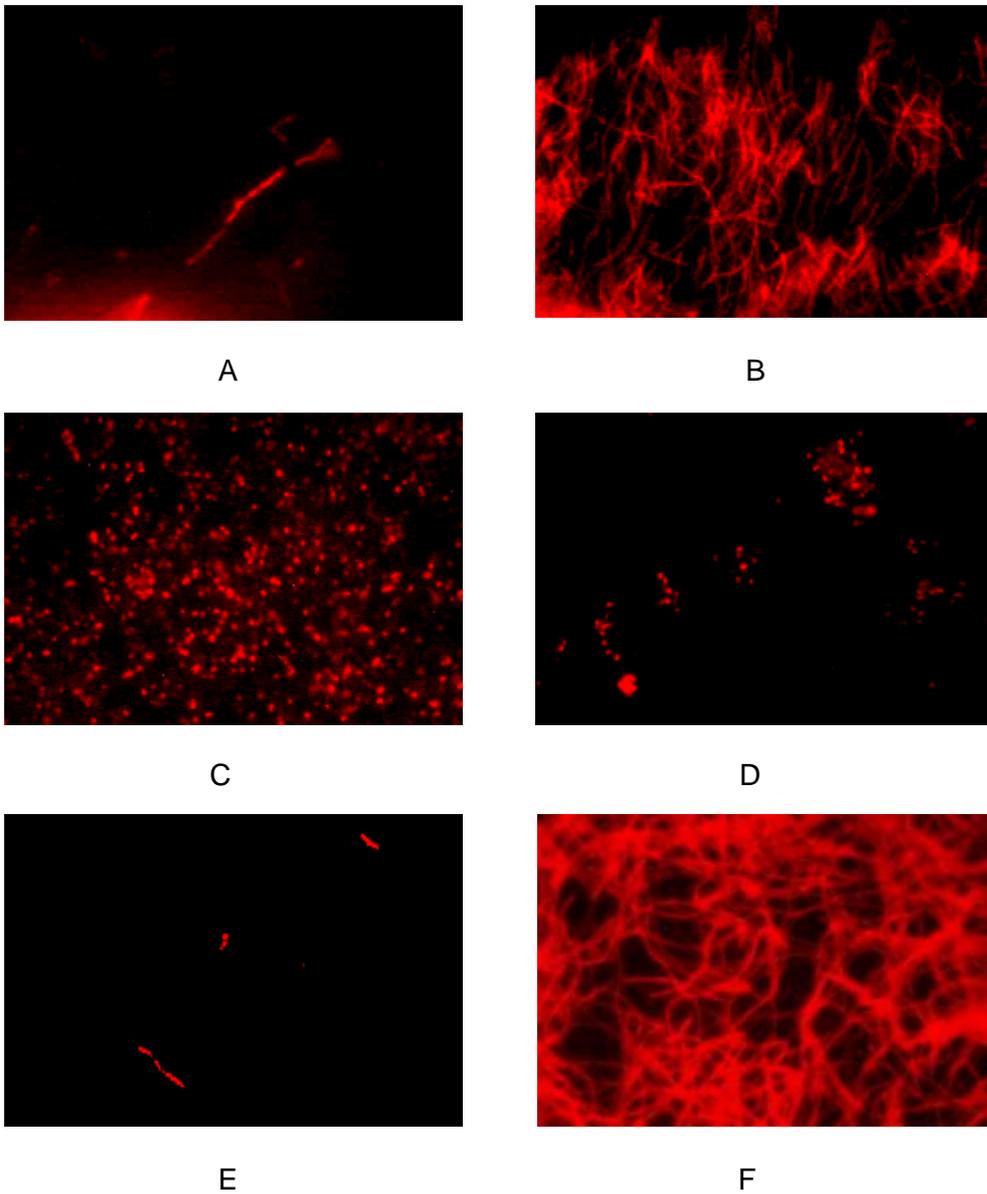
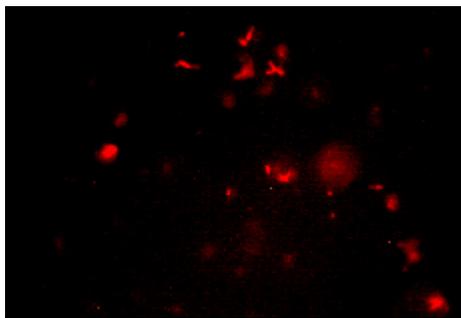
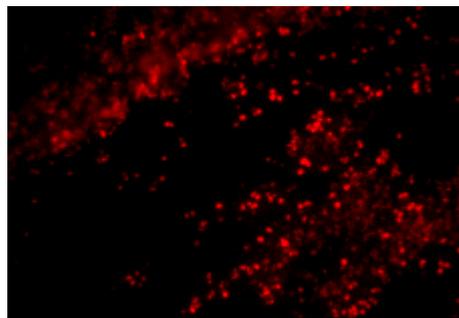


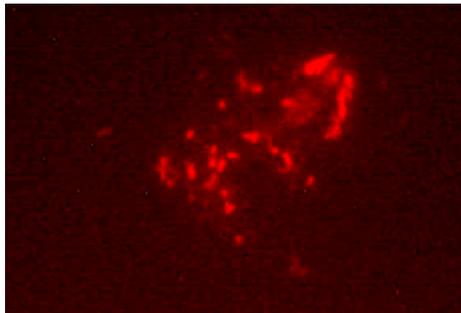
Figura 21: Hibridación *in situ* con la sonda EUB 338 según el protocolo de los Reyes. A) *N. asteroides*, B) *N. carnea*, C) *R. equi*, D) *R. rhodochrous*, E) *G. amarae*, F) *S. albus*.



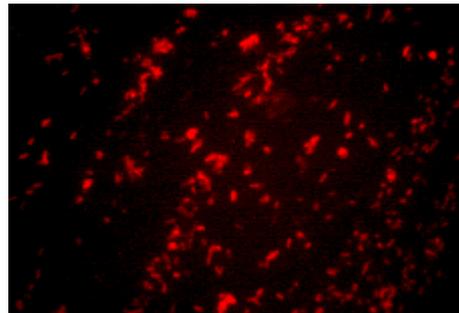
A



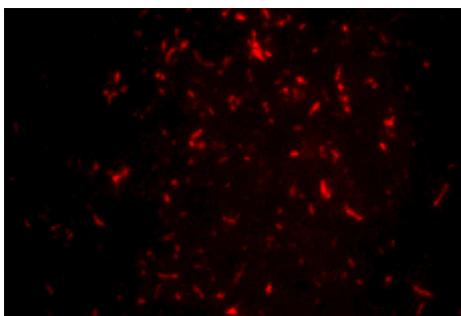
B



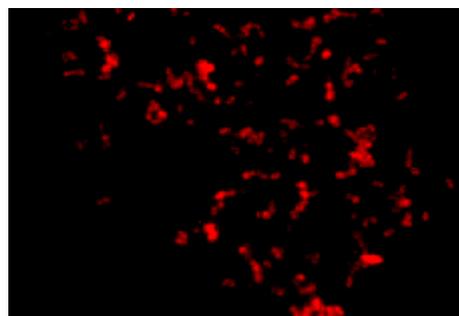
C



D



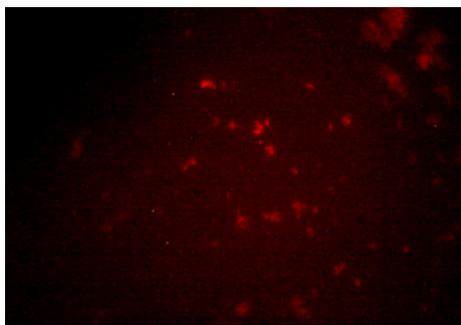
E



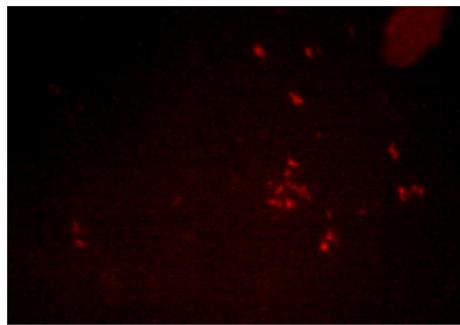
F

Figura 22: Hibridación *in situ* con la sonda Myc 657 según el protocolo de los Reyes. A) *G. amarae*, B) *R. rhodochrous*, C) *M. komossense*, D) *N. nova*, E) *G. rubropertincta.*, F) *R. erythropolis*.

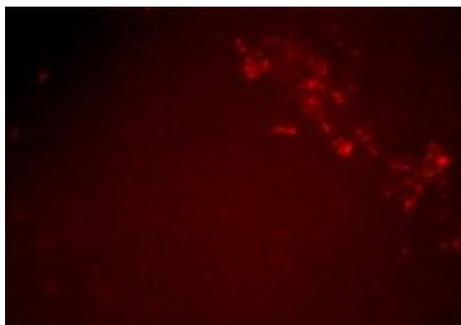
RESULTADOS



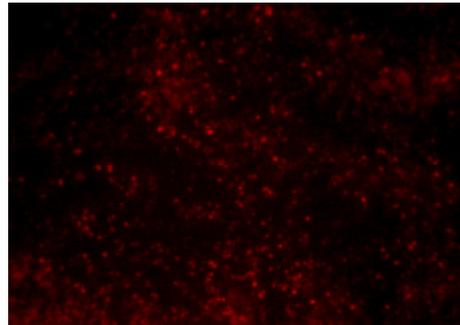
A



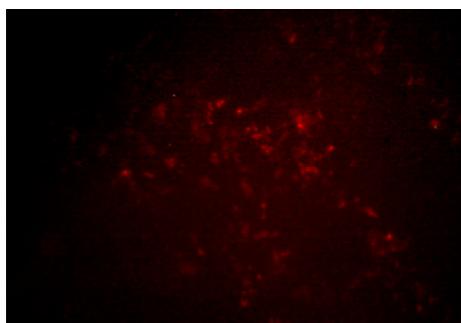
B



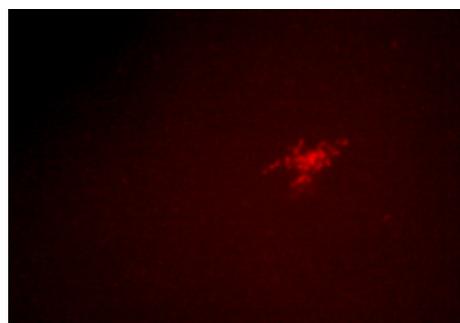
C



D



E



F

Figura 23: Hibridación *in situ* con la sonda Myb 736 según el protocolo de los Reyes. A) *N. brasiliensis*, B) *G. amarae*, C) *R. equi*, D) *R. rhodochrous*, E) *G. terrae*, F) *M. komossense*.

RESULTADOS

3.1.2.- Hibridación según el protocolo de Carr

Con el protocolo propuesto por Carr *et al.* (2003) se detectó señal en todas las cepas de referencia. La intensidad de la señal fue similar al método de los Reyes aunque se observó que este método alteraba la morfología celular (Fig. 24-26). En ocasiones esta alteración de la morfología dificultó la medida de la intensidad.

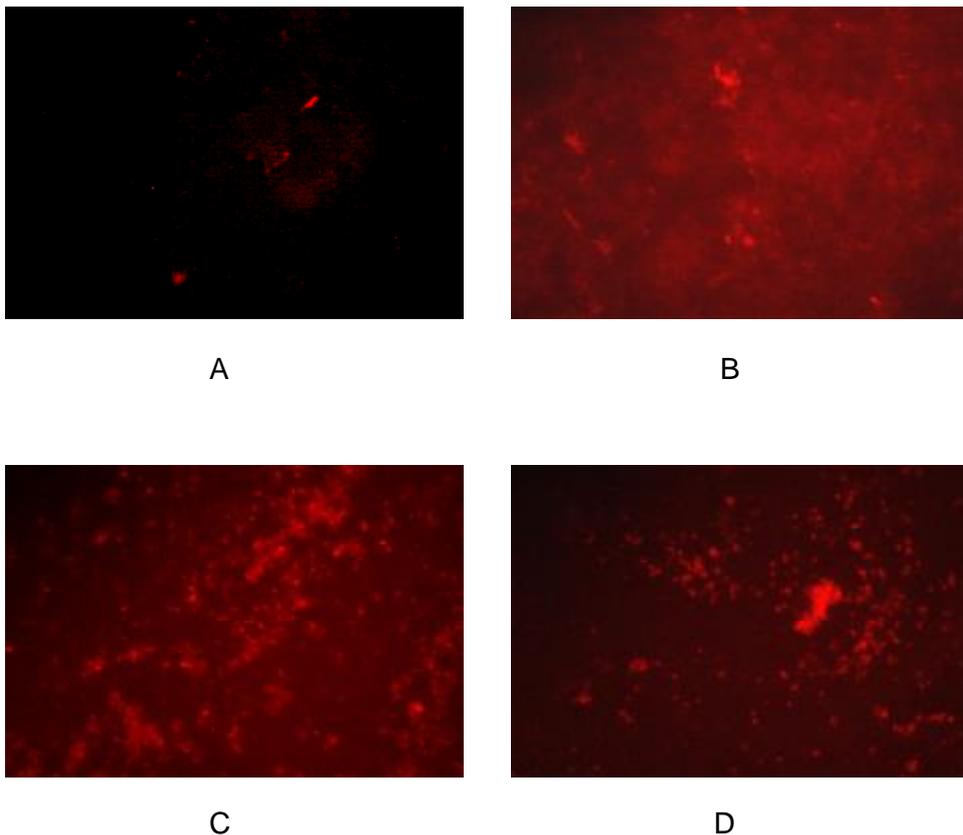
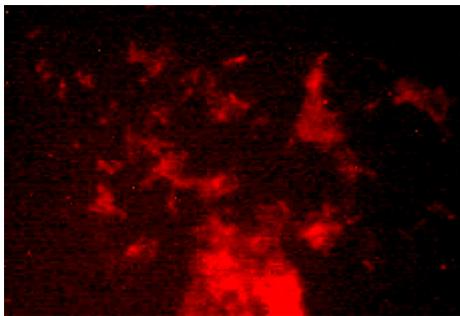
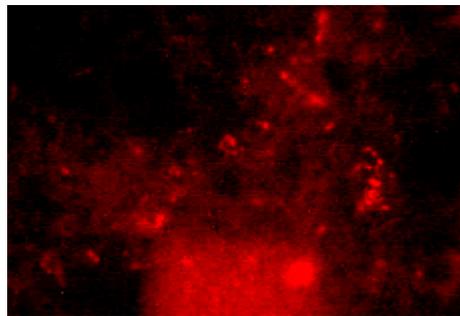


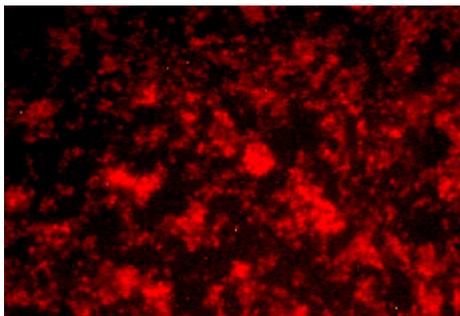
Figura 24: Hibridación *in situ* con la sonda EUB 338 según el protocolo de Carr. A) *N. asteroides*, B) *G. amarae*, C) *R. rhodochous*, D) *D. maris*



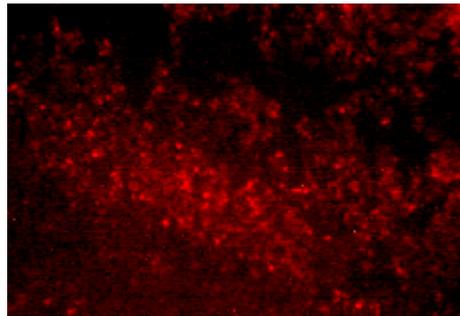
A



B



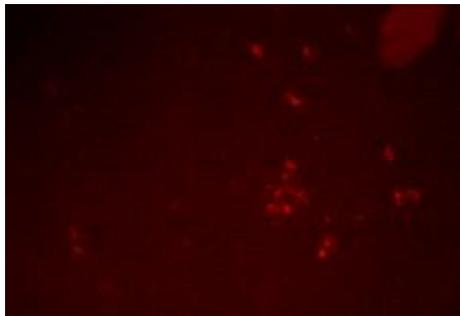
C



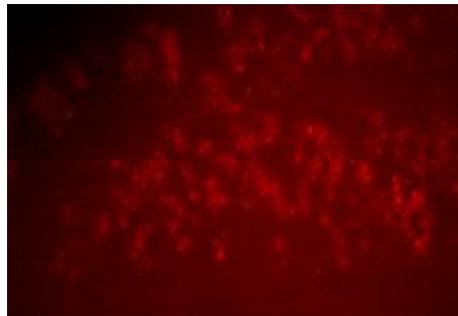
D

Figura 25: Hibridación *in situ* con la sonda Myc 657 según el protocolo de Carr. A) *N. asteroides*, B) *G. amarae*, C) *R. rhodnii*, D) *R. erythropolis*

RESULTADOS



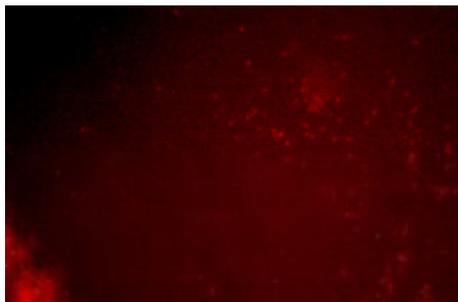
A



B



C



D

Figura 26: Hibridación *in situ* con la sonda Myb 736 según el protocolo de Carr. A) *G. amarae*, B) *N. nova*, C) *R. rhodochrous*, D) *R. erythropolis*

RESULTADOS

3.1.3.- Análisis de la señal de hibridación y tratamiento estadístico

Con el programa DP-Soft Versión 3.2 se cuantificó la intensidad de la señal. No se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos en cuanto a intensidad de la señal. Sin embargo el protocolo propuesto por Carr *et al.* (2003) altera la morfología celular en muchas cepas. Esta alteración es tan grande que en ocasiones no se puede medir la intensidad de una manera fiable.

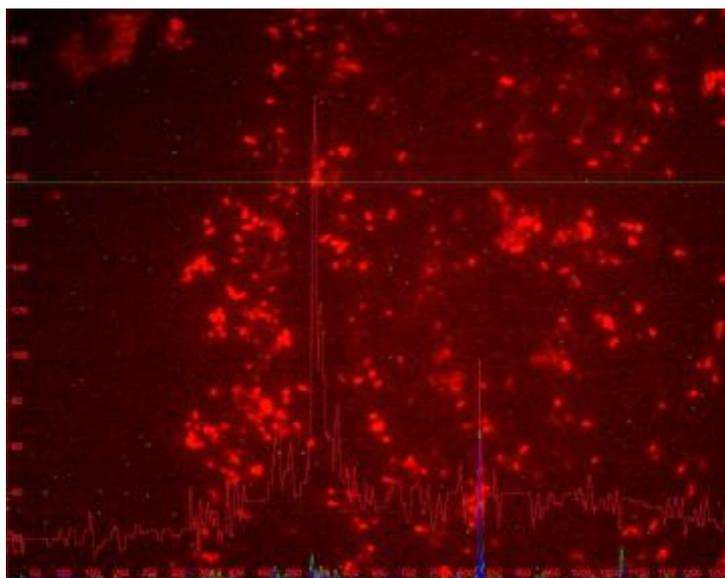


Figura 27: Medida de la intensidad de la señal utilizando el programa DP-Soft.

Utilizando el programa estadístico SPSS se realiza una comparación estadística (ANOVA) entre las medidas de intensidad obtenidas con objeto de observar si hay diferencias significativas entre los protocolos de hibridación y entre las sondas utilizadas (Tablas 17-22).

RESULTADOS

Tabla 17: Comparación de la medida de la intensidad entre los protocolos de Reyes y Carr utilizando la sonda EUB 338.

	Nº de medidas	gl	Media cuadrática	F	Valor P
<i>Mycolata</i>	108	1	373,407	8,867	0,003*
<i>Gordonia</i>	18	1	4,000	0,132	0,719
<i>Nocardia</i>	36	1	98,000	2,643	0,108
<i>Rhodococcus</i>	30	1	98,817	2,600	0,112

* Existen diferencias significativas

Tabla 18: Comparación de la medida de la intensidad entre los protocolos de Reyes y Carr utilizando la sonda 657.

	Nº de medidas	gl	Media cuadrática	F	Valor P
<i>Mycolata</i>	90	1	2,450	0,048	0,826
<i>Gordonia</i>	18	1	0,250	0,006	0,939
<i>Nocardia</i>	24	1	44,083	1,453	0,234
<i>Rhodococcus</i>	30	1	24,067	0,565	0,455

Tabla 19: Comparación de la medida de la intensidad entre los protocolos de Reyes y Carr utilizando la sonda 736.

	Nº de medidas	gl	Media cuadrática	F	Valor P
<i>Mycolata</i>	90	1	372,672	9,906	0,002*
<i>Gordonia</i>	18	1	46,694	1,816	0,187
<i>Nocardia</i>	24	1	154,083	4,195	0,050
<i>Rhodococcus</i>	30	1	19,267	0,531	0,469

* Existen diferencias significativas

Como puede observarse en la tabla 17, que compara los dos protocolos de permeabilización, existen diferencias significativas en la intensidad de la señal si consideramos todas las cepas de mycolata. Esto puede ser debido principalmente a la variabilidad que existe en el grupo de mycolata en cuanto a la longitud de los ácidos micólicos que son los responsables de la alta resistencia a la permeabilización. La diferencia en la intensidad de la señal de hibridación fue significativa y con un valor medio de señal más alto con el protocolo de los Reyes comparado con el de Carr. Sin embargo cuando realizamos la comparación considerando solo los géneros *Gordonia*, *Nocardia* y *Rhodococcus* ya no existen diferencias significativas.

Con la sonda 657 (Tabla 18) no existen diferencias significativas entre el grupo de los mycolata y los géneros estudiados. Esto indica que la sonda 657 tiene fácil accesibilidad a la estructura secundaria del rRNA 16S. Con la sonda 736 (Tabla 19) se observan diferencias significativas únicamente si consideramos todo el grupo de mycolata.

Para realizar la comparación de la intensidad entre las sondas utilizadas se utilizó el protocolo de los Reyes (Tablas 20-22). Como se muestra en la tabla 20 no existen diferencias significativas entre el grupo de mycolata ni entre los géneros *Gordonia*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. Por el contrario la comparación entre las sondas EUB y 736 (Tabla 21) muestra diferencias debido a la dificultad de acceso de la sonda al sitio diana. Por lo general la intensidad detectada con la sonda 736 fue débil.

Igualmente, la comparación entre las sondas 657 y 736 muestra diferencias significativas entre todos los grupos, lo que confirma que la sonda 736 tiene difícil acceso a su zona diana.

Tabla 20: Comparación de la medida de la intensidad entre las sondas EUB y 657 utilizando el protocolo de los Reyes.

	Nº de medidas	gl	Media cuadrática	F	Valor P
<i>Mycolata</i>	90	1	51,200	1,193	0,276
<i>Gordonia</i>	18	1	61,361	1,601	0,214
<i>Nocardia</i>	24	1	0,083	0,003	0,956
<i>Rhodococcus</i>	30	1	48,600	1,304	0,258

Tabla 21: Comparación de la medida de la intensidad entre las sondas EUB y 736 utilizando el protocolo de los Reyes.

	Nº de medidas	gl	Media cuadrática	F	Valor P
<i>Mycolata</i>	90	1	2311,250	54,870	0,000*
<i>Gordonia</i>	18	1	294,694	9,275	0,004*
<i>Nocardia</i>	24	1	720,750	19,886	0,000*
<i>Rhodococcus</i>	30	1	481,667	11,196	0,001*

*Existen diferencias significativas

Tabla 22: Comparación de la medida de la intensidad entre las sondas 657 y 736 utilizando el protocolo de los Reyes.

	Nº de medidas	gl	Media cuadrática	F	Valor P
<i>Mycolata</i>	90	1	1654,450	37,394	0,000*
<i>Gordonia</i>	18	1	625,000	20,157	0,000*
<i>Nocardia</i>	24	1	736,333	29,723	0,000*
<i>Rhodococcus</i>	30	1	224,267	5,597	0,021*

*Existen diferencias significativas

4.- Puesta a punto de un método de aislamiento

4.1.- Selección de medios de cultivo

Todas las cepas de referencia se sembraron en los medios de cultivo seleccionados con idea de elegir los más adecuados para el aislamiento de la mayoría de las cepas y observar el posible cambio de morfología de las colonias de un medio a otro. En la tabla 23 puede observarse el crecimiento comparativo de las cepas de referencia en los medios utilizados.

Tabla 23: Crecimiento comparativo de las cepas de referencia en los distintos medios de cultivo seleccionados. CM: Czapeck Modificado; GY: Glucosa extracto de levadura; MZ: Münz parafina; B: Benett; TY: Triptona extracto de levadura; S: Sauton; ST: Sauton con tiamina; AIC: Actinomicete Isolation Agar (Difco); BYCE: Selectivo para *Legionella*. +++: crecimiento máximo; ++: crecimiento medio; +: crecimiento mínimo; -: no se observa crecimiento.

Cepa	CM	GY	MZ	B	TY	S	ST	AIC	BCYE
3051	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	++
3052	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	++
3053	+++	++	++	+++	++	++	++	+	++
3056	+++	+++	++	++	++	++	++	+	++
3374	+++	++	++	++	++	+	++	+	+
3375	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+	++
5704	++	++	-	+++	+++	++	++	+	-
5393	+++	+++	-	+++	++	++	++	++	++
5707	+++	++	-	+++	++	++	++	+	++
5751	++	++	+	++	++	+	+++	+	+
555	++	++	+	++	++	++	+++	+	+
3013	+++	++	-	+++	++	++	+++	+	+
5750	++	+++	+	+++	++	+	+++	+	-
5749	++	++	-	++	++	++	+++	+	+
4617	++	++	-	++	+	+	++	-	+
3055	++	+++	-	+++	++	++	++	+	++
3034	++	++	-	++	++	+	+	+	+
4160	++	++	-	++	++	-	-	-	-

En los medios CM, GY, B y TY se observa un buen crecimiento en todas las cepas de referencia. GY y TY tienen una composición similar en cuanto a fuentes de carbono y nitrógeno, en cambio la composición del medio CM es diferente. Este último medio ha sido usado frecuentemente para aislar nocardioformes en muestras de espuma y se considera selectivo de actinomicetos (Schuppler *et al.*, 1995).

El medio S está diseñado para el cultivo de *Rhodococcus*. Como puede verse en la tabla 23 en este medio suplementado con tiamina se produce un crecimiento mayor en todas las cepas de *Rhodococcus* si lo comparamos con el mismo medio sin tiamina y con el resto de medios de cultivo.

El medio MZ se caracteriza por contener como única fuente de carbono el aceite de parafina. Las especies del género *Nocardia* se caracterizan por la capacidad de usar este aceite como única fuente de carbono. Las únicas cepas que presentaron un crecimiento apreciable fueron las nocardias aunque se necesitó un tiempo de incubación más largo (de 14 a 21 días) para obtener colonias visibles.

El medio AIA es un medio comercial (Difco) diseñado para el aislamiento de actinomicetos. Las cepas ensayadas presentaron un escaso crecimiento en este medio. Este medio es muy adecuado para el aislamiento de *Streptomyces* y otros esporoactinomicetos del suelo.

El medio BCYE aunque está diseñado para el aislamiento de *Legionella* ha sido utilizado con éxito para el aislamiento de *Nocardia* en muestras clínicas. Todas las especies de *Nocardia* presentaron un buen

crecimiento excepto *N. carnea* que presentó un crecimiento mínimo. *G. amarae* no pudo crecer en BCYE.

A la vista de estos resultados obtenidos los medios seleccionados fueron el CM como medio general de aislamiento para todas las cepas, como medio selectivo para el género *Nocardia* se utilizó el medio de MZ y para el aislamiento de especies de *Rhodococcus* el medio de ST. El medio de cultivo BCYE se utilizó al comienzo de este trabajo para aislar *Nocardia* pero se dejó de utilizar por diversos motivos: en primer lugar el medio de MZ es más efectivo para el aislamiento de *Nocardia*, en segundo lugar la principal especie productora de espumas, *G. amarae*, no crece en este medio.

La especie *Skermania piniformis* no se incluyó en el estudio comparativo de los medios de cultivo debido a su lento crecimiento (de tres a cuatro semanas para observar colonias de escasos milímetros) y a que requiere un medio específico para su crecimiento (Medio 180 de la CECT). Por otro lado, esta especie sólo se ha detectado en plantas de tratamiento australianas y el único método con el que se ha conseguido aislar es con el micromanipulador de Skerman.

4.2.- Descontaminación previa de las muestras.

Las primeras muestras de fango activado analizadas se procesaron sin descontaminación previa, es decir, realizando directamente un recuento en placa sobre los medio seleccionados. Aunque se consiguió aislar mycolata, la microbiota de rápido crecimiento interfería en su aislamiento. Los métodos de descontaminación de la muestra utilizados antes del

recuento eliminaron gran parte de esta microbiota facilitando así el aislamiento de cepas.

El gran contenido lipídico de los mycolata les confiere impermeabilidad y resistencia a los desinfectantes (Sutcliffe, 1998). Los protocolos de desinfección utilizados en muestras clínicas para aislar nocardias patógenas son efectivos para reducir la microbiota acompañante de rápido crecimiento. Los tratamientos descontaminantes se aplicaron en primer lugar a suspensiones de *N. asteroides*, *G. amarae* y *R. rhodochrous*. Posteriormente se aplicaron a muestras de fango activado inoculadas artificialmente con dichas cepas. Los resultados de la puesta a punto de la descontaminación se muestran en las tablas 24 a 29.

Como puede verse en las tablas 24 a 26 el tiempo óptimo de contacto de la bacteria con el desinfectante es de un minuto. En las tablas 27 a 29 se exponen los resultados de agua residual inoculada. Los resultados muestran una mayor reducción de la microbiota acompañante mientras que la de las cepas inoculadas es menor.

En los ensayos de descontaminación con muestras de fango inoculadas artificialmente se observó, además de una reducción cuantitativa, una reducción cualitativa, ya que la microbiota de rápido crecimiento de tipo invasivo se eliminó en gran medida. Este tipo de microbiota es la que principalmente dificultaba el aislamiento en las muestras sin descontaminar.

RESULTADOS

Tabla 24: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados, a diferentes tiempos de contacto, a una suspensión de *N. asteroides* de 5×10^7 ufc/ml.

Tiempo de contacto	Tratamiento descontaminante		
	CIBk 0,3 %	NaOH 2 %	NALC 0,5 %
1 min	$6,1 \times 10^5$	$3,6 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$
10 min	$< 10^3$	$< 10^3$	$< 10^3$
30 min	-	-	-
1 h	-	-	-

Tabla 25: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados, a diferentes tiempos de contacto, a una suspensión de *G. amarae* de 8×10^6 ufc/ml.

Tiempo de contacto	Tratamiento descontaminante		
	CIBk 0,3 %	NaOH 2 %	NALC 0,5 %
1 min	$3,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
10 min	$< 10^3$	$< 10^3$	$< 10^3$
30 min	-	-	-
1 h	-	-	-

Tabla 26: Resultados de los tratamientos de descontaminación aplicados, a diferentes tiempos de contacto, a una suspensión de *R. rhodochrous* de $3,5 \times 10^7$ ufc/ml.

Tiempo de contacto	Tratamiento descontaminante		
	CIBk 0,3 %	NaOH 2 %	NALC 0,5 %
1 min	7×10^3	$3,1 \times 10^3$	$8,1 \times 10^4$
10 min	$< 10^3$	$< 10^3$	$< 10^3$
30 min	-	-	-
1 h	-	-	-

RESULTADOS

Tabla 27: Tratamientos de descontaminación aplicados a una muestra de fango activado inoculada con una suspensión de *N. asteroides* de $2,8 \times 10^8$ ufc/ml . Tiempo de contacto 1 minuto.

Recuento (ufc/ml)	Control sin descontaminar	Tratamiento descontaminante		
		CIBk 0,3%	NaOH 2%	NALC 0,5%
Viables	$1,7 \times 10^8$	$2,2 \times 10^4$	8×10^5	7×10^5
<i>N. asteroides</i>	$1,4 \times 10^8$ *	3×10^5	$7,5 \times 10^6$	5×10^6

*Valor estimado (50% de la suspensión inoculada)

Tabla 28: Tratamientos de descontaminación aplicados a una muestra de fango activado inoculada con una suspensión de *G. amarae* de $1,5 \times 10^7$ ufc/ml. Tiempo de contacto 1 minuto.

Recuento (ufc/ml)	Control sin descontaminar	Tratamiento descontaminante		
		CIBk 0,3%	NaOH 2%	NALC 0,5%
Viables	$2,5 \times 10^7$	$8,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
<i>G. amarae</i>	$7,5 \times 10^6$ *	8×10^4	4×10^5	$1,1 \times 10^5$

*Valor estimado (50% de la suspensión inoculada)

Tabla 29: Tratamientos de descontaminación aplicados a una muestra de fango activado inoculada con una suspensión de *R. rhodochrous* de 5×10^8 ufc/ml. Tiempo de contacto 1 minuto.

Recuento (ufc/ml)	Control sin descontaminar	Tratamiento descontaminante		
		CIBk 0,3%	NaOH 2%	NALC 0,5%
Viables	$2,6 \times 10^8$	$7,2 \times 10^3$	$5,7 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
<i>R. rhodochrous</i>	$2,5 \times 10^8$ *	$6,9 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$

*Valor estimado (50% de la suspensión inoculada)

4.3.- Aislados obtenidos

Se analizaron un total de 26 muestras de fango activo desde abril de 2002 hasta octubre de 2003. Todas las muestras recibidas se observaron microscópicamente para detectar morfologías tipo GALO. Las muestras que se analizaron fueron aquellas en donde se detectaron este tipo de morfología. Se realizó tinción Gram y observación en fresco con contraste de fases (Fig. 28 y 29).

En las tablas 30 y 31 se presentan las cepas de mycolata aislados sin descontaminación de la muestra y con descontaminación y caracterizados con las diversas técnicas utilizadas en este trabajo. Como puede observarse, en las muestras de fango procesadas con descontaminación la media del número de aislados por muestra fue de 3 mientras que en el caso de las muestras procesadas sin descontaminación esta cifra fue la mitad. Por lo tanto en las muestras descontaminadas el rendimiento de aislados fue mayor debido principalmente a la reducción de la microbiota acompañante de rápido crecimiento de tipo invasivo.

En todos los medios utilizados, excepto el de BCYE, se añadió ácido nalidíxico (20 mg/l) para inhibir el crecimiento de Gram-negativos. No se necesitó antifúngico ya que en este tipo de muestras la población de hongos filamentosos es escasa y no suelen interferir en el aislamiento.

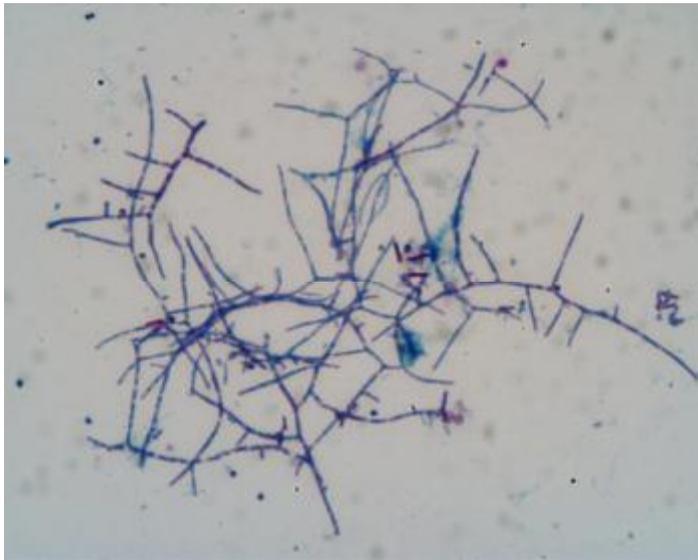


Figura 28: Tinción Gram de una muestra de fango activo. Se observa claramente la morfología tipo GALO con ramificaciones en ángulo recto.



Figura 29: Observación a 40X con contraste de fases de un flóculo con un filamento tipo GALO.

Tabla 30: Aislados obtenidos de muestras de fango sin descontaminación. Se indica el medio de cultivo donde fueron aisladas así como el género al que pertenecen.

EDAR (Nº Muestras)	MEDIO DE CULTIVO	AISLADO	IDENTIFICACIÓN (Género)
ROJALES (1)	BCYE	N1	<i>Mycobacterium</i>
	BCYE	N2	<i>Mycobacterium</i>
FORMENTERA (1)	CM	N4	<i>Mycobacterium</i>
MORA D'EBRE (1)	CM	N5	<i>Mycobacterium</i>
MONTESINOS (1)	BCYE	N6	<i>Nocardia</i>
VALL D'UXO (3)	MZ	N7	<i>Nocardia</i>
	CM	N9-1	<i>Mycobacterium</i>
	MZ	N9-3	<i>Nocardia</i>
	ST	N20-1	<i>Gordonia</i>
	CM	N20-4	<i>Gordonia</i>
	ST	N20-5	<i>Gordonia</i>
CASTELLON (4)	ST	N10-2	<i>Rhodococcus</i>
	CM	N16-9	<i>Mycobacterium</i>
	ST	N18-4 a	<i>Rhodococcus</i>
	ST	N18-4 b	<i>Rhodococcus</i>
	BCYE	N22-7	<i>Gordonia</i>
	ST	N22-11	<i>Gordonia</i>
QUART (1)	CM	N12-2	<i>Gordonia</i>
SAGUNTO (1)	ST	N14-12	<i>Gordonia</i>
VIVER (1)	CM	N17-4	<i>Mycobacterium</i>
	CM	N17-8	<i>Gordonia</i>
	ST	N17-11	<i>Rhodococcus</i>

RESULTADOS

Tabla 31: Aislados obtenidos en muestras de fangos con descontaminación. Se indica el medio donde fueron aislados así como el género al que pertenecen.

EDAR (Nº muestras)	MEDIO	AISLADO	IDENTIFICACIÓN (Género)
MASQUEFA (1)	CM	D1	<i>Gordonia</i>
	CM	D2	<i>Gordonia</i>
	CM	D3	<i>Gordonia</i>
	CM	D6	<i>Gordonia</i>
	MZ	D27	<i>Nocardia</i>
CARRAIXET (1)	CM	D5	<i>Gordonia</i>
	CM	D9	<i>Corynebacterium</i>
	MZ	D18	<i>Nocardia</i>
	ST	D19	<i>Corynebacterium</i>
CASTELLÓN (1)	ST	D13	<i>Gordonia</i>
	CM	D14	<i>Gordonia</i>
GANDÍA (8)	CM	D15	<i>Gordonia</i>
	MZ	D22	<i>Gordonia</i>
	CM	D33	<i>Gordonia</i>
	MZ	D39	<i>Nocardia</i>
	ST	D29	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D30	<i>Gordonia</i>
	ST	D46	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D49	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D58	<i>Gordonia</i>
	ST	D60	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D61	<i>Rhodococcus</i>
	CM	D67	<i>Gordonia</i>
	CM	D69	<i>Gordonia</i>
	ST	D70	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D66	<i>Rhodococcus</i>
JÁTIVA (1)	CM	D71	<i>Gordonia</i>
	ST	D78	<i>Gordonia</i>
	CM	D81	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D95	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D96	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D98	<i>Gordonia</i>
	CM	D101	<i>Rhodococcus</i>
	ST	D103	<i>Rhodococcus</i>
	CM	D104	<i>Rhodococcus</i>
ST	D105	<i>Gordonia</i>	

En la tabla 31 no se indica el tipo de tratamiento de descontaminación aplicado ya que no se observó relación entre el tratamiento aplicado y el tipo de bacteria aislada. El denominador común de los tratamientos descontaminantes fue una reducción considerable de la microbiota acompañante de rápido crecimiento, lo que facilitó en gran medida el aislamiento de especies de nocardioformes de lento crecimiento.

Por el contrario, si que se observaron diferencias entre los medios de cultivo empleados y los aislados obtenidos sobre todo en el caso de *Nocardia* y *Rhodococcus*. Se aisló un escaso número de nocardias, 5 de las 6 cepas fueron aisladas en el medio de Münz con parafina y la otra cepa fue aislada en el medio BCYE. De las 17 cepas de *Rhodococcus* aisladas, 13 fueron en el medio ST y el resto en CM lo cual indica la idoneidad del primer medio para el aislamiento de *Rhodococcus*.

Para el género *Gordonia* (26 cepas aisladas) no se observaron este tipo de diferencias siendo igualmente aisladas en el medio CM que en el ST.

Los aislados obtenidos fueron resembrados en YEME para la obtención de un cultivo puro. Los aislados con morfología característica, Gram-positivos, catalasa positivos y que contienen ácidos micólicos (Fig. 30) se conservaron en crioviales con glicerol al 20%. Del mismo cultivo se congelan células en TE para posterior extracción de DNA.

Se han obtenido un total de 58 aislados que contienen ácidos micólicos (Ver tablas 30 y 31). La mayoría de los aislados pertenecen al género *Gordonia* que es el género mas frecuentemente implicado en la formación de espumas. El segundo grupo de aislados, en orden de

importancia, pertenece al género *Rhodococcus* que es de crecimiento mas rápido y por lo tanto de fácil aislamiento. Las nocardias pertenecen al último grupo y han sido aisladas principalmente en el medio de Münz que es selectivo para el género *Nocardia*.

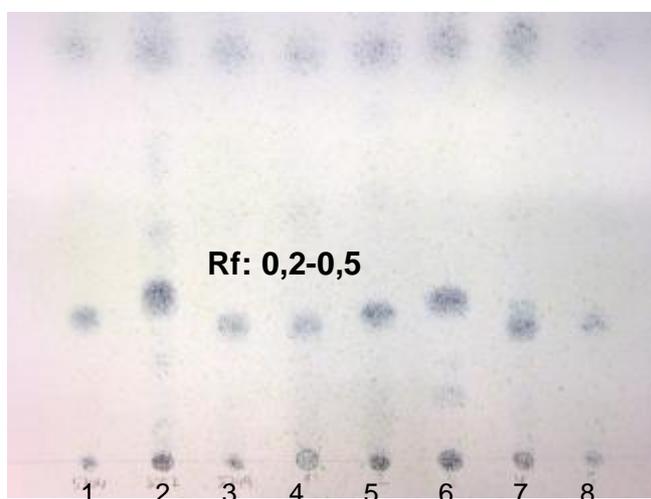


Figura 30: Cromatoplaca utilizada para la detección de ácidos micólicos. 1: *Gordonia amarae*, 2: *Nocardia brasiliensis*, 3: *Rhodococcus rhodochrous*, 4: N 18-4 a, 5: D 5, 6: D 18, 7: N 17-8, 8: D 3.

Se han aislado cepas de mycolata en el 87% de las muestras de fango activado analizadas con problemas de espumas biológicas. Las muestras de las que no se aisló ninguna cepa no figuran en la tabla 30. Estas muestras se procesaron sin descontaminación previa, por lo que cabe pensar, a la vista del aumento en el rendimiento en muestras descontaminadas, que si hubieran sido descontaminadas el porcentaje anterior habría sido del 100%. De esta manera se confirma la relación existente entre la presencia de mycolata y la formación de espumas. La mayoría de los aislados pertenecen a los géneros *Gordonia* y *Rhodococcus*.

5.- Caracterización de aislados

5.1.- Fenotípicamente

La morfología característica de los mycolata es muy variada. Todos son Gram-positivos o Gram-variables, débilmente ácido-alcohol resistentes. Pueden formar hifas con ramificaciones de 90°, bacilos irregulares resultantes de la fragmentación del micelio o cocobacilos más o menos regulares. La morfología de los filamentos formados por los género *Nocardia* y *Gordonia* puede variar dependiendo de la edad del cultivo de manera que podemos encontrar complejas redes de filamentos en cultivos jóvenes o formas cocobacilares resultado de la fragmentación de las hifas en cultivos viejos. El género *Rhodococcus* se caracteriza por tener un ciclo de vida alternando formas cocáceas, formas bacilares y formas filamentosas que se fragmentas para originar nuevas formas cocáceas. A nivel macroscópico también presentan una morfología característica que puede ayudarnos a su diferenciación. Todos los aislados contienen ácidos micólicos.

5.1.1.- *Nocardia*

Los aislados N6, N7, N9-3, D27, D18, D39, contienen ácidos micólicos, son Gram-positivos y presentan una morfología ramificada con distintos niveles de complejidad, son resistentes a la lisozima, reducen los nitratos y son ureasa positivos. No utilizan el citrato ni crecen a 45 °C.

De la comparación de los perfiles bioquímicos obtenidos con los sistemas API's se han obtenido los siguientes porcentajes de similitud con

las cepas de *Nocardia* de referencia. El aislado N6 tiene entre un 72% y 88%; N7, D27 y D39 tienen entre un 76% y 84%; N9-3 tiene entre un 82% y un 92%; D18 tiene entre un 60% y 66%. Aunque ese último aislado tiene el porcentaje de similitud más bajo se ha caracterizado como *Nocardia* por PCR. El porcentaje de similitud de estos aislados con otras cepas de referencia no-*Nocardia* fue siempre inferior al 70%.

Cabe destacar que de los 6 aislados caracterizados como *Nocardia* 5 (N7, N9-3, D18, D27 y D39) han sido aislados en el medio de Münz con parafina. La cepa N6 fue aislada en el medio BCYE. En la bibliografía consultada este medio ha sido ampliamente utilizado para aislar cepas de *Nocardia* en suelo y en muestras clínicas, sin embargo no se ha utilizado en muestras de fango activo.

5.1.2.- *Gordonia*

En este caso las diferencias morfológicas son más acusadas que en el género *Nocardia*. La forma de las colonias puede variar de secas y rugosas formando circunvoluciones hasta brillantes y mucosas. Estas últimas se confunden morfológicamente con el género *Rhodococcus*. La diferenciación a nivel de género entre *Rhodococcus* y *Gordonia* por métodos fenotípicos requiere análisis quimiotaxonómicos como longitud de ácidos micólicos y tipo de menaquinonas.

Los 26 aislados caracterizados como *Gordonia* (ver tablas 30 y 31) contienen ácidos micólicos con un Rf similar al de las cepas de referencia, son Gram-positivos y su morfología puede variar de filamentos ramificados a

formas cocobacilares. Son sensibles a la lisozima, ureasa negativo, excepto la cepa D69 y utilizan el citrato, excepto la cepa D69.

Del porcentaje de similitud obtenido con los sistemas API's se obtienen los siguientes resultados: todos los aislados comparten entre un 74% y un 99% con las cepas de *Gordonia* de referencia aunque, en algún caso, se observo similitud más alta con cepas de *Rhodococcus*. En estos casos la diferenciación se realizó por PCR.

Un grupo de estos aislados fue caracterizado por el sistema MicroLog. El resultado de la caracterización se puede ver en la tabla 32.

Tabla 32: Identificación de algunas cepas de *Gordonia* con el sistema MicroLog

CEPAS	RESULTADO DE LA IDENTIFICACIÓN
D6, D5, N17-8	<i>Gordonia amarae</i>
D3, D98, D105, D78	<i>Gordonia terrae</i>
D69	<i>Gordonia aichiensis</i>

Las cepas D69, N17-8, D105 fueron identificadas con la máxima probabilidad por el sistema.

5.1.3.- *Rhodococcus*

Las 17 cepas caracterizadas como *Rhodococcus* presentaron una morfología más homogénea en comparación con el género *Gordonia*. Las colonias tienen una morfología que varía de brillante y mucosa hasta mate y seca. Contienen ácidos micólicos con un Rf similar al de las cepas de referencia. Ninguna cepa, excepto D95, produjo micelio de sustrato. El color varía de rosa pálido, naranja claro hasta rojo. La cepa D81 produce pigmento soluble oscuro. La morfología microscópica es igualmente homogénea. En la mayoría de las cepas se observan formas cocobacilares. En algunas se observaron cocobacilos en cadena como resultado de la fragmentación de hifas. Todas las cepas son sensibles a la lisozima, no utilizan el citrato, excepto D61 y no crecen a 45°C.

La comparación de los perfiles bioquímicos obtenidos con los sistemas API's ofrece los siguientes resultados: todas las cepas comparten entre un 74% y un 94% de similitud con las cepas de referencia de *Rhodococcus*. Igual que en el caso anterior algunas cepas caracterizadas como *Rhodococcus* tienen un porcentaje de similitud más alto con el género *Gordonia*. En estos casos la diferenciación se realizó por PCR. Cuatro de las cepas de *Rhodococcus* aislados se caracterizaron por el sistema MicroLog. El resultado se puede ver en la tabla 33.

Tabla 33: Identificación de algunas cepas de *Rhodococcus* con el sistema MicroLog

CEPAS	RESULTADO DE LA IDENTIFICACIÓN
N17-11, D29	<i>Rhodococcus pyridinovorans</i>
N18-4a	<i>Rhodococcus australis</i>
D61	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>

La cepa N18-4a fue identificada con la máxima probabilidad. La identificación que dio el MicroLog de las cepas N17-11 y D29 fue *Corynebacterium nitrophilus* con la máxima probabilidad. Esta cepa ha sido recientemente reclasificada como *R. pyridinovorans* (Yoon *et al.*, 2000) y se caracteriza por ser una bacteria que degrada la piridina.

5.1.4.- *Mycobacterium*

Los aislados N1, N2, N4, N5, N9-1, N16-9 y N17-4 son resistentes a la lisozima, utilizan el citrato, crecen en presencia del 5% de NaCl y no reducen los nitratos. Estas cepas presentaron una morfología similar a *N. brasiliensis* pero dieron negativo para la PCR específica de *Nocardia*. El porcentaje de similitud de estos aislados con *Mycobacterium komossense* obtenido con los sistemas API fue del 70% al 74%. Mediante observación microscópica se pudo apreciar el crecimiento en cuerda (factor "cord") característico de *Mycobacterium*. Estos aislados son fuertemente ácido-alcohol resistentes y contienen ácidos micólicos con un Rf alto (entre 0,5 y 0,7) con múltiples manchas (multi spot) típico de las micobacterias.

5.1.5.- *Corynebacterium*

Los aislados D9 y D19 fueron clasificadas presuntamente como pertenecientes al género *Corynebacterium* en base a sus características morfológicas. Estos aislados presentaron una morfología característica en forma de maza, Gram-positivos, catalasa positivos, sensibles a la lisozima y comparten entre un 72% y un 76% con la cepa de referencia *C. xerosis*. Estos aislados contienen ácidos micólicos con un Rf bajo (0,2) característico de las corinebacterias.

5.2.- Genotípicamente

5.2.1.- *Nocardia*

En los 6 aislados caracterizados fenotípicamente como *Nocardia* se amplificó un fragmento de 596 pb con los iniciadores NG1 y NG2 (Fig. 31), incluso en el aislado D18 que tiene un menor porcentaje de similitud obtenido con los sistemas API's.

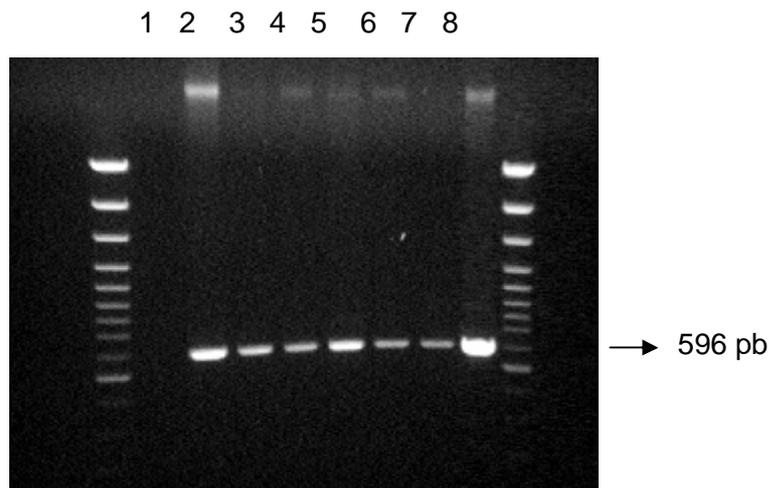


Figura 31: Gel de PCR 16S de los aislados pertenecientes al género *Nocardia*. 1: Blanco sin DNA; 2: N6; 3: N7; 4: N9-3; 5: D27; 6: D18; 7: D39; 8: *N. asteroides*

La detección de especies de *Nocardia* por PCR además de ser más fiable y reproducible tiene la ventaja de ser más rápida ya que el tiempo de incubación requerido para la prueba de la resistencia a la lisozima y para la tira API ID 32 es de una semana mientras que por PCR se puede dar un resultado fiable en 24-48 horas.

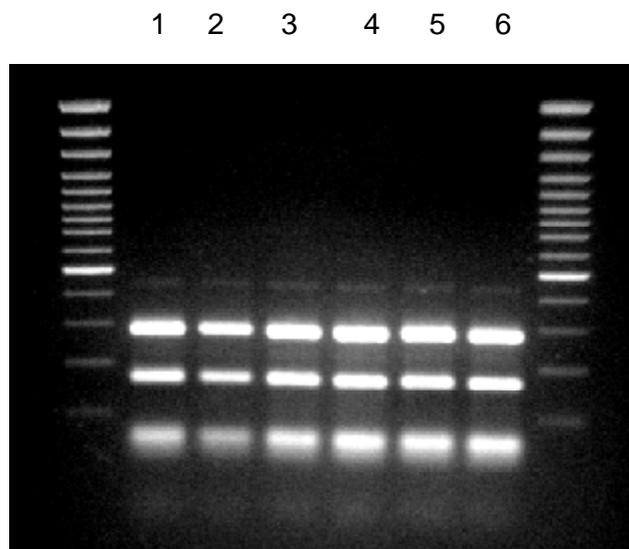


Figura 32: Productos obtenidos por el analisis de restricci3n del gen 16S con *Hpa* II de las cepas aisladas de *Nocardia*. 1: N6; 2: N7; 3: N9-3; 4:D27; 5: D18: 6:D39

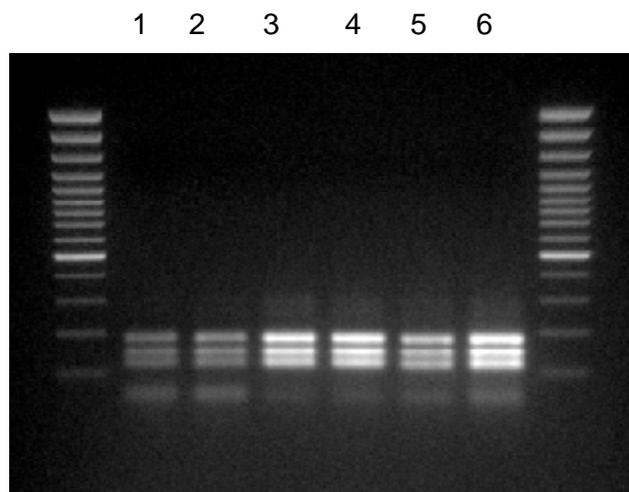


Figura 33: Productos obtenidos por el analisis de restricci3n del gen HSP con *Hpa* II de las cepas aisladas de *Nocardia*. 1: N6; 2: N7; 3: N9-3; 4:D27; 5: D18: 6:D39

Según los resultados de las digestiones anteriores (Fig. 32 y 33) las cepas de *Nocardia* aisladas no pertenecen al complejo *Nocardia asteroides* ya que no comparten el mismo perfil de restricción que el obtenido con las cepas de referencia. El fragmento amplificado del 16S de los aislados de *Nocardia* no fue cortado con la enzima *Hae* III.

De todos los aislados obtenidos, el 10% dio positivo para *Nocardia*, este resultado parece coherente con los trabajos publicados ya que es *Gordonia* la especie formadora de filamentos más frecuentemente aislada seguido de *Rhodococcus*. Han sido detectadas especies patógenas de *Nocardia* en fangos activados (Stratton *et al.*, 1996) por lo tanto la detección a nivel de género en muestras de fango es el primer paso para detectar la presencia de otras especies patógenas.

5.2.2.- *Gordonia*

Los aislados caracterizados fenotípicamente como *Gordonia* han sido identificados por PCR con los iniciadores diseñados en este trabajo. Estos iniciadores son de gran utilidad ya que muchas especies de *Gordonia* y *Rhodococcus* comparten muchas características tanto morfológicas como bioquímicas. Ambos géneros son sensibles a la lisozima y ciertas especies como *G. rubropertincta* tienen una morfología tanto macroscópica como microscópica muy similar. Hay que recordar que ciertos aislados caracterizados como *Gordonia* tenían un porcentaje de similitud obtenido por los sistemas API más alto con el género *Rhodococcus*. En estos casos la técnica de la PCR es imprescindible para diferenciarlos.

En la figura 34 se muestra algunos aislados caracterizados como *Gordonia* por PCR.

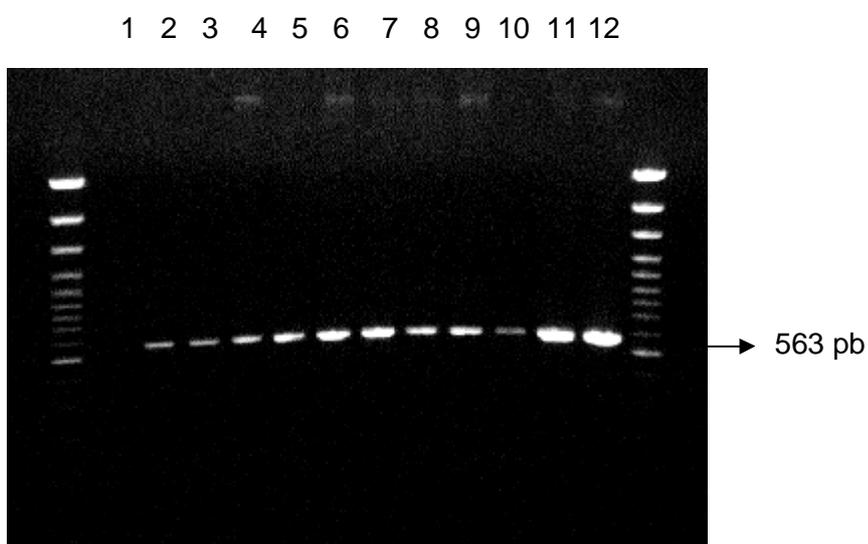


Figura 34 : Gel con los productos de amplificación del 16S de aislados de *Gordonia* 1: Blanco sin DNA, 2: N17-8; 3: D3; 4: D1; 5: D2; 6: D5; 7: D6; 8: D78; 9: D98; 10: N14-12; 11: D33; 12: *G.amarae*.

Los aislados caracterizados como *Gordonia* por el sistema MicroLog también dieron positivo por PCR. De esta manera se confirma que el 45% de los aislados pertenecen este género. Para detectar la especie *G. amarae* utilizamos la técnica FISH con la sonda específica *G. am-205*. (ver apartado 6.3). La sonda *Gor-596* no se utilizó para caracterizar los aislados ya que no dió señal con ninguna de las cepas de referencia.

5.2.3.- *Rhodococcus*

Las cepas de *Rhodococcus* aisladas en este trabajo y caracterizadas previamente a nivel fenotípico han sido identificadas por PCR con los iniciadores diseñados en este trabajo. Debido a la similitud de ciertas especies de *Rhodococcus* y *Gordonia* es de gran importancia disponer de

RESULTADOS

iniciadores específicos a nivel de género para poder diferenciar estas especies. En la figura 35 se observan aislados de *Rhodococcus* caracterizados por PCR.

Ninguno de los aislados caracterizados como *Rhodococcus* a nivel de género dio positivo con los iniciadores específicos para *R. equi* y *R. erythropolis* descritos por Bell *et al.* (1999).

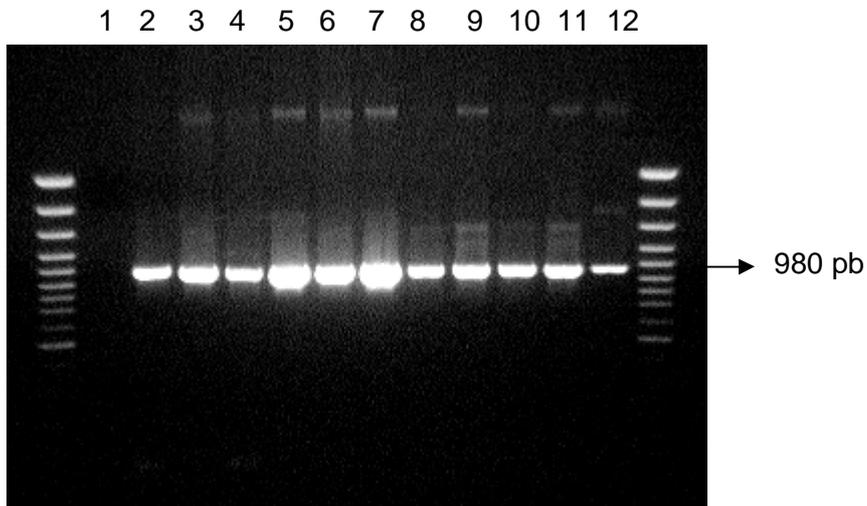


Figura 35: Gel con los productos de amplificación del 16S de aislados de *Rhodococcus*. 1: Blanco si DNA, 2: N 18-4 a, 3: N17-11, 4: D29, 5: D49, 6: D60, 7: 61, 8: D70, 9: D81, 10: D 95, 11: D101, 12: *R. rhodochrous*

6.- Detección de mycolata por FISH

Todas las muestras de fango recibidas en el laboratorio se fijaron el mismo día de su recepción, utilizando el procedimiento de los Reyes.

6.1.- Técnica de enriquecimiento de muestras ambientales

Una vez puesto a punto el método de permeabilización de mycolata, se procede a la detección de especies en muestras de fangos activados. El resultado obtenido con la técnica FISH es que en algunas muestras estudiadas si enriquecimiento no se detectó señal de hibridación o esta fue muy débil, lo que se corresponde con un bajo contenido en ribosomas en el momento del muestreo. Este resultado estaría asociado a situaciones de estrés en el reactor, con acumulación de inclusiones con polímeros de reserva tipo poli-P, como se ha observado en plantas de Vall d'Uxó y Castellón, utilizando la tinción DAPI después de efectuar la hibridación con la sonda EUB 338 (Fig. 36).

Hay que considerar que el concepto de “energía de mantenimiento” no está bien definido (Gerrero y Más-Castellá, 1990). En ausencia de crecimiento, la energía es utilizada para la regulación osmótica, para el mantenimiento intracelular del pH, para el movimiento, para el recambio de proteínas y los ácidos nucleicos. Cuando se dan condiciones de limitación del crecimiento por ausencia de nutrientes, los niveles de polifosfatos se incrementan notablemente. Después de realizar una incubación de las muestras durante 24 horas en caldo YEME en agitación se observaron células con la sonda 657. Se pudieron detectar filamentos activos de *Gordonia* en los reactores de Castellón y Gandía.

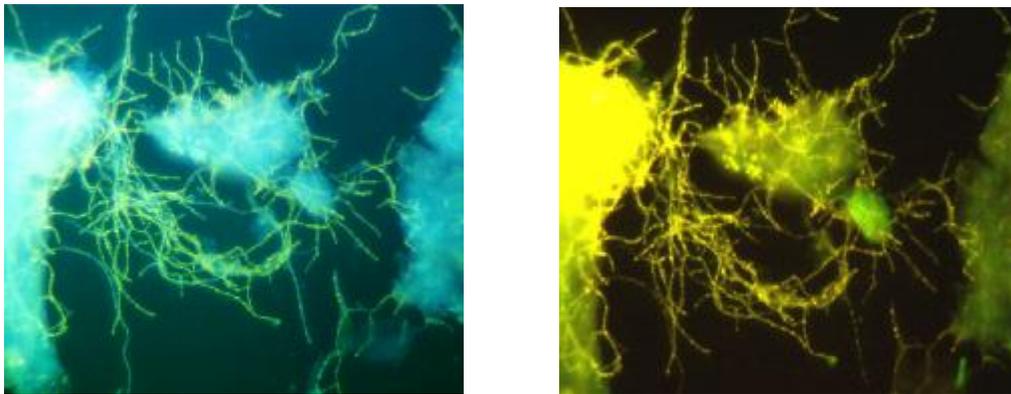
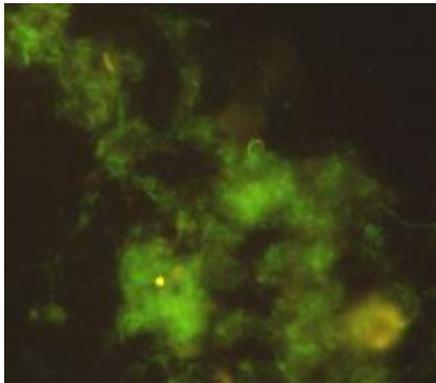


Figura 36: Bacteria nocardioforme teñida con DAPI (A) y con la sonda EUB 338 (B).

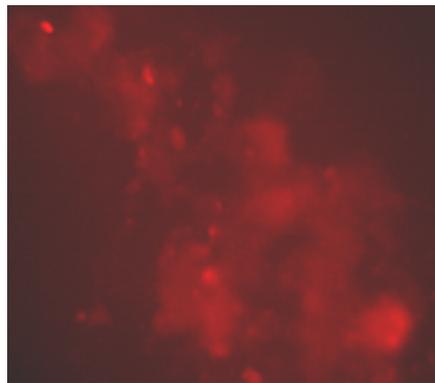
6.2.- Detección por FISH en muestras ambientales sin enriquecimiento

Las muestras fijadas con el protocolo de los Reyes, se hibridaron con las sondas EUB y *G. am* 205. En una serie de muestras de diferentes depuradoras se ha podido detectar la presencia de *G. amarae* sin necesidad de enriquecimiento de la muestra, lo que indica que las células en el momento del muestreo no estaban sometidas a estrés. La técnica FISH en estos casos es la más adecuada ya que con enriquecimiento o sin él, el nivel de detección es mayor.

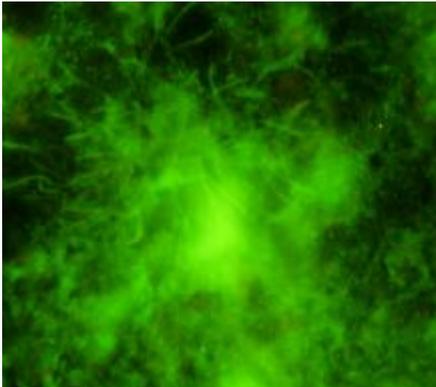
En la figura 38 se observan algunos ejemplos de muestras de fango procedentes de las depuradoras estudiadas en el presente trabajo hibridadas con la sonda EUB marcada con fluoresceína (verde) y con la sonda *G. am* 205 marcada con rodamina (rojo).



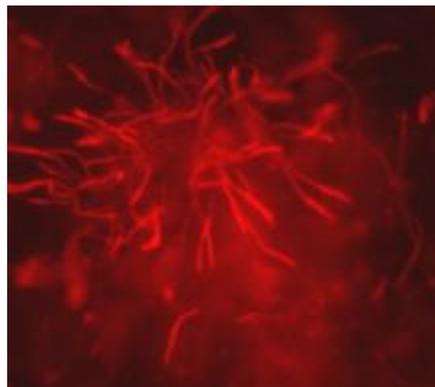
A



B

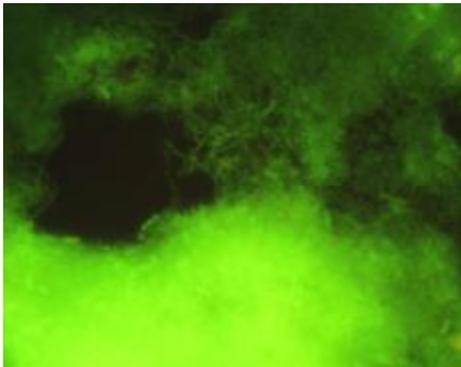


C

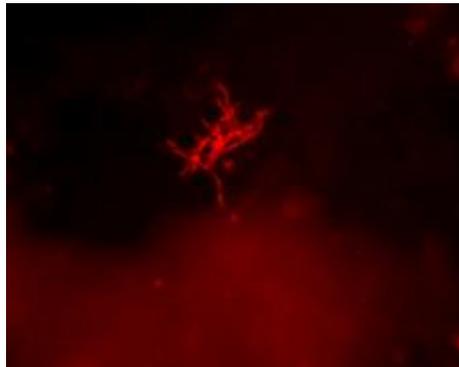


D

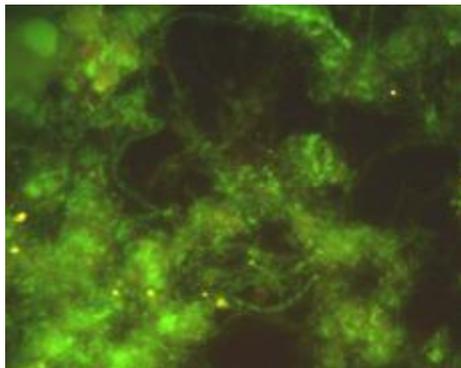
Figura 37: Hibridación de una muestra de fango activo sin enriquecimiento y con enriquecimiento. A: Sonda EUB-338 sin enriquecimiento; B: Sonda 657 sin enriquecimiento. C: Sonda EUB-338 con enriquecimiento 24 h. D: Sonda 657 con enriquecimiento 24 h.



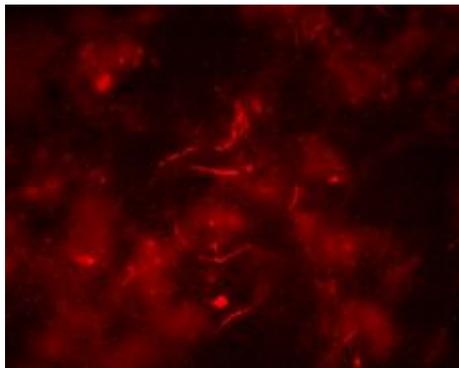
Castellon-EUB



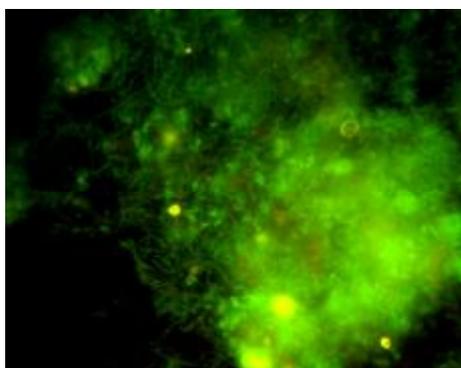
Castellón-G.am 205



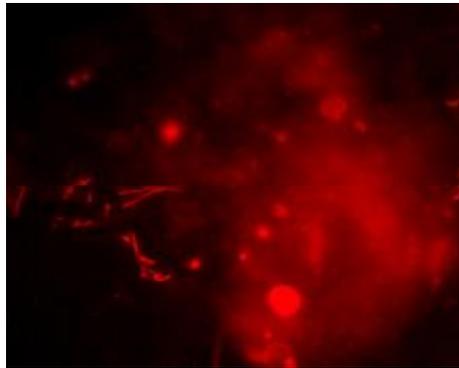
Gandia-EUB



Gandia-G.am 205



Quart-EUB



Quart-G.am 205

Figura 38: Hibridación de muestras de fango con EUB y *G. am* 205 sin enriquecimiento. Se indica el nombre de la planta depuradora estudiada.

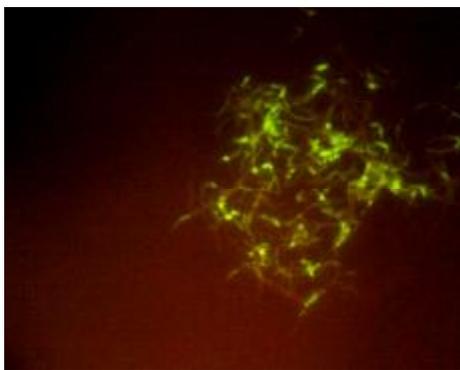
RESULTADOS

6.3.- Detección por FISH de aislados en cultivo puro

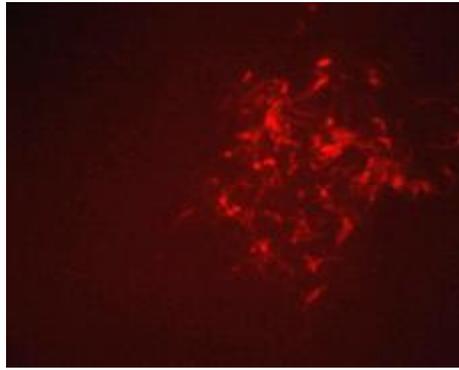
De los 26 aislados de *Gordonia*, 7 cepas (D5, D78, N12-2, N17-8, D6, D14, D22) dieron señal con la sonda específica para *G. am-205*, es decir el 27 % de los aislados pertenece a esta especie. Estos aislados también fueron identificados a nivel de género con los iniciadores G1 y G2 (apartado 5.2.2). Estas cepas presentan una morfología con las circunvoluciones características de esta especie. Hay que destacar que la cepa D78, caracterizada como *G. terrae* por MicroLog fue caracterizada como *G. amarae* por la técnica FISH utilizando la sonda *G. am-205* específica para esta especie.

El resto de aislados de *Gordonia* (73%) no han sido identificados como *G. amarae*, por tanto existen otras especies además de *G. amarae* que pueden estar relacionadas con la formación de espumas.

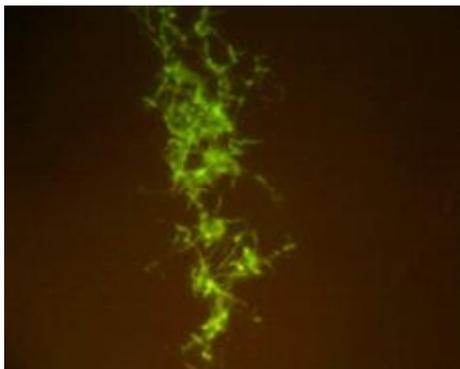
En la figura 39 se puede observar algunos aislados de *G. amarae* detectados con la sonda EUB marcada con fluoresceína (verde) y con la sonda *G. am 205* marcada con rodamina (rojo).



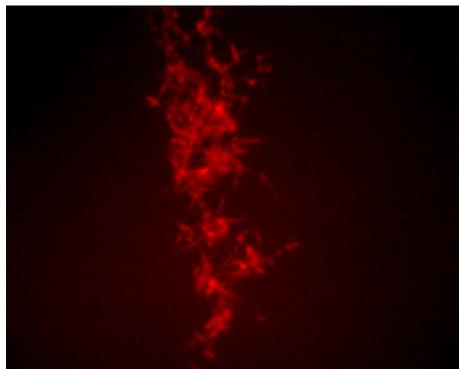
Aislado D5 sonda EUB



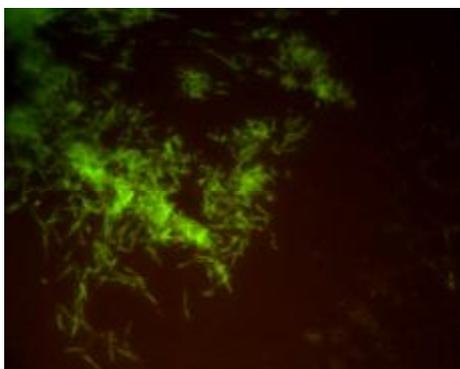
Aislado D5 sonda G. am 205



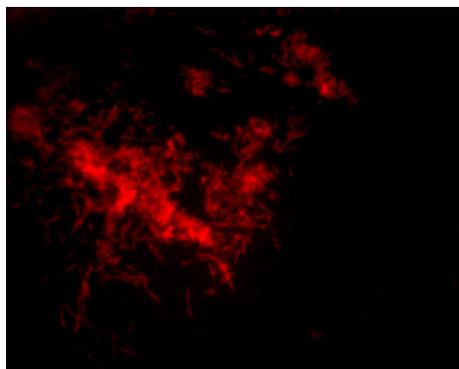
Aislado D78 sonda EUB



Aislado D78 sonda G. am 205

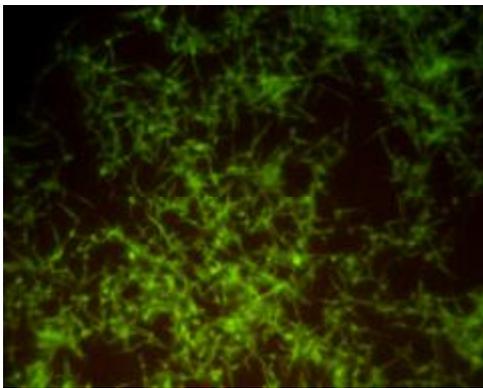


Aislado N17-8 sonda EUB

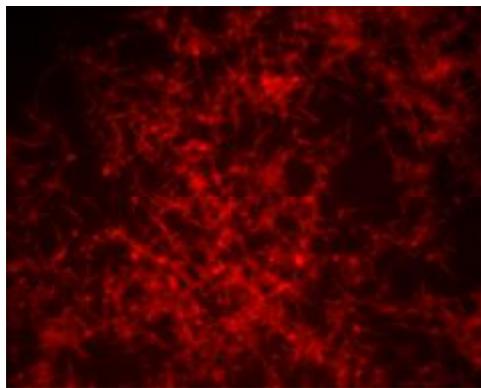


Aislado N17-8 sonda G.am 205

Figura 39: Hibridación de aislados de *G. amarae* con EUB y *G. am 205*



Aislado D6 sonda EUB



Aislado D6 sonda G. am 205

Figura 39 (Continuación): Hibridación de aislados de *G. amarae* con EUB y *G. am* 205

DISCUSIÓN

El aislamiento de actinomicetos nocardioformes que contienen ácidos micólicos de lento crecimiento a partir de muestras de fango activo con problemas de espumas presenta problemas debido a la microbiota de rápido crecimiento. Los métodos de descontaminación utilizados en este trabajo han sido usados, tradicionalmente, para facilitar el aislamiento de *Mycobacterium* y *Nocardia* en muestras clínicas (Murray *et al.*, 1980). Sin embargo no han sido utilizados para aislar nocardioformes en muestras de fango activo procedentes de depuradoras. Con estos métodos de descontaminación se ha conseguido aumentar el rendimiento de micolatas aislados en este tipo de muestras. Esto es debido a la cubierta lipídica que poseen que les confiere hidrofobicidad y resistencia a los desinfectantes (Sutcliffe, 1998). Aunque no se observaron diferencias entre los tratamientos utilizados, el rendimiento de aislados se duplicó, por término medio, en las muestras descontaminadas.

Los medios de cultivo seleccionados son válidos para aislar los tres géneros más importantes productores de espumas, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Nocardia*. El medio de Münz con parafina y otros medios con parafina como única fuente de carbono han sido usados para aislar *Nocardia* en suelo (Khan *et al.*, 1997) y en muestras clínicas (Goodfellow, 1992), sin embargo no han sido usados para aislar *Nocardia* en fangos. En la bibliografía consultada existen pocas referencias sobre *Nocardia* aislada en fangos por lo tanto con este tipo de medios de cultivo se podría aumentar el aislamiento de *Nocardia* en fangos.

Aunque el aislamiento de especies de *Rhodococcus* no ofrece tantos problemas, ya que es de rápido crecimiento, con el medio de Sauton con tiamina se favorece su aislamiento. De los medios de cultivo utilizados en este trabajo no existe ninguno específico para *Gordonia*, siendo igualmente aislada tanto en el medio de Czapeck modificado como en el medio de Sauton con tiamina.

Para caracterizar especies de micolata de lento crecimiento por métodos tradicionales se debe realizar un gran número de pruebas bioquímicas y fisiológicas además de análisis quimiotaxonómicos (Williams *et al.*, 1989). Los test de Gordon y Goodfellow para caracterizar especies de nocardioformes utilizan entre 40 y 150 caracteres fenotípicos respectivamente para diferenciar entre especies (Goodfellow *et al.*, 1989).

Como alternativa se han usado sistemas miniaturizados que permiten la realización de numerosas pruebas en poco tiempo. El sistema comercial API CORYNE para bacterias coryneformes incluye diversas especies de *Corynebacterium* y la especie *Rhodococcus equi*. Este sistema no incluye ninguna otra especie de *Rhodococcus* ni tampoco especies de *Nocardia* ni *Gordonia*. El sistema API ZYM, aunque ha sido usado por diversos autores (Boiron y Provost, 1990, Soddell y Seviour, 1994), no discrimina entre todas las cepas de referencia, siendo necesarias otras pruebas. El sistema API ID 32C está diseñado para levaduras, sin embargo ha sido utilizado para identificar actinomicetos de importancia clínica (Muir y Pritchard, 1997). Este sistema permite niveles de discriminación más altos debido a que incorpora un mayor número de pruebas. El protocolo empleado debe ser estandarizado para cepas ambientales y comprobar su reproducibilidad. Con este último sistema únicamente las cepas *R. equi* y *R. rhodochrous*

presentan un mismo perfil. Para diferenciar estas especies es útil la PCR específica de *R. equi*.

El sistema MicroLog es el más efectivo ya que permite realizar un elevado número de pruebas (95). La lectura se realiza con un lector óptico con lo cual siempre es una lectura objetiva y reproducible. El banco de datos del sistema Microlog es extenso aunque existen especies de mycolata que no están incluidas. Para que el sistema reconozca una especie nueva en su banco de datos se debe realizar la lectura de un número mínimo de cepas de la misma especie o en su defecto realizar varias lecturas de la misma cepa, de esta manera, el sistema recoge una variabilidad intraespecífica que utilizará para caracterizar cualquier aislado. El banco de datos de Microlog no contenía los datos de la especie *Gordonia amarae* por lo que fue introducido en el presente trabajo pero no se pudo introducir datos de más cepas de la misma especie. Esto explica que el aislado D78, identificado por FISH como *Gordonia amarae* con la sonda *G. am 205* haya sido identificado como *G. terrae* por el sistema Microlog.

La quimiotaxonomía ha sido muy utilizada para caracterizar actinomicetos. El primer paso en la caracterización taxonómica de actinomicetos es el estudio del quimiotipo de pared celular. Los nocardioformes poseen una pared celular tipo IV, aunque otros géneros de actinomicetos que no contienen ácidos micólicos también tienen este tipo de pared, por lo tanto la determinación del quimiotipo de pared no es suficiente. En este trabajo se ha realizado la detección de ácidos micólicos por cromatografía en capa fina (TLC) ya que los mycolata son las únicas bacterias que contienen estos compuestos. Con métodos analíticos más precisos como la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o

cromatografía de gases (GC) se pueden observar diferencias entre los ácidos micólicos como por ejemplo la longitud de la cadena de carbono. Se ha observado que estos datos, aunque tienen valor taxonómico, pueden variar según las condiciones de cultivo (Wick et al., 2002), por lo tanto en este trabajo se ha realizado la detección por TLC como un primer paso en la caracterización de mycolata.

Se han aislado especies de mycolata en el 87% de las muestras de fango estudiadas. Las muestras en donde no se aisló ninguna cepa se procesaron sin descontaminación por lo tanto, con tratamientos de descontaminación el porcentaje anterior podría haber sido del 100%. Todas las muestras procedían de reactores con problemas de espuma, por lo tanto se confirma la relación entre la presencia de mycolata y la formación de espumas.

La importancia del género *Gordonia* ha sido revisada recientemente (Arenskötter et al., 2004). En este trabajo se pone de manifiesto la gran diversidad metabólica y las posibles aplicaciones en biotecnología y biorremediación de este género. Desde el punto de vista clínico está empezando a ser estudiado ya que además de las especies consideradas como patógenas oportunistas, *G. bronchialis* y *G. sputi* (McNeil y Brown, 1994), otras especies ambientales como *G. terrae* han sido relacionadas con cuadros clínicos (Pham et al., 2003).

La importancia de este género en estaciones depuradoras con sistemas de fangos activos ha sido estudiada por numerosos autores (Goodfellow et al., 1996, Stainsby et al., 2002) aunque tradicionalmente se ha considerado *G. amarae* como la principal productora de espumas. En

este trabajo se han aislado 26 cepas de *Gordonia* (45% del total de los mycolata aislados) de las cuales el 27% pertenecen a la especie *G. amarae* identificadas por hibridación *in situ* con la sonda *G. am 205*. El hecho de que en muestras con problemas de espumas las únicas especies del género *Gordonia* que se han aislado sean distintas de *G. amarae*, sugiere que otras especies, filamentosas o no, pueden estar implicadas en la formación de espumas.

En la bibliografía consultada no se han descrito iniciadores de PCR específicos para este género. Los iniciadores G1 y G2 diseñados en este trabajo presentan un alineamiento al 100% con 18 de las 19 especies de *Gordonia* válidamente descritas por lo que son muy útiles para detectar la gran mayoría de especies de este género. La técnica de la PCR puesta a punto para *Gordonia* podría aplicarse como una PCR directa en muestras de reactores biológicos con problemas de espumas.

En la caracterización de cepas, los métodos moleculares basados en la PCR son más efectivos que los fenotípicos por su especificidad, sensibilidad y reproducibilidad. La sensibilidad de la PCR depende en gran medida de la especificidad de los iniciadores. Con esta técnica se ha conseguido caracterizar los tres géneros más importantes en fangos. En el caso del género *Nocardia* la digestión del fragmento amplificado del gen HSP es de gran utilidad taxonómica, ya que sólo con la enzima *Hpa* II se consigue diferenciar las tres especies del complejo *Nocardia asteroides*. La diferenciación de las especies de este complejo es importante ya que la mayoría de los casos clínicos de nocardiosis están causados por alguna de sus especies. De hecho, Stratton *et al.* (1996) ha demostrado que *N. farcinica* es la responsable de la formación de espumas. Aunque las

especies de *Nocardia* han sido aisladas con baja frecuencia en fangos, el empleo de medios con parafina puede hacer que esta frecuencia aumente y por lo tanto el peligro potencial de nocardiosis transmitidas por fangos no debe descartarse.

Por otro lado se le ha dado mucha importancia a las especies filamentosas como *G. amarae* y *Nocardia* ya que se creía que eran las principales productoras de espumas. Sin embargo, recientes estudios utilizando técnicas cuantitativas de FISH con la sonda 657 (Davenport *et al.*, 2002) indican que, de toda la población de mycolata detectada en espumas, las formas cocoides y bacilares pueden llegar a alcanzar el 79%. Por lo tanto, el papel del género *Rhodococcus* en la formación de espumas puede estar subestimado. Con los iniciadores diseñados en este trabajo para el género *Rhodococcus* se han detectado 17 cepas pertenecientes a este género, el 29% del total de los mycolata aislados. Este porcentaje, similar al de *G. amarae*, indica la importancia que puede tener este género en espumas.

Con los dos protocolos de permeabilización ensayados en este trabajo se obtiene la misma intensidad de señal siempre que la sonda tenga fácil acceso a la zona diana. Sin embargo, con el protocolo de Carr, debido al tratamiento ácido que se realiza, se produce una alteración de la morfología celular. La intensidad de la señal cuando se comparan las sondas EUB y 657 fue la misma, no observándose diferencias significativas, lo que indica que ambas sondas tienen un buen nivel de accesibilidad. Por el contrario con la sonda 736 la señal fue significativamente inferior debido a la difícil accesibilidad al sitio diana. Aunque las sondas 657 y 736 alinean con un gran número de especies del grupo mycolata, se conocen algunas

especies que no presentan alineamiento con con estas sondas (Davenport *et al.*, 2000, de los Reyes *et al.*, 1997), de hecho las especies *N. carnea* y *N. soli* no se detectaron con estas sondas.

Para obtener una señal adecuada es necesario que la célula tenga un número mínimo de ribosomas (Moter y Göbel, 2000) ya que en ocasiones aunque la accesibilidad de la sonda sea alta y el protocolo de permeabilización adecuado, la señal obtenida es mínima. Este resultado se asocia a situaciones de estrés en el reactor. Cuando se dan condiciones de limitación del crecimiento por ausencia de nutrientes los niveles de polifosfatos se incrementan notablemente mientras que el nivel de ribosomas es mínimo (Guerrero y Más-Castellá, 1990). Las técnicas de enriquecimiento de muestras de fango utilizadas en este trabajo son de gran utilidad, ya que, con un tiempo de enriquecimiento de 24 h se aumenta la señal considerablemente porque las células salen de la situación de estrés y aumentan su contenido en ribosomas. Si no se producen estas situaciones de estrés en el reactor no sera necesario el enriquecimiento.

En el presente estudio se ha puesto a punto una metodología adecuada para aislar mycolata formadores de espumas de lento crecimiento. Los aislados obtenidos han sido caracterizados por métodos fenotípicos utilizando sistemas miniaturizados rápidos. Como alternativa se han utilizado métodos moleculares basados en la PCR para detectar los tres géneros más importantes formadores de espumas. Se ha optimizado la permeabilización para la detección *in situ* de especies de mycolata y de la especie *G. amarae* por medio de la técnica FISH. Esta técnica tiene la ventaja de no depender de cultivo y ser específica.

CONCLUSIÓN

§ Los tratamientos de descontaminación para aislar nocardioformes, aplicados tradicionalmente en muestras clínicas, son válidos para aislar mycolata en muestras de fango activo. En el 100% de las muestra procesadas con descontaminación se han obtenido aislados de mycolata.

§ De los tres sistemas miniaturizados empleados en este trabajo, los más útiles en cuanto a poder discriminatorio son el API ID 32C y el MicroLog ya que realizan un número mayor de pruebas que el API ZYM.

§ Los iniciadores de *Gordonia* y *Rhodococcus* diseñados en este trabajo son válidos para detectar estos géneros. Además se pueden detectar las especies patógenas como *R. equi* con iniciadores específicos, aunque en ninguna de las muestras de fango ha sido detectada esta especie.

§ La digestión del fragmento amplificado del gen HSP de *Nocardia* con la enzima *Hpa* II permite diferenciar las tres especies del complejo *Nocardia asteroides*.

§ La mayoría de los aislados obtenidos pertenecen al género *Gordonia* en donde, además de la especie *G. amarae*, otras especies son las responsables de la formación de espumas.

§ Con los dos métodos de permeabilización ensayados se obtiene una señal que no ofrece diferencias significativas, sin embargo el método propuesto por Carr altera la morfología celular. Se considera mejor el método de los Reyes ya que mantiene la morfología celular.

§ Con la técnica de enriquecimiento se consigue aumentar la señal en las células que no están metabólicamente activas y por tanto su detección con la técnica FISH.

§ Aunque las especies de género *Rhodococcus* no forman filamentos complejos, parece que contribuyen a la formación de espumas.

§ La técnica de la PCR, además de ser más rápida, ofrece una alternativa más fiable, por su mayor especificidad, que los sistemas convencionales permitiendo identificar los tres géneros más importantes implicados en la formación de espumas por lo que resulta de gran utilidad para el operador de planta a la hora de modificar los parámetros operacionales, como por ejemplo el tiempo de retención hidráulico.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque de Barros, E. V. S., Manfio, G. P., Ribiero Maitan, V., Mendes Bataus, L. A., Bum Kim, S., Maldonado, L. A. and Goodfellow, M. 2003. *Nocardia cerradoensis* sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 29-33.
- Amann, R., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H.-D. and Schleifer, L.-H. 1991. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature*, 351: 161-164.
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Arenskötter, M., Baumeister, D., Berekaa, M. M., Pötter, G., Kroppenstedt, R. M., Linos, A. and Steinbüchel, A. 2001. Taxonomic characterization of two rubber degrading bacteria belonging to the species *Gordonia polyisoprenivorans* and analysis of hyper variable regions of 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 277-282.
- Arenskötter, M., Bröker, D. and Steinbüchel, A. 2004. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3195-3204.
- Baba, T., Nishiuchi, Y. and Yano, I. 1997. Composition of mycolic acid molecular species as a criterion in nocardia clasification. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 795-801.
- Bacciarini, L. N., Posthaus, H., Pagan, O. and Miserez, R. 1999. *Nocardia nova* causing pulmonary nocardiosis of black crakes (*Limnocorax flavirostra*). *Vet. Pathol.* 36: 345-347.
- Beimfohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1993. *In situ* identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. *System. Appl. Microbiol.* 16: 450-456.
- Bell, K. S., Philp, J. C., Christofi, N. and Aw, D. W. J. 1996. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 72-74.

- Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J. and Christofi, N. 1998. The genus *Rhodococcus*. J. Appl. Microbiol. 85: 195-210.
- Bell, K. S., Kuyukina, M. S., Heidbrink, S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., Ivshina, I. B. and Christofi, N. 1999. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR. J. Appl. Microbiol. 87: 472-480.
- Bendinger, B., Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M., Moormann, M. and Klatte, S. 1995. *Gordona hydrophobica* sp. nov., isolated from biofilters from waste gas treatment. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 544-548.
- Biehle, J. R., Cavalieri, S. J., Felland, T. and Zimmer, B. L. 1996. Novel method for rapid identification of *Nocardia* species by detection of preformed enzymes. J. Clin. Microbiol. 34: 103-107.
- Bitton, G. *Wastewater Microbiology*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, Inc., 1999.
- Blackall, L. L., Parlett, J. H., Hayward, A. C., Minikin, D. E., Greenfield, P. F. and Harbers, A. 1989. *Nocardia pinensis* sp. nov., an actinomycete found in activated sludge foams in Australia. J. Gen. Microbiol. 135: 1547-1558.
- Blackall, L. L. 1991. Use of Skerman micromanipulator for isolating Actinomycetes in the wastewater field. Actinomycetes, 2: 8-12.
- Blackall, L. L., Seviour, E. M., Cunningham, M. A., Seviour, R. J. and Hugenholtz, P. 1994. "*Microthrix parvicella*" is a novel, deep branching member of the actinomycetes subphylum. System. Appl. Microbiol. 17: 513-518.
- Blackall, L. L., Stratton, H., Bradford, D., Del Dot, T., Sjörup, C., Seviour, E. M. and Seviour, R. J. 1996. "*Candidatus Microthrix parvicella*", a filamentous bacterium from activated sludge sewage treatment plants. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 344-346.
- Boiron, P. and Provost, F. 1990. Enzymatic characterization of *Nocardia* spp. and related bacteria by API ZYM profile. Mycopathologia, 110: 51-56.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W. and Garrity, G. M. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed. York, PA: Springer-Verlag, 2001, vol. 1.

- Brigilia, M., Rainey, F. A., Stackebrandt, E., Schraa, G. and Salkinoja-Salonen, M. S. 1996. *Rhodococcus percolatus* sp. nov., a bacterium degrading 2,4,6-trichlorophenol. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 23-30.
- Brownell, G. H. and Belcher, K. E. 1990. DNA probes for the identification of *Nocardia asteroides*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2082-2086.
- Buswell, C. M., Herihy, Y. M., Lawrence, L. M., Mcguiggan, J. T. M., Marsh, P. D., Keevil, C. W. and Leach, S. A. 1998. Extended survival and persistence of *Campilobacter* sp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 733-741.
- Cardinali, S., Szulin, E. and Milani, F. 1995. TLC of mycolic acids for the identification of *Tsukamurella* and related organisms. *Actinomycetes*, vol. 6, part 3.
- Carr, E. L., Eales, K. L., Soddell, J., Seviour, R. J. "Improved permeabilisation protocols for fluorescence in situ hybridization (FISH) of mycolic-acid containing bacteria found in foams". En: *Proceedings of post-conference colloquium on Foam and Scum in Biological Wastewater Treatment. 5th September 2003, PICT, Prague, Czech Republic.*
- Carson, M. and Hellyar, A. 1994. Opacification of Middlebrook agar as an aid in distinguishing *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2270-2271.
- Castelli, L., Zlotnik, H., Ponti, R. and Vidotto, V. 1994. First reported *Nocardia otitidiscaviarum* infection in an AIDS patient in Italy. *Mycopathology*, 126: 131-136.
- Cheng, A. F. N., Yew, W. W., Chan, E. W. C., Chin, M. L., Hui, M. M. M. and Chan, R. C. Y. 2004. Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 596-601.
- Chicote Guerrero, E. 2004. "Análisis microbiológico de aguas radiactivas oligotróficas bioensuciamiento en piscinas nucleares". Tesis doctoral inédita. UPM, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Madrid.

- Chou, S., Chedore, P. and Kasatiya, S. 1998. Use of gas chromatographic fatty acid and mycolic acid cleavage product determination to differentiate among *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 36: 577-579.
- Chun, J. and Goodfellow, M. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 240-245.
- Chun, J., Kang, S. O., Hah, Y. C. and Goodfellow, M. 1996. Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes. J. Ind. Microbiol. 17: 205-213.
- Chun, J., Blackall, L., Kang, S., Chil Hah, Y., and Goodfellow, M. 1997. A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 127-131.
- Chun, J., Seong, C., Bae, K. S., Lee, K., Kang, S., Goodfellow, M. and Hah, Y. C. 1998. *Nocardia flavorosea* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 901-905.
- Collins, M. D., and Cummins, C. S. "Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896". En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds.: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. vol. 2, p. 1261-1276.
- Collins, M. D., Smida, J., Dorsch, M. and Stackebrandt, E. 1988. *Tsakamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 385-391.
- Colquhoun, J. A., Mexon, J., Goodfellow, M, Ward, A. C., Horikoshi, K. and Bull, A. T. 1998. Novel rhodococci and other mycolata actinomycetes from the deep sea. Antonie van Leeuwenhoek, 74: 27-40.
- Conville, P. S., Fischer, S. H., Cartwright, C. P. and Witebsky, F. G. 2000. Identification of *Nocardia* species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 38: 158-164.
- Conville, P. S., Brown, J. M., Steigerwalt, A. G., Lee, J. W., Byrer, D. E., Anderson, V. L., Dorman, S. E., Holland, S. M., Cahill, B., Carroll, K. C.

- and Witebsky, F. G. 2003. *Nocardia veterana* as a pathogen in North America patients. J. Clin. Microbiol. 41: 2560-2568.
- Cormican, M., Glennon, M., Riain, U. N. and Flynn, J. 1995. Multiplex PCR for identifying mycobacterial isolates. J. Clin. Pathol. 48: 203-205.
- Dailloux, M., Laurain, C., Weber, M. and Harteman, Ph. 1999. Water and nontuberculous mycobacteria. Wat. Res. 33: 2219-2228.
- Dailloux, M., Laurain, C., Weber, M. and Albert, M. 2000. Water as a source of non-tuberculous mycobacteria. Res. Adv. in Water. Res. 1: 115-123.
- Davenport, R. J., Elliott, J. N., Curtis, T. P. and Upton, J. 1998. *In situ* detection of rhodococci associated with activated sludge foams. Antonie van Leeuwenhoek, 74: 41-48.
- Davenport, R. J., Curtis, T. P., Goodfellow, M., Stainsby, F. M. and Bingley, M. 2000. Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1158-1166.
- Davenport, R. J. and Curtis, T. P. 2002. Are filamentous mycolata important in foaming? Wat. Sci. Tech. 46: 529-533.
- de los Reyes, F. L., Ritter, W. and Raskin, L. 1997. Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1107-1117.
- de los Reyes, M. F., de los Reyes III, F. L., Hernandez, M. and Raskin, L. 1998. Quantification of *Gordona amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobic digester systems with oligonucleotide hybridization probes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2503-2512.
- de los Reyes III, F. L., Raskin, L. 2002. Role of filamentous microorganisms in activated sludge foaming: relationship of mycolata levels to foaming initiation and stability. Wat. Res. 36: 445-459.
- de Miguel, T., Sieiro, C., Poza, M., Villa, T. G. 2000. Isolation and taxonomic study of a new canthaxanthin-containing bacterium, *Gordonia jacobea* MV-1 sp. nov. Internatl. Microbiol. 3: 107-111.

- DeLong, E. F., Taylor, L. T., Marsh, T. L. and Preston, C. M. 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic *archaea* and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5554-5563.
- Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. and Sayler, G. S. 2003. Power analysis for Real-Time PCR quantification of genes in activated sludge and analysis of the variability introduced by DNA extraction. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6597-6604.
- Duchene, Ph. 1994. Biological-foams: the cause-effect relationship, test results and combat strategy. *Water Sci. Technol.* 29: 239-247.
- Duckworth, A. W., Grant, S., Grant, W. D., Jones, B. E. and Meijer, D. 1998. *Dietzia natronolimnaios* sp. nov., a new member of the genus *Dietzia* isolated from an east African soda lake. *Extremophiles*, 2: 359-366.
- Eales, K. L., Nielsen, J. L., Kragelund, C., Seviour, R. J. and Nielsen, P. H. "The *in situ* physiology of PTLO in activated sludge foams". En: *Proceedings of post-conference colloquium on Foam and Scum in Biological Wastewater Treatment. 5th September 2003, PICT, Prague, Czech Republic.*
- Eikelboom, D. H. 1994. The *Microthrix parvicella* puzzle. *Wat. Sci. Tech.* 29: 271-279.
- Eikelboom, D. H., Andreadakis, A. and Andreasen, K. 1998. Survey of filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries. *Wat. Sci. Tech.* 37: 281-289.
- Eikelboom, D. H. and Geurkink, B. 2002. Filamentous micro-organisms observed in industrial activated sludge plants. *Wat. Sci. Tech.* 46: 535-542.
- Eisenblätter, M., Disko, U., Stoltenburg-Didinger, G., Scherübl, H., Schaal, K, P., Roth, A., Ignatius, R., Zeitz, M., Hahm, H. and Wagner, J. 2002. Isolation of *Nocardia paucivorans* from the cerebrospinal fluid of a patient with relapse of cerebral nocardiosis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3532-3534.

- Eke, M. A., Alderson, G. and Cross T. 1989. An actinomycete that changes wall composition during sporulation. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 1-4.
- Embley, T. M. and Stackebrandt, E. 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 257-289.
- Exmelin, L., Malbruny, B., Vergnaud, M., Provost, F., Boiron, P. and Morel C. 1996. Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1014-1016.
- Finnerty, W. R., 1992. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 193-218.
- Flores, M. and Desmond, E. 1993. Opacification of Middlebrook agar as an aid in identification of *Nocardia farcinica*. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3040-3041.
- Foot, R. J., Kocianova, E., Forster, C. F. and Wilson, A. J. 1993. An examination into the structure of stable foams formed on activated sludge plants. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 56: 21-25.
- Foot, R. J. and Robinson, M. S. "Activated sludge bulking and foaming: microbes and myths". En: *Handbok of Water and Wastewater Microbiology*. Eds.: Mara, D., Horan, N. Academic Press London, 2003. Chapter 32.
- Friedman, C. S., Beaman, B. L., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A. and Hedrick, R. P. 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the casual agent of nocardiosis in Pacific oysters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 237-246.
- Frölund, B., Griebe, T. and Nielsen, P. H., 1995. Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 755-761.
- Fuchs, B. M., Syutsubo, K., Ludwig, W. and Amann, R. 2001. *In situ* accessibility of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 961-968.
- Fujita, M., Iwahori, K. and Taki, H. 1994. A novel method of enumerating *Nocardia amarae* in foaming activated sludge. *J. Ferment. Bioeng.* 77: 674-678.

- Funke, G., Stubbs, S., Altwegg, M., Carlotti, A. and Collins, M. D. 1994. *Turicella ottidis* gen. nov., sp. nov., a coryneform bacterium isolated from patients with otitis media. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 270-273.
- Garrett, M. A., Holmes, H. T. and Nolte, F. S. 1992. Selective buffered charcoal-yeast extract medium for isolation of *Nocardiae* from mixed cultures. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1891-1892.
- Garrity, G. M., Johnson, K. L., Bell, J. and Searles, D. B. (eds.). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition. New York: Springer-Verlag, 2002. <http://www.springer-ny.com/bergesysoutline>.
- Garrity, G. M., Bell, J. and Lilburn, T. G. (eds.). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition. New York: Springer-Verlag, 2004. <http://bergeysoutline.com>
- Gaval, G., Duchène, P. and Pernelle, J. J. 2002. Filamentous bacterial population dominance in activated sludges subject to stresses. *Wat. Sci. Tech.* 46: 49-55.
- Godlik, E., Müller-Hurtig, R. and Wagner, F. 1990. Influence of the glycolipid-producing bacterium *Rhodococcus erythropolis* on the degradation of a hydrocarbon mixture by an original soil population. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 122-126.
- Goddard, A. J. and Forster, C. F. 1991. Microbial lipids and stable foam formation in the activated sludge process. *Microbios*, 66: 133-142.
- Godreuil, S., Didelot, M., Perez, C., Leflèche, A., Boiron, P., Reynes, J., Laurent, F., Jean-Pierre, H. and Marchandin, H. 2003. *Nocardia veterana* isolated from ascitic fluid of a patient with human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2768-2773.
- Goodfellow, M. and Minnikin, D. E. 1977. Nocardioform Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 31: 159-180.
- Goodfellow, M. and Lechevalier, M. P. Genus *Nocardia* Trevisan 1889. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds.: Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. vol. 4, p. 2350-2361.

- Goodfellow, M. 1991. Identification of some mycolic acid containing actinomycetes using fluorogenic probes based on 7-amino-4-methylcumarin and 4-methyl-umbelliferone. *Actinomycetes*, 2: 36-42.
- Goodfellow, M., Zakrzewska-Czerwinska, J., Thomas, E. G., Mordarski, M., Ward, A. C. and James, A. L. 1991. Polyphasic taxonomic study of the genera *Gordona* and *Tskamurella* including the description of *Tskamurella wratislaviensis* sp. nov. *Zbl. Bakteriol.* 275: 162-178.
- Goodfellow, M. "The family *Nocardiaceae*". En: *The Prokariotes*. 2nd edition. Eds.: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. New York: Springer-Verlag, 1992. Chapter 5.
- Goodfellow, M., Chun, J., Stubbs, S. and Tobill, A. S. 1994. Transfer of *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona amarae* comb. nov. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 401-405.
- Goodfellow, M., Davenport, R., Stainsby, F. M. and Curtis T. P. 1996. Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants. *J. Ind. Microbiol.* 17: 268-280.
- Goodfellow, M., Alderson, G. and Chun, J. 1998. Rhodococcal systematics: problems and developments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74: 3-20.
- Goodfellow, M., Stainsby, F. M., Davenport, R., Chun, J. and Curtis, T. 1998. Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity. *Wat. Sci. Tech.* 37: 511-519.
- Goodfellow, M., Chun, J., Stackebrandt, E. and Kroppenstedt, M. 2002. Transfer of *Tskamurella wratislaviensis* Goodfellow *et al.* 1995 to the genus *Rhodococcus* as *Rhodococcus wratislaviensis* comb. nov. 2002. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 52: 749-755.
- Grimm, D., Merkert, H., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Hacker, J. and Brand, B. C. 1998. Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2686-2690.
- Guerrero, R. y Mas-Castellá, J. "Acumulación de polímeros por bacterias. Aplicaciones biotecnológicas". En: *Microbiología 1990*. Eds.: Casadesús, J y Ruiz Berraquero, F. Sevilla: Secretariado de

- Publicaciones de la Universidad de Sevilla, 1990. Cap. XXII, p. 187-200.
- Hahn, D., Amann, R., Ludwig, W., Akkermans, D. L. and Schleifer, K. L. 1992. Detection of micro-organisms in soil after *in situ* hybridation with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. J. Gen. Microbiol. 138: 879-887.
- Hall, S. J., Hugenholtz, P., Siyambalapitiya, N., Keller, J. and Blackall, L. L. 2002. The development and use of real-time PCR for the quantification of nitrifiers in activated sludge. Wat. Sci. Tech. 46: 267-272.
- Hamid, M. E., Maldonado, L., Sharaf Eldin, G. S., Mohamed, M. F., Saeed, N. S. and Goodfellow, M. 2001. *Nocardia africana* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with pulmonary infections. J. Clin. Microbiol. 39: 625-630.
- Hartmans, S. and De Bont, J. A. M. "The genus *Mycobacterium*–Nonmedical". En: *The Prokaryotes*. 2nd edition. Eds.: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. New York: Springer-Verlag, 1992. Chapter 52.
- Hattori, Y., Kano, R., Kunitani, Y., Yanai, T. and Hasegawa, A. 2003. *Nocardia africana* isolated from a feline mycetoma. J. Clin. Microbiol. 41: 908-910.
- Hayakawa, M., Momose, Y., Yamazaki, and Nonomura, H. 1996. A method for the isolation of *Microtetraspora glauca* and related four-spored actinomycetes from soil. J. Applied Bacteriol. 80: 375-386.
- Head, I. M., Saunders, J. R. and Pickup, R. W. 1998. Microbial evolution, diversity, and Ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbiol. Ecol. 35: 1-21.
- Hecht, S. T. and Causey, W. A. 1976. Rapid method for the detection and identification of mycolic acids in aerobic actinomycetes and related bacteria. J. Clin. Microbiol. 4: 284-287.
- Hernandez, M., Jenkins, D. and Beaman, B. L. 1994. Mass and viability estimations of *Nocardia* in activated sludge and anaerobic digesters using conventional stains and immunofluorescent methods. Wat. Sci. Tech. 29: 249-259.

- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E. M. H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and Williams, S. T. "The Actinomycetes. Groups 22-29". En: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p. 605-703.
- Isik, K., Chun, J., Hah, Y. C. and Goodfellow, M. 1999. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 833-837.
- Isik, K., Chun, J., Hah, Y. C. and Goodfellow, M. 1999. *Nocardia uniformis* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1227-1230.
- Isik, K. and Goodfellow, M. 2002. Differentiation of *Nocardia* species by PCR-Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. *System. Appl. Microbiol.* 25: 60-67.
- Iwahori, K., Miyata, N., Morisada, S. Suzuki, N. 2000. Rapid detection of *Nocardia amarae* in activated sludge process using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Biosci. Bioeng.* 89: 469-473.
- Iwahori, K., Miyata, N., Takata, N., Morisada, S. and Mochizuki, T. 2001. Production of anti-*Gordonia amarae* mycolic acid polyclonal antibody for detection of mycolic acid-containing bacteria in activated sludge foam. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 417-422.
- Iwahori, K., Tokutomi, T., Miyata, N. and Fujita, M. 2001. Formation of stable foam by cells and culture supernatant of *Gordonia (Nocardia) amarae*. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 77-79.
- Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G. T. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2nd ed. Michigan: Lewis Publisher, Inc., 1993.
- Jenkins, D., Richard, M. G. and Daigger, G. T. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming and other solids separation problems*. 3rd ed. London: IWA Publishing, 2004.

- Jones, A. L., Brown, J. M., Mishra, V., Perry, J. D., Steigerwalt, A. G. and Goodfellow, M. 2004. *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 407-411.
- Kaewpipat, K. and Grady, C. P. L. Jr. 2002. Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors. *Wat. Sci. Tech.* 46: 19-27.
- Kageyama, A., Poonwan, N., Yazawa, K., Mikami, Y. and Nishimura, K. 2004. *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 125-130.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Kudo, T., Taniguchi, H., Nishimura, K. and Mikami, Y. 2004. First isolates of *Nocardia abscessus* from humans and soil in Japan. *Jpn. J. Med. Mycol.* 45: 17-21.
- Kageyama, A., Yazawa, K., Mukai, A., Kinoshita, M., Takata, N., Nishimura, K., Kroppenstedt, R. M. and Mikami, Y. "Nocardia shimofusensis sp. nov. isolated from soil and *Nocardia higoensis* sp. nov. isolated from a patient with lung nocardiosis in Japan" [en línea]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 13 April 2004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63061-0> [Consulta:18-05-2004].
- Kageyama, A., Yazawa, K., Nishimura, K. and Mikami, Y. 2004. *Nocardia inohanensis* sp. nov., *Nocardia yamanashiensis* sp. nov. and *Nocardia niigatensis* sp. nov., isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 563-569.
- Kämpfer, P., Dott, W. and Kroppenstedt, R. M. 1990. Numerical classification and identification of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 309-331.
- Kämpfer, P., Weltin, D., Hoffmeister, D. and Dott, W. 1995. Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Water. Res.* 29: 1585-1588.
- Kämpfer, P. 1997. Detection and cultivation of filamentous bacteria from activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 169-181.
- Kämpfer, P., Andersson, M. A. Rainey, F. A., Kroppenstedt, R. M. and Salkinoja-Salonen, M. 1999. *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov.,

- isolated from the indoor environment of a children's day care centre. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 681-687.
- Kämpfer, P., Buczolits, S., Jäckel, U., Grün-Wollny, I. and Busse, H.-J. 2004. *Nocardia tenerifensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 381-383.
- Kattar, M. M., Cookson, B. T., Carlson, L. C., Stiglich, S. K., Schwartz, M. A., Nguyen, T. T., Daza, R., Wallis, C. K., Yarfitz, S. L. and Coyle, M. B. 2001. *Tsukamurella strandjordae* sp. nov., a proposed new species causing sepsis. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1467-1476.
- Kerley, S. and Forster, C. F. 1995. Extracellular polymers in activated sludge and stable foams. *J. Chem. Tech. Biotech.* 62: 401-404.
- Kerr, E., Snell, H., Black, B. L., Storey, M. and Colby, W. D. 1992. Isolation of *Nocardia asteroides* from respiratory specimens by using selective buffered charcoal-yeast extract agar. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1320-1322.
- Khan, Z. U., Chugh, T. D., Chandy, R., Provost, F. and Boiron, P. 1999. A study of the enzymatic profile of soil isolates of *Nocardia asteroides*. *Mycopathologia*, 143: 151-154.
- Khan, Z. U., Neil, L. D., Chandy, R., Chung, T. D., Al-Sayer, H., Provost, F. and Boiron, P. 1997. *Nocardia asteroides* in soil of Kuwait. *Mycopathologia*, 137: 159-167.
- Kim, S. B., Brown, R., Oldfield, C., Gilbert, S. C. and Goodfellow, M. 1999. *Gordonia desulfuricans* sp. nov., a benzothiophene-desulphurizing actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1845-1851.
- Kim, S. Brown, R., Oldfield, C., Gilbert, S. C., Iliarionov, S. and Goodfellow, M. 2000. *Gordonia amicalis* sp. nov., a novel dibenzothiophene-desulphurizing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2031-2036.
- Kim, D. W., Cha, D. K., Wang, J., Huang, C. P. 2002. Heavy metal removal by activated sludge: influence of *Nocardia amarae*. *Chemosphere*, 46: 137-142.
- Kim, K. K., Lee, C. S., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. and Lee, S. T. 2003. *Gordonia sihwensis* sp. nov., a novel nitrate-reducing bacterium

- isolated from a wastewater-treatment bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1427-1433.
- Kiska, D. L., Hicks, K. and Pettit, D. J. 2002. Identification of medically relevant *Nocardia* species with an abbreviated battery of tests. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1346-1351.
- Klatte, S., Rainey, F. A. and Kroppenstedt, R. M. 1994. Transfer of *Rhodococcus aichiensis* Tsukamura 1982 and *Nocardia amarae* Lechevalier and Lechevalier 1974 to the genus *Gordona* as *Gordona aichiensis* comb. nov. and *Gordona amarae* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 769-773.
- Klatte, S., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Altendorf, K. and Rainey, F. A. 1996. *Gordona hirsuta* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 876-880.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, R. and Khorana, H. G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56: 341-361.
- Kocianova, E., Forster, C. F. and Foot, R. J. 1994. What is *Microthrix parvicella*? *J. Appl. Bacteriol.* 76: 301-306.
- Kummer, C., Schumann, P. and Stackebrandt, E. 1999. *Gordonia alkanivorans* sp. nov., isolated from tar-contaminated soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1513-1522.
- Ladrón, N., Fernandez, M., Agüero, J., González Zörn, B., Vázquez-Boland, J. and Navas, J. 2003. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene *J. Clin. Microbiol.* 41: 3241-3245.
- Laurent, F., Carlotti, A., Boiron, P., Villard, J. and Freney, J. 1996. Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1079-1082.
- Laurent, F., Provost, F., and Boiron, P. 2000. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2805 a – 2805 a. (Erratum) *J. Clin. Microbiol.* 37: 99-102 (1999).
- Laurent, F., Provost, F., Couble, A., Casoli, E. and Boiron, P. 2000. Genetic relatedness analysis of *Nocardia* strains by random amplification

- polymorphic DNA: validation and applications. *Res. Microbiol.* 151: 263-270.
- Le Dantec, C., Duguet, J. P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S. and Vincent, V. 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5318-5325.
- Lechevalier, H. A. Nocardioform actinomycetes. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds.: Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. vol. 4, p. 2348-2404.
- Lechevalier, H. A. and Lechevalier, M. P. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 435-443.
- Lechevalier, M. P., and Lechevalier, H. A. 1974. *Nocardia amarae* sp. nov., an actinomycete common in foam activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 278-288.
- Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. "The chemotaxonomy of actinomycetes". En: *Actinomycete Taxonomy*, special publication 6. Arlington, VA: Society for Industrial Microbiology, 1980, p. 227-291.
- Lemmer, H. and Baumann, M. 1988 a. Scum actinomycetes in sewage treatment plants – part 2: the effect of hydrophobic substrate. *Water Res.* 22: 761-763.
- Lemmer, H. and Baumann, M. 1988 b. Scum actinomycetes in sewage treatment plants – part 3: synergisms with other sludge bacteria. *Water Res.* 22: 765-767.
- Li, Y., Kawamura, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Liu, H., Huang, X., Kobayashi, K. and Ezaki, T. 2004. *Rothia aeria* sp. nov., *Rhodococcus baikonurensis* sp. nov. and *Arthrobacter russicus* sp. nov., isolated from air in the Russian space laboratory Mir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 827-835.
- Lin, C. K. and Tsen, H. Y. 1995. Development and evaluation of two novel oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequence for the identification of *Salmonella* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 507-520.

- Linos, A., Steinbuchel, A., Sproer, C. and Kroppenstedt, R. M. 1999. *Gordonia polyisoprenivorans* sp. nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1785-1791.
- Linos, A., Berekaa, M. M., Steinbüchel, A., Kim, K. K., Spröer, C. and Kroppenstedt, R. M. 2002. *Gordonia westfalica* sp. nov., a novel rubber-degrading actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1133-1139.
- Loeffelholz, M. J. and Scholl, D. R. 1989. Method for improved extraction of DNA from *Nocardia asteroides*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1880-1881.
- Louie, L., Louie, M. and Simor, A. E. 1997. Investigation of a pseudo-outbreak of *Nocardia asteroides* infection by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1582-1584.
- Loy, A., Daims, H. and Wagner, M. 2001. "Activated sludge: molecular techniques for determining community composition (updated title)". En: *1st Course on identification of microorganisms by fluorescent in situ hybridization (F.I.S.H.). (Perugia, 19-21 November 2001)*.
- Ludwig, W. and Schleifer, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 155-173.
- Luxmy, B. S. and Yamamoto, K. 2002. Identification and characterization of foam-causing microorganisms in wastewater treatment processes by molecular biological approach. *Res. Adv. Water Research*, 3: 7-13.
- Macnaughton, S. J., O'Donnell, A. G. and Embley, T. M. 1994. Permeabilization of mycolic-acid-containing actinomycetes for *in situ* hybridization with fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Microbiology*, 140: 2859-2865.
- Madoni, P., Davoli, D. and Gibin, G. 2000. Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Wat. Res.* 34: 1767-1772.
- Maldonado, L., Hookey, J. V., Ward, A. C. and Goodfellow, M. 2000. The *Nocardia salmonicida* clade, including descriptions of *Nocardia*

-
- cummidelens* sp. nov., *Nocardia fluminea* sp. nov. and *Nocardia soli* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 367-377.
- Maldonado, L. A., Stainsby, F. M., Ward, A. C. and Goodfellow, M. 2003. *Gordonia sinesedis* sp. nov., a novel isolate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83: 75-80.
- Marchesi, J. R. "Primer design for PCR amplification of environmental DNA targets". En: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 2001, chapter 4, p. 43-55.
- Matsuyama, H., Yumoto, I., Kudo, T. and Shida, O. 2003. *Rhodococcus tukisamuensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1333-1337.
- Mazierski, J. 1995. Effect of chromium (Cr^{VI}) on the growth rate of activated sludge bacteria. *Water. Res.* 29: 1479-1482.
- McMinn, E. J., Alderson, G., Dodson, H. I., Goodfellow, M., and Ward, A. C. 2000. Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* and related strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 331-340.
- McNeil, M. M. and Brown, J. M. 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 357-417.
- Minnikin, D. E., Hutchinson, I. G. and Caldicott, A. B. 1980. Thin-layer chromatography of methanolisates of mycolic acid-containing bacteria. *J. Chromatography*, 188: 221-233.
- Mohinder, S., Sandhu, R. S. and Randhawa, H. S. 1987. Comparison of paraffin baiting and conventional culture techniques for isolation of *Nocardia asteroides* from sputum. *J. Clin. Microbiol.* 25: 176-177.
- Morisada, S., Miyata, N. and Iwahori, K. 2002. Immunomagnetic separation of scum-forming bacteria using polyclonal antibody that recognizes mycolic acids. *J. Microbiol. Methods*, 51: 141-148.
- Moter, A., Göbel, U. B. 2000. Fluorescent in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 41: 85-112.

- Muir, D. B. and Pritchard, R. C. 1997. Use of BioMerieux ID 32C yeast identification system for identification of aerobic actinomycetes of medical importance. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3240-3243.
- Murray, P. R., Heeren, R. L. and Niles, A. C. 1987. Effect of decontamination procedures on recovery of *Nocardia* spp. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2010-2011.
- Murray, P. R., Niles, A. C. and Heeren, R. L. 1988. Modified Thayer-Martin medium for recovery of *Nocardia* species from contaminated specimens. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1219-1220.
- Nam, S-W., Chun, J., Kim, S., Kim, W., Zakrzewska-Czerwiska, J. and Goodfellow, M. 2003. *Tsakamurella spumae* sp. nov., A novel actinomycete associated with foaming in activated sludge plants. *System. Appl. Microbiol.* 26, 367-375.
- Nierzwicki-Bauer, S. A., Braun-Howland, E. B. and Vescio, P. A. "Molecular studies for phylogenetic analysis of subsurface microorganisms". En: Guerrero, R. and Pedrós-Alió, C., *Trends in Microbial Ecology*. Barcelona: Spanish Society for Microbiology, 1993, p. 379-382.
- Nishiuchi, Y., Baba, T., Hotta, H. H. and Yano, I. 1999. Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid composition of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica* and *N. nova*. *J. Microb. Methods*, 37: 111-122.
- Oerther, D. B., de los Reyes III, F. L., Hernández, M. and Raskin L. 1999. Simultaneous oligonucleotide probe hybridization and immunostaining for *in situ* detection of *Gordonia* species in activated sludge. 1999. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 129-136.
- Okouchi, T., Goi, M., Nishimura, T., Abe, S. and Murakami, T. 1996. *Nocardia* scum suppression technology by ozone addition. *Wat. Sci. Tech.* 34: 283-290.
- Pagilla, K. R., Jenkins, D. and Kido, W. H. 1996. *Nocardia* control in activated sludge by classifying selectors. *Water Environ. Res.* 68: 235-239.
- Pagilla, K. R., Sood, A. and Kim, H. 2002. *Gordonia (Nocardia) amarae* foaming due to biosurfactant production. *Wat. Sci. Tech.* 46: 519-524.

- Palla, F., Federico, C., Russo, R., Anello, L. 2002. Identification of *Nocardia restricta* in biodegraded sandstone monuments by PCR and nested-PCR DNA amplification. FEMS Microbiol. Ecology, 39: 85-89.
- Parekh, N. R., Walker, S. J., Roberts, S. J. and Welch, S. J. 1994. Rapid degradation of triazinone herbicide metamitron by a *Rhodococcus* sp. isolated from treated soil. J. Applied Bacteriol. 77: 467-475.
- Pascual, C., Lawson, P. A., Farrow, J. A. E., Navarro Gimenez, M. and Collins, M. D. 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 724-728.
- Pham, S. A., Dé, I., Rolston, K. V., Tarrand, J. J. and Han, X. Y. 2003. Catheter related bacteremia caused by the nocardioform actinomycete *Gordonia terrae*. Clinical Infectious Diseases, 36: 524-527.
- Pidoux, O., Argenson, J. N., Jacomo, V. and Drancourt, M. 2001. Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. J. Clin. Microbiol. 39: 2634-2636.
- Pintar Hubble, J., Cao, T., Kjelstrom, J. A., Koller, W. C. and Beaman, B. L. 1995. *Nocardia* species as an etiologic agent in Parkinson's disease: Serological testing in a case-control study. J. Clin. Microbiol. 33: 2768-2769.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A. and Owen, R. J. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol. 8: 151-156.
- Pitulle, C., Dorsch, M., Kazda, J., Wolters, J. and Stackebrandt, E. 1992. Phylogeny of rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 337-343.
- Pottumarthy, S., Limaye, A. P., Prentice, J. L., Houze, Y. B., Swanzy, S. R. and Cookson, B. T. 2003. *Nocardia veterana*, a new emerging pathogen. J. Clin. Microbiol. 41: 1705-1709.
- Prescott, J. F. 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 4: 20-34.

- Provost, F., Polonelli, L., Conti, S., Fiscaro, P., Gerloni, M. and Boiron, P. 1995. Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 33: 8-10.
- Provost, F., Laurent, F., Camacho Uzcategui, L. R. and Boiron, P. 1997. Molecular study of persistence of *Nocardia otitidiscaviarum* strains in patients with long-term nocardiosis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1157-1160.
- Rainey, F. A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R. M., Klatte, S. and Stackebrandt, E. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species. *Microbiology*, 141: 523-528.
- Rainey, F. A., Klatte, S., Kroppenstedt, R. M. and Stackebrandt, E. 1995. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov. formerly *Rhododoccus maris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 32-36.
- Riegel, P., Kamne-Fotso, M. V., de Briel, D., Prévost, G., Jehl, F., Piémont, Y. and Monteil, H. 1994. *Rhodococcus chubuensis* Tsukamura 1982 is a later subjective synonym of *Gordona sputi* (Tsukamura 1978) Stackebrandt 1989 comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 764-768.
- Robards, A. W. and Wilson A. J. (Eds) *Procedures in electron microscopy*. John Wiley & Sons Ltd. England, 1998.
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T. and Böttger, E. C. 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 323-330.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1994. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, 140: 2849-2858.
- Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 29-33.
- Roth, A., Andrees, S., Kroppenstedt, R. M., Harmsen, D. and Mauch, H. 2003. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rRNA gene sequences reveals underspeciation and division of strains

- classified as *Nocardia asteroides* into three established species and two unnamed taxa. J. Clin. Microbiol. 41: 851-856.
- Ruimy, R., Boiron, P., Boivin, V., Christen, R. 1994. A phylogeny of the genus *Nocardia* deduced from the analysis of small-subunit ribosomal DNA sequences, including transfer of *Nocardia amarae* to the genus *Gordona* as *Gordona amarae* comb. nov. FEMS Microbiol. Lett. 205: 277-282.
- Ruimy, R., Riegel, P., Boiron, P., Monteil, H. and Christen, R. 1995. Phylogeny of the genus *Corynebacterium* deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 740-746.
- Ruimy, R., Riegel, P., Carlotti, A., Boiron, P., Bernardin, G., Monteil, H., Wallace, R. J., Jr. and Christen, R. 1996. *Nocardia pseudobrasiliensis* sp. nov., a new species of *Nocardia* which groups bacterial strains previously identified as *Nocardia brasiliensis* and associated with invasive diseases. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 259-264.
- Saintpierre-Bonaccio, D., Maldonado, L. A., Amir, H., Pineau, R. and Goodfellow, M. 2004. *Nocardia neocaledoniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 599-603.
- Salinas-Carmona, M. C. 2000. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. Microbes and Infection, 2: 1373-1381.
- Saubolle, M. A. and Den Sussland. 2003. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. J. Clin. Microbiol. 41: 4497-4501.
- Schönhuber, W., Fucks, B., Juretschko, S. and Amann, R. 1997. Improved sensitivity of whole cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3268-3273.
- Schuppler, M., Mertens, F., Schön, G. and Göbel, U. B. 1995. Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. Microbiology, 141: 513-521.
- Schuppler, M., Wagner, M., Schön, G. and Göbel U. B. 1998. *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using

- fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiology*, 144: 249-259.
- Seong, C. N., Kim, Y. S., Baik, K. S., Lee, S. D., Hah, Y. C., Kim, S. B. and Goodfellow, M. 1999. Mycolic acid-containing actinomycetes associated with activated sludge foam. *J. Microbiol.* 37: 66-72.
- Seviour, E. M., Williams, C., DeGrey, B., Soddell, J. A., Seviour, R. J. and Lindrea, K. C. 1994. Studies on filamentous bacteria from Australian activated sludge plants. *Wat. Res.* 28: 2335-2342.
- Seviour, R. J. and Blackall, L. L.(Eds). *The microbiology of activated sludge*. London: Chapman & Hall, 1998.
- Shawar, R. M., Moore, D. G. and Larocco, M. T. 1990. Cultivation of *Nocardia* spp. on chemically media for selective recovery of isolates from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28: 508-512.
- Slijkhuis, H. 1983. *Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium isolated from activated sludge: cultivation in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 832-839.
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H. 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2884-2896.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986, vol.2.
- Soddell, J. A. and Seviour, R. J. 1990. A review: microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 145-176.
- Soddell, J. A. and Seviour, R. J. 1994. Incidence and morphological variability of *Nocardia pinensis* in Australian activated sludge plants. *Wat. Res.* 28: 2343-2351.
- Soddell, J. and Seviour, R. 1996. Growth of an activated sludge foam-forming bacterium, *Nocardia pinensis*, on hydrophobic substrates. *Wat. Sci. Tech.* 34: 113-118.

- Soddell, J. A. and Seviour, R. J. 1998. Numerical taxonomy of *Skermania piniformis* and related isolates from activated sludge. *J. Appl. Microbiol.* 84: 272-284.
- Sokolovská, I., Rozenberg, R., Riez, C., Rouxhet, P. G., Agathos, S. N. and Wattiau, P. 2003. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7019-7027.
- Stackebrandt, E. Smida, J. and Collins, M. D. 1988. Evidence of phylogenetic heterogeneity within the genus *Rhodococcus*: revival of the genus *Gordona* (Tsukamura). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34: 341-348.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Railey, N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-491.
- Stainsby, F. M., Soddell, J., Seviour, R., Upton, J. and Goodfellow, M. 2002. Dispelling the "*Nocardia amarae*" myth: a phylogenetic and phenotypic study of mycolic acid-containing actinomycetes isolated from activated sludge foam. *Wat. Sci. Tech.* 46: 81-90.
- Statch, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T. and Goodfellow, M. 2004. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 191-194.
- Steingrube, V. A., Brown, B. A., Gibson, J. L., Wilson, R. W., Brown, J., Blacklock, Z., Jost, K., Locke, S., Ulrich, R. F. and Wallace, R. J., Jr. 1995. DNA amplification and restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3096-3101.
- Steingrube, V. A., Wilson, R. W., Brown, B. A., Jost, K. C., Jr., Blacklock, Z., Gibson, J. L. and Wallace, R. J., Jr. 1997. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 817-822.

- Stratton, H. M., Seviour, R. J. and Soddell, J. A. 1993. Effect of culture conditions on cell surface hydrophobicity of nocardioforms. *Actinomycetes*, 4: 41-46.
- Stratton, H. M., Seviour, R. J., Soddell, J. A., Blackall, L. L. and Muir, D. 1996. The opportunistic pathogen *Nocardia farcinica* is a foam-producing bacterium in activated sludge plants. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 342-346.
- Stratton, H., Seviour, R. and Brooks, P. 1997. "Activated sludge foaming: what causes hydrophobicity and can it be manipulated to control foaming?" En: *Proceedings 2nd Int. Conf. on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes. Berkeley, California*, p. 293-300.
- Stratton, H. M. and Griffiths, P. G. "A case study of foaming in an anaerobic digester". En: *Proceedings of post-conference colloquium on Foam and Scum in Biological Wastewater Treatment. 5th September 2003, PICT, Prague, Czech Republic*.
- Sunairi, M., Iwabuchi, N., Yoshizawa, Y., Murooka, H., Morisaki, H. and Nakajima, M. 1997. Cell-surface hydrophobicity and scum formation of *Rhodococcus rhodochrous* strains with different colonial morphologies. *J. Appl. Microbiol.* 82: 204-210.
- Sutcliffe, I. C. 1998. Cell envelope composition and organization in the genus *Rhodococcus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74: 49-58.
- Takai, S., Ikeda, T., Sasaki, Y., Watanabe, Y., Ozawa, T., Tsubaki, S. and Sekizaki, T. 1995. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17-Kilodalton antigens. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1624-1627.
- Takeuchi, M. and Hatano, K. 1998. *Gordonia rhizosphera* sp. nov. isolated from the mangrove rhizosphere. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 907-912.
- Tandoy, V., Blackall, L. L. and Caravaglio, N. 1992. Isolation by micromanipulation of actinomycetes in scum producing activated sludge. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 42: 217-225.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Böttger, E. C. and Bodmer, T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by

- polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 175-178.
- Theilleux, J. "Capítulo 6: Los Actinomicetos". En: Leveau, J. Y. and Bouix, M. *Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial*. Zaragoza, España: Ed. Acribia, 2000, p. 417-478.
- Thomas, J. A., Soddell, J. A. and Kurtböke, D. I. 2002 Fighting foam with phages? Wat. Sci.Tech. 46: 511-518.
- Torres, R. del C., Oletta, C. A. and Zlotnik, H. 1996. A rapid and gentle method for isolation of genomic DNA from pathogenic *Nocardia* spp. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3: 601-604.
- Torvinen, E., Suomalainen, S., Lehtola, M. J., Mirttinen, I. T., Zacheus, O., Paulin, L., Katila, M. L. and Martikainen, P. J. 2004. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1973-1981.
- Trebesius, K., Harmsen, D. and Rakin, A. 1998. Development of a rRNA targeted PCR and *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. J. Clin. Microbiol. 36: 2557-2564.
- Tsukamura, M. 1982. Numerical analysis of the taxonomy of *Nocardiae* and *Rhodococci*. Microbiol. Immunol. 26: 1101-1119.
- Uotila, J. S., Kitunen, V. H., Apajalahti, J. H. A. and Salkinoja-Salonen, M. S. 1992. Environment-dependent mechanisms of dehalogenation by *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 408-412.
- Vickers, R. M., Rihs, J. D. and Yu, V. L. 1992. Clinical demonstration of isolation of *Nocardia asteroides* on buffered charcoal-yeast extract media. J. Clin. Microbiol. 30: 227-228.
- Wagner, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.-H., Bubert, A., Goebel, W. and Schleifer, K.-H. 1998. *In situ* detection of virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 160: 159-168.

- Wagner, A. M. and Cloete, E. T. 2002 16S rRNA sequence analysis of bacteria present in foaming activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* 25: 434-439.
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N. and Daims, H. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 665-680.
- Wagner, M., Horn, M. and Daims, H. 2003. Fluorescence *in situ* hybridization for the identification of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 302-309.
- Wallace, R. J., Jr., Steele, L. C., Sumter, G. and Smith, J. M. 1988. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1776-1779.
- Wallace, R. J., Tsukamura, M., Brown, B. A., Brown, J., Steingrube, V. A., Zhang, Y. and Nash, D. R. 1990. Cefotaxime-resistant *Nocardia asteroides* strains are isolates of the controversial species *Nocardia farcinica*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2726-2732.
- Wallace, R. J., Jr., Brown, B. A., Tsukamura, M., Brown, J. and Onyi, G. O. 1991. Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2407-2411.
- Wallace, R. J., Jr., Brown, B. A., Blacklock, Z., Ulrich, R., Jost, K., Brown, J. M., McNeil, M. M., Onyi, G., Steingrube, V. A. and Gibson, J. 1995. New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1528-1533.
- Wang, L., Zhang, Y., Lu, Z., Shi, Y., Liu, Z., Maldonado, L. and Goodfellow, M. 2001. *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1783-1788.
- Wang, L., Zhang, Y., Huang, Y., Maldonado, L.A., Liu, Z. and Goodfellow, M. "Nocardia pigrifrangens sp. nov., a novel actinomycete isolated from a contaminated plate" [en línea]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 13 April 2004. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.03035-0> [Consulta:18-5-2004].
- Wayne, L. G. and Kubica, G. P. "Family Mycobacteriaceae Chester 1897, 63^{AL}". En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds.: Sneath,

-
- P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. vol. 2, 1436-1457.
- Wick, L. Y., Wattiau and P. Harms, H. 2002. Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. *Environ. Microbiol.* 4: 612-616.
- Williams, S. T., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989, vol. 4.
- Wilson, R. W., Steingrube, V. A., Brown, B. A., Blacklock, Z., Jost, K. C., McNabb, A., Colby, W. D., Biehle, J. R., Gibson, J. L. and Wallace, R. J., Jr. 1997. Recognition of a *Nocardia transvalensis* complex resistance to aminoglycosides, including amikacin, and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2235-2242.
- Wilson, R. W., Steingrube, V. A., Brown, B. A., Wallace, R. J., Jr. 1998. Clinical application of PCR-Restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 148-152.
- Xue, Y., Sun, X., Zhou, P., Liu, R., Liang, F. and Ma, Y. 2003. *Gordonia paraffinivorans* sp. nov., a hydrocarbon-degrading actinomycete isolated from an oil-producing well. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1643-1646.
- Yamamura, H., Hayakawa, M. and Limura, Y. 2003. Application of sucrose-gradient centrifugation for selective isolation of *Nocardia* spp. from soil. *J. Applied Microbiol.* 95: 677-685.
- Yamamura, H., Hayakawa, M., Nakagawa, Y. and Limura, Y. 2004. Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitats on the basis of repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3149-3151.
- Yano, I., Imaeda, T. and Tsukamura, M. 1990. Characterization of *Nocardia nova*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 170-174.
- Yassin, A. F., Rainey, F. A., Brzezinka, H., Burghardt, J., Lee, H. J. and Schaal, K. P. 1995. *Tsukamurella inchonensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 522-527.

- Yassin, A. F., Rainey, F. A., Brzezinka, H., Burghardt, J., Rifai, M. Seifert, P., Feldmann, K. and Schaal, K. P. 1996. *Tsukamurella pulmonis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 429-436.
- Yassin, A. F., Rainey, F. A., Burghardt, J., Brzezinka, H., Schmitt, S., Seifert, P., Zimmermann, O., Mauch, H., Gierth, D., Lux, I. and Schaal, K. P. 1997. *Tsukamurella tyrosinosolvans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 607-614.
- Yoon, J.-H., Kang, S.-S., Cho, Y.-G., Lee, S. T., Kho, Y. H., Kim, C.-J. and Park, Y.-H. 2000. *Rhodococcus pyrinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 2173-2180.
- Yumoto, I., Nakamura, A., Iwata, H., Kojima, K., Kusumoto, K., Nodasaka, Y. and Matsuyama, H. 2002. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 85-90.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. and Keller, M. 2002. Cultivating the uncultured. PNAS 99: 15681-15686
- Zhang, J., Zhang, Y., Xiao, C., Liu, Z. and Goodfellow, M. 2002. *Rhodococcus maanhanensis* sp. nov., a novel actinomycete from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 2121-2126.
- Zhang, J., Liu, Z. and Goodfellow, M. 2003. *Nocardia caishijensis* sp. nov., a novel soil actinomycete. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 999-1004.

ANEJO I

MEDIOS DE CULTIVO

Composición de los medios de cultivo referida a un litro de agua destilada.

YEME

Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Dextrosa	4 g
Agar	18 g
pH	7.2

TGY Medium (CECT 180)

Triptona (Difco 0123)	5 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	18 g
pH	7,0

GYEA

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
Agar	18 g
pH	7.0

Agar de CZAPEK modificado

NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
Sacarosa	30 g
Extracto de levadura	2 g
Agar	18 g
pH	7.2

TYEA

Glucosa	5 g
Triptona	3 g
Extracto de levadura	5 g
Agar	18 g
pH	7.0

Agar de BENNETT

Extracto de carne	1 g
Glucosa	10 g
Triptona	2 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	18 g
pH	7.3

Agar de SAUTON modificado

Asparagina	5 g
KH_2PO_4	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Casaaminoácidos	2 g
K_2SO_4	0.5 g
Glucosa	15 g
Citrato férrico amónico	0.01 g
Citrato sódico	1.5 g
Agar	18 g
pH	7.2

Actinomycete Isolation Agar (Difco)

Caseinato sódico	2 g
Asparagina	0.1 g
Propionato sódico	4 g
K_2HPO_4	0.5 g
MgSO_4	0.1 g
FeSO_4	0.001 g
Agar	15 g
Glicerol	5 g
pH	8.0

Caldo glicerinado 20%

Polvo "Lab-Lemco"	10 g
Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Glicerol	2 g

Medio MÜNZ PARAFINA Agar

KH ₂ PO ₄ (Merck)	0.14 g
KNO ₃ (Panreac)	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Merck)	0.1 g
NaCl (Panreac)	1 g
Na ₂ HPO ₄ (Panreac)	0.05 g
Parafina (J. T. Baker)	10 ml
Agar	15 g

Al verter en placa procuramos que las burbujas de parafina se distribuyan de forma homogénea, para lo cual agitamos el matraz antes de llenar cada una de las placas.

Medio *Legionella* BCYE**AGAR BASE *Legionella***

Carbón activado	2 g
Extracto de levadura	10 g
Agar	13 g

Suplemento BYCE (Para 500ml de medio base)

Tampón ACES/ hidróxido potásico	1 g
Pirofosfato férrico	0,025 g
L-cisteína HCl	0,04 g
α-cetoglutarato	0,1 g

ANEJO II**1. Soluciones, reactivos y material de identificación para PCR**

Solución CTAB / NaCl

CTAB 10% en NaCl 0.7M

Tampón TE

Tris-CHI 10mM, EDTA 1mM

Solución RNAsa

RNAsa A (Boehringer)	5 mg
NaCl 1M	15 ml
Tris 1M (pH 8.3)	6 ml
EDTA 0.5M	1.5 ml
Agua MilliQ	77 ml

Calentar a 100°C durante 5 min para inactivar las DNAsas y enfriar.
Conservar a -20°C.

Tampón TAE 10X

Tris base	48,4 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7,44 g
Ácido acético glacial	11,42 ml
Agua MiliQ	1000 ml
pH	8,5

Gel de Agarosa

Agarosa D-1 Media EEO (Pronadisa)
Agarosa D-1 Alta EEO (Pronadisa)
Solución de bromuro de etidio 10 mg/ml (IBERLABO)

Pesar la agarosa (1-2%) y transferir a un matraz, añadir el tampón TAE 1X, calentar hasta que rompa a hervir, agitar y atemperar hasta 50°C. Añadir 3µl de bromuro de etidio por cada 50 ml de agarosa y verter en el molde.

Marcadores de pesos moleculares

Lambda DNA/HindIII (IBERLABO)	
Low Range III	10µl
Tampón de carga	20µl
Agua MilliQ estéril	90µl
100pb DNA Ladder (IBERLABO)	
Marcador L-101	50µl
Tampón TE	750µl
Tampón de carga	200µl

2. Soluciones y reactivos para la detección por FISH**PBS 3X**

NaCl	22.8 g
NaH ₂ PO ₄	3 g
Na ₂ HPO ₄	2.88 g
Agua destilada	1l
pH	7.5

Disolver los fosfatos y el cloruro sódico por separado. Autoclavar a 115°C, 20min.

Paraformaldehido (Panreac)

- Calentar 30 ml de agua destilada a 60°C.
- Añadir 2 g de PFA al agua precalentada y agitar. Se adicionan unas gotas de NaOH 5M para disolver el polvo.
- Completar hasta 50 ml con PBS 3X. Ajustar el pH hasta 7.5. Eliminar los posibles cristales mediante filtración.
- Guardar a 4°C durante un máximo de 48 h, o a -20°C varias semanas.

Solución de gelatina

Gelatina bacteriológica (Cultimed 170-180)	0.1%
CrK(SO ₄) ₂ (Sigma C-5925)	0.01%

Calentar previamente 40 ml de agua destilada en agitación, añadir 50 mg de gelatina y 5 mg de sal de cromato. Una vez disuelta dejar atemperar a 45°C.

Portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld 9782100)

- Lavar los portaobjetos con desengrasante, enjuagar con agua destilada y secar al aire.
- Sumergir los portaobjetos en gelatina al 0.1% y dejar escurrir.
- Secar al aire.

Solución de hibridación

Reactivo	% de Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
NaCl 5M	360µl	360µl	360µl	360µl	360µl	360µl	360µl
HCl-Tris 1M	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl
Formamida	200µl	400µl	500µl	600µl	700µl	800µl	900µl
H ₂ O MiliQ	1398µl	1198µl	1098µl	998µl	898µl	798µl	698µl
SDS 10%	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl	2µl
Volumen final	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl	2000µl

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

Solución de lavado

Reactivo	% de Formamida						
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
NaCl 5M	4500µl	2150µl	1490µl	1020µl	700µl	460µl	300µl
EDTA 0,5M*	-	500µl	500µl	500µl	500µl	500µl	500µl
HCl-Tris 1M	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl	1000µl
H ₂ O MiliQ	44,45ml	46,3ml	47,94ml	47,43ml	47,75ml	47,06ml	48,15ml
SDS 10%	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
Volumen final	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50ml

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

DAPI

DAPI (SIGMA 1200)

0.1 μ g

Agua destilada

1 ml

Disolver y guardar en oscuridad a -4°C .

ANEJO III

Abreviaturas empleadas

Mycolata	Actinomicetos nocardioformes que contienen ácidos micólicos
“Foam”	Espumas biológicas producidas por mycolata en fangos activos
“foaming”	Producción de espumas biológicas por mycolata
“bulking”	Aumento de volumen de los sólidos en suspensión producido por bacterias filamentosas
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FA	Formamida
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (<i>Fluorescent in situ hybridization</i>)
pb	Pares de bases
Kb	Kilobases (1000 pb)
M	Molar
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA	Paraformaldehido
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Tris-acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
ufc	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
μl	Microlitro
μM	Micromolar

ANEJO IV

REACTIVOS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

1.-Tampón fosfato 0,1 M pH 7,2

Solución A: Na ₂ HPO ₄ anhidro (Sigma)	28,4 g/l
Solución B: NaH ₂ PO ₄ anhidro (Sigma)	24,0 g/l

Para preparar 100 ml de tampón 0,1 M pH 7,2 mezclar en las siguientes proporciones:

Solución A: 36,0 ml
Solución B: 14,0 ml
Enrasar hasta 100 ml con H₂O MiliQ

2.- Tetróxido de osmio al 2% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2

3.- Glutaraldehido al 6% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2

ANEJO V

1. DIRECCIONES DE INTERÉS EN INTERNET

1.1 Centros de Biología Molecular

Portal	Dirección
1. National Center for Biotechnology Information (USA)	www.ncbi.nlm.nih.gov/
2. European Molecular Biology Laboratory (Europe)	www.embl.org/

1.2 Bancos de secuencias de nucleótidos

Portal	Dirección
1. GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/
2. EMBL (European Molecular Biology Laboratory)	www.embl-heidelberg.de/

1.3. Herramientas de análisis

Portal	Dirección
1. BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
2. WEB CUTTER	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/

1.4. Buscadores de publicaciones periódicas

Portal	Dirección
1. Journal of Nutrition	www.nutrition.org/
2. Buscador investigación genómica	www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
3. BioMedNet Journal Collection	http://journals.bmn.com/journals
4. Journal search	www.blackwell-science.com/
5. Biblioteca UPV	www.upv.es/revistas/

ESQUEMAS DE LAS PLANTAS DEPURADORAS ESTUDIADAS

 Sanejament d'aigües

CASTELLÓ DE LA PLANA

Comarca :
La Plana Alta



Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistema convencional. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, decantación primaria, cuba de aireación, decantador secundario, filtración y desinfección mediante ultravioletas.

Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	39.299	Rendiments (%):	SS:	82
Población (he):	171.516		DBO ₅ :	82
			DQO:	79

Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso

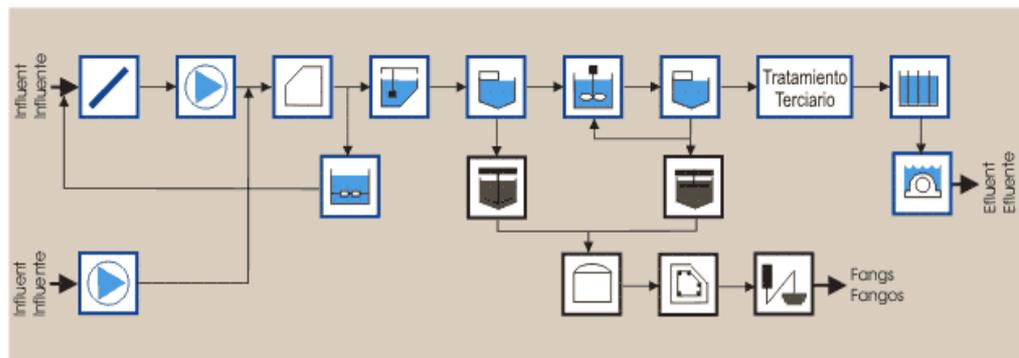
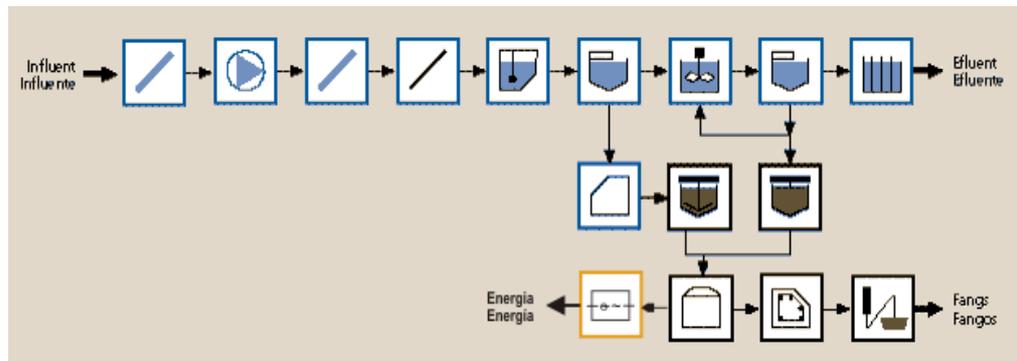


Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



FORMENTERA DEL SEGURA

Comarca :

La Vega Baja

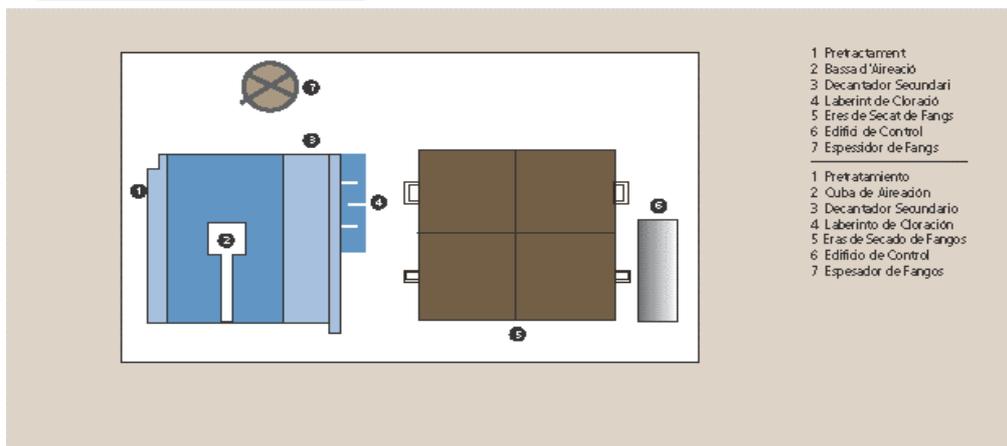


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistemas de aireación prolongada. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, cuba de aireación y decantación secundaria.

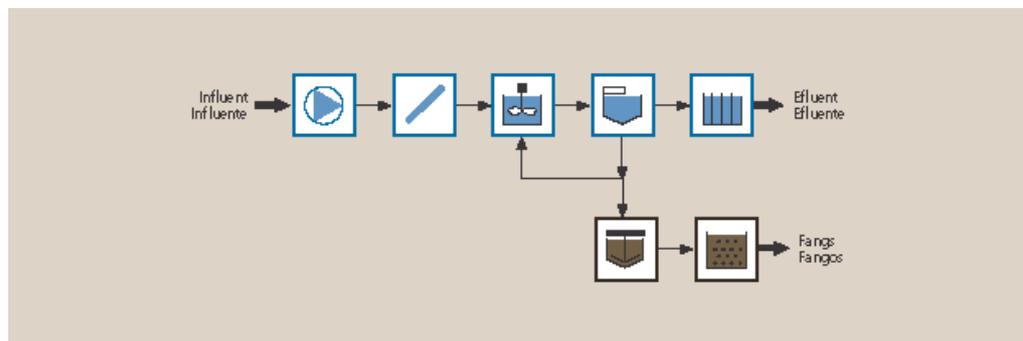
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

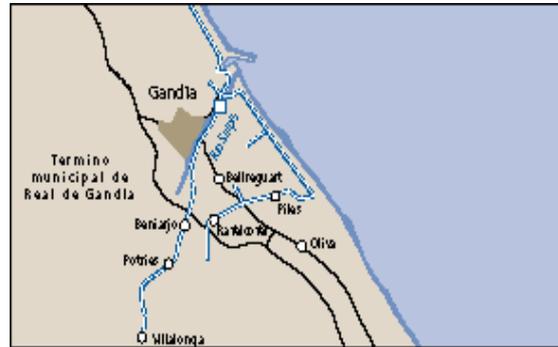
Caudal (m ³ /día):	353	Rendimientos (%):	SS:	71
Población (he):	941		DBO ₅ :	98
			DQO:	84

Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



GANDIA - LA SAFOR

Comarca :
La Safor



Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico convencional mediante fango químico. Consta de las siguientes etapas: bombeo (tanque de homogeneización, decantación primaria, secundaria, desinfección con cloro gas y tratamiento

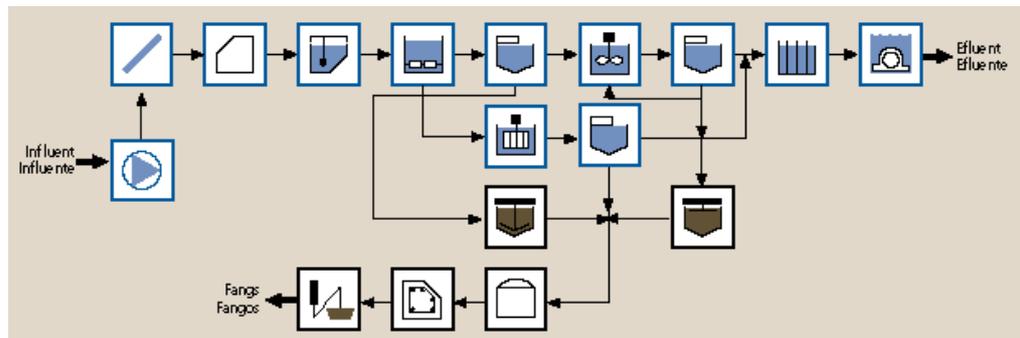
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	41.160	Rendiments (%) SS:	93
Población (he):	128.189	DBO ₅ :	91
		DQO:	87

Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



LOS MONTESINOS

Comarca :

La Vega Baja

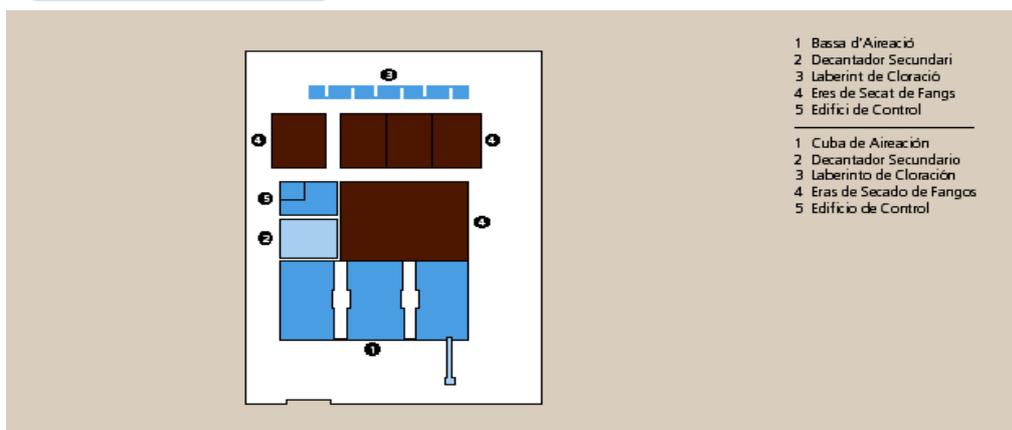


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistemas de aireación prolongada. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, cuba de aireación y decantación secundaria.

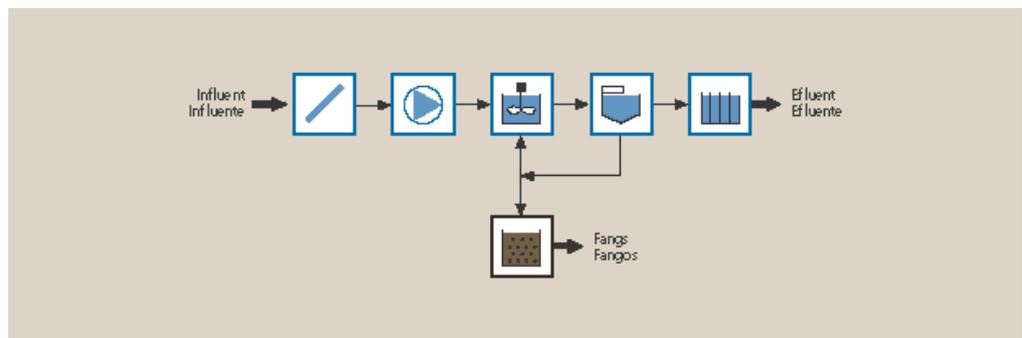
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	397	Rendiments (%) SS:	88
Población (he):	3.672	DBO ₅ :	97
		DQO:	89

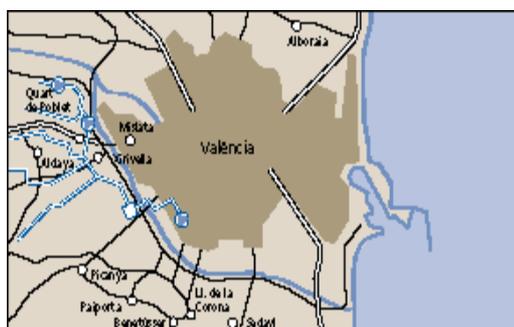
Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



QUART - BENÀGER

Comarca :

L'Horta Oest

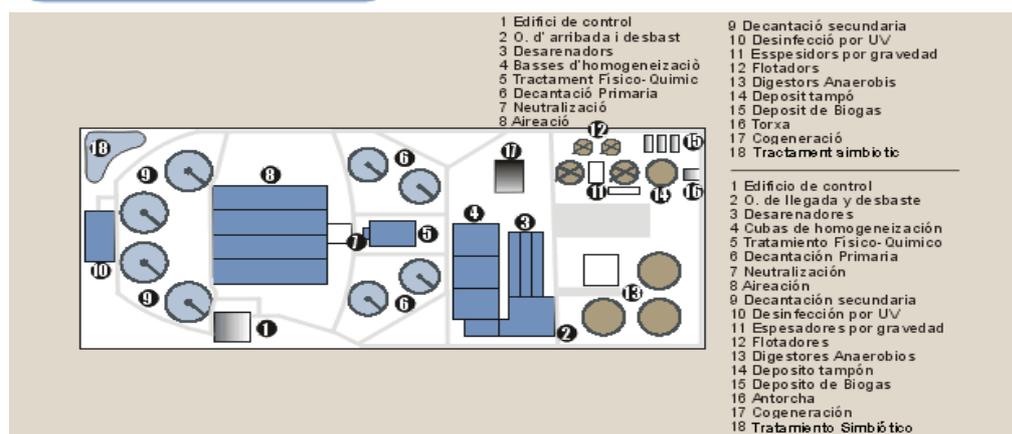


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistema convencional y tratamiento físico-químico. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, físico-químico, decantación primaria, cuba de aireación y decantador secundario.

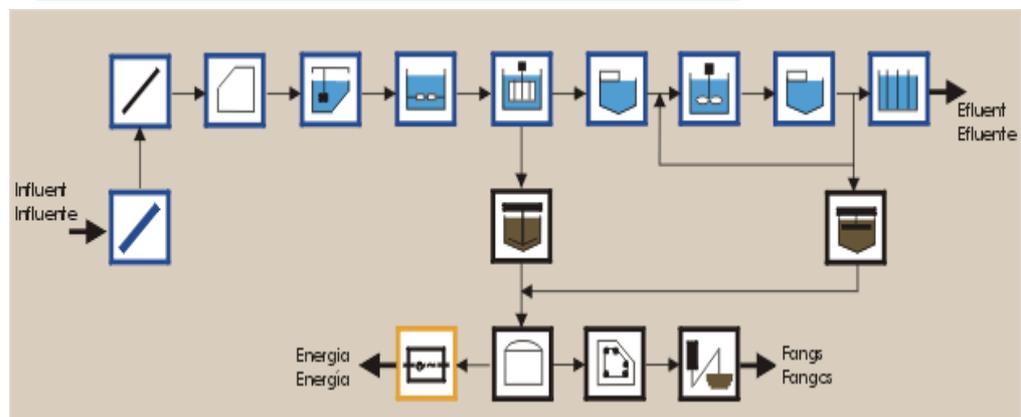
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	39.515	Rendimientos (%)	SS:	96
Población (he):	284.837		DBO ₅ :	96
			DQO:	94

Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



ROJALES

Comarca :
La Vega Baja

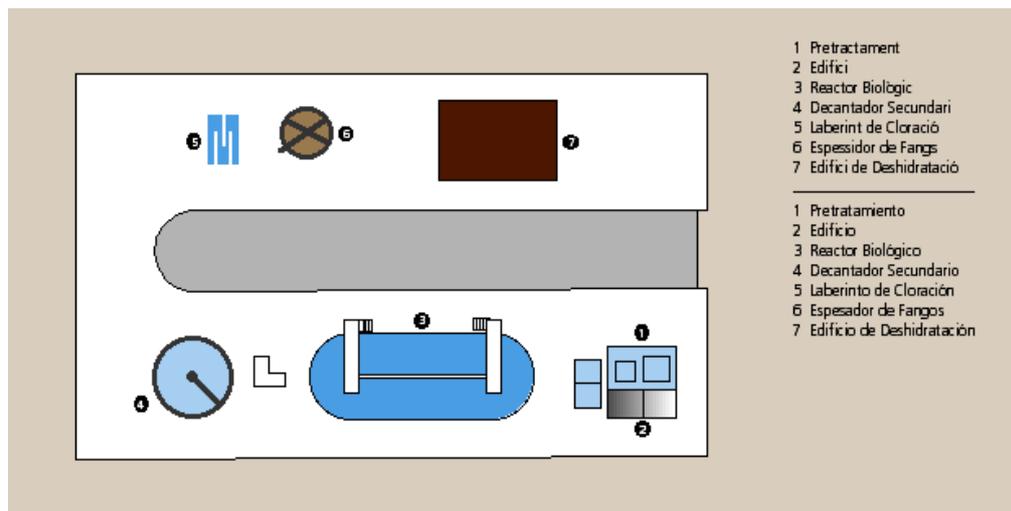


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistemas de aireación prolongada. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, cuba de aireación y decantación secundaria.

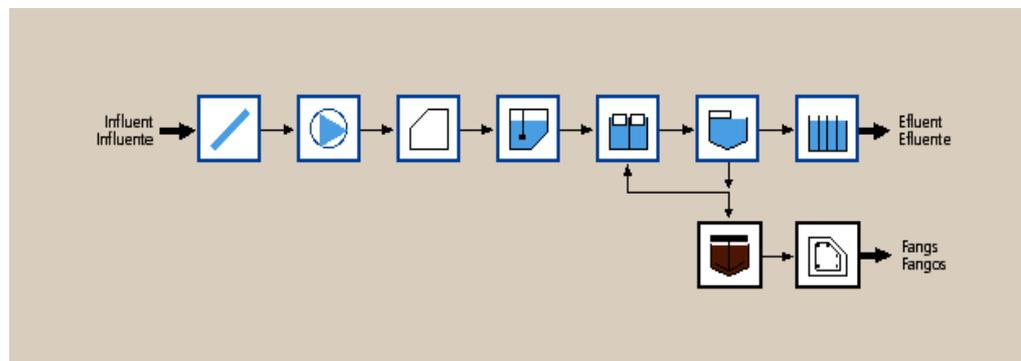
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	851	Rendimientos (%)	SS:	89
Población (he):	7.587		DBO ₅ :	98
			DQO:	92

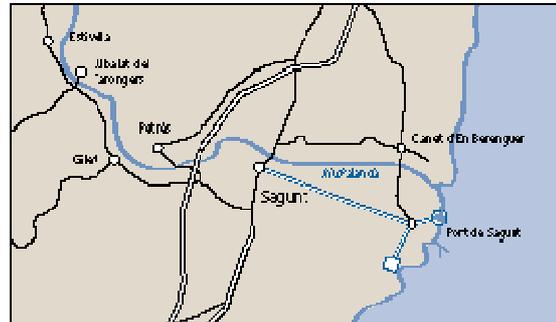
Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



SAGUNT

Comarca :

El Camp de Morvedre

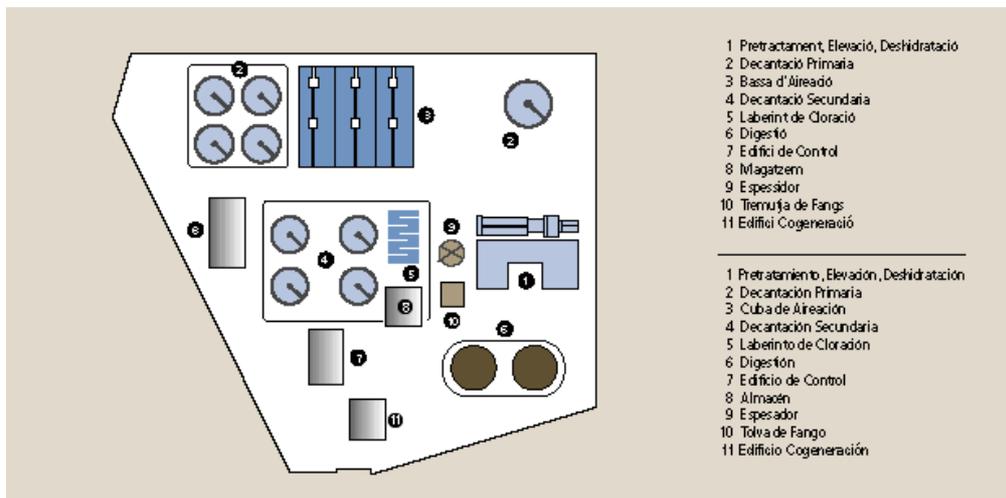


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistema convencional. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, decantación primaria, cuba de aireación y decantador secundario.

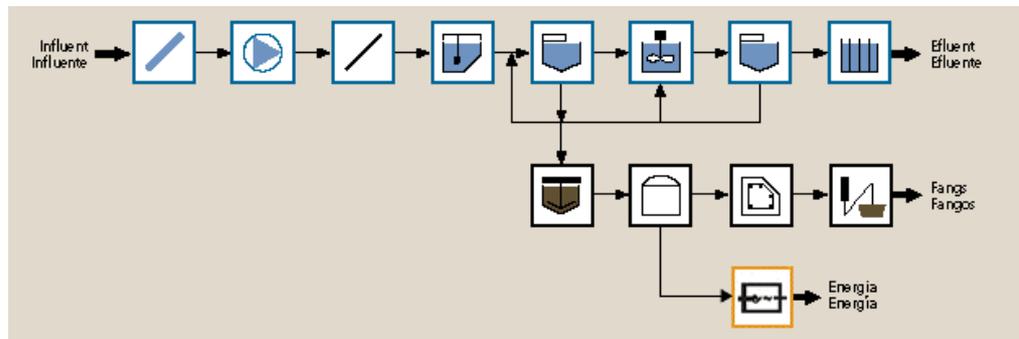
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	14.047	Rendimientos (%)	SS:	95
Población (he):	61.741		DBO ₅ :	95
			DQO:	93

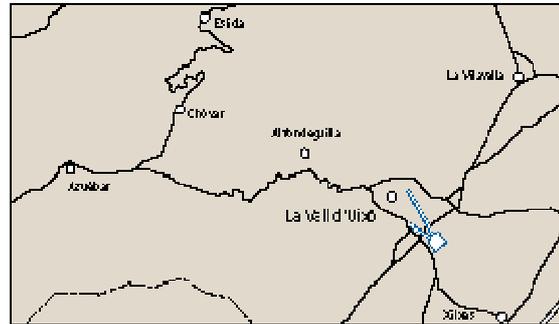
Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



LA VALL D'UIXÓ

Comarca :

La Plana Baixa

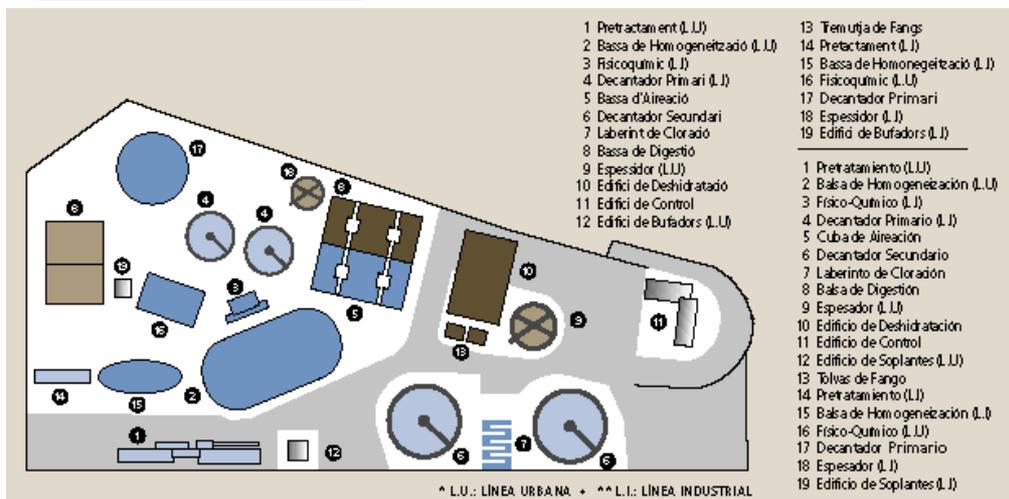


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Línea Urbana: Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistema convencional y tratamiento físico-químico. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, homogeneización, tratamiento físico-químico, decantación primaria, cuba de aireación y decantación secundaria. Línea Industrial: Tratamiento físico-químico. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, homogeneización, tratamiento físico-químico y decantación.

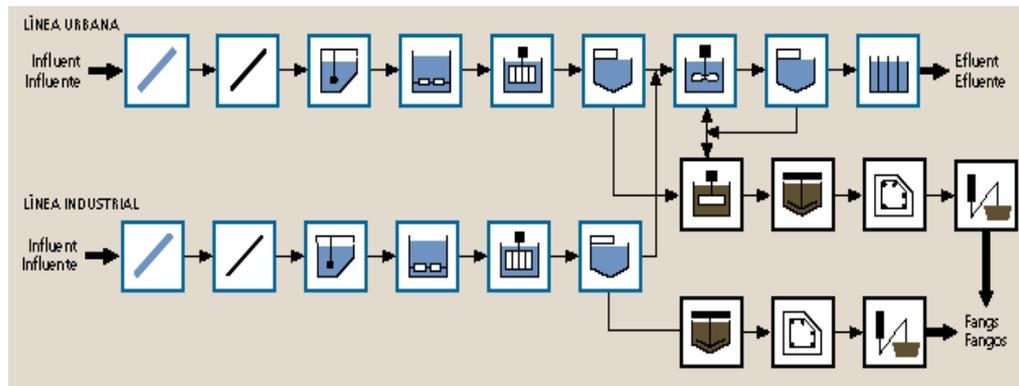
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	4.660	Rendimientos (%)	SS:	92
Población (he):	23.943		DBO ₅ :	94
			DQO:	91

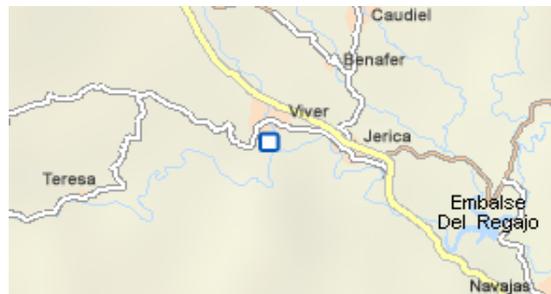
Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



VIVER

Comarca :

El Alto Palancia

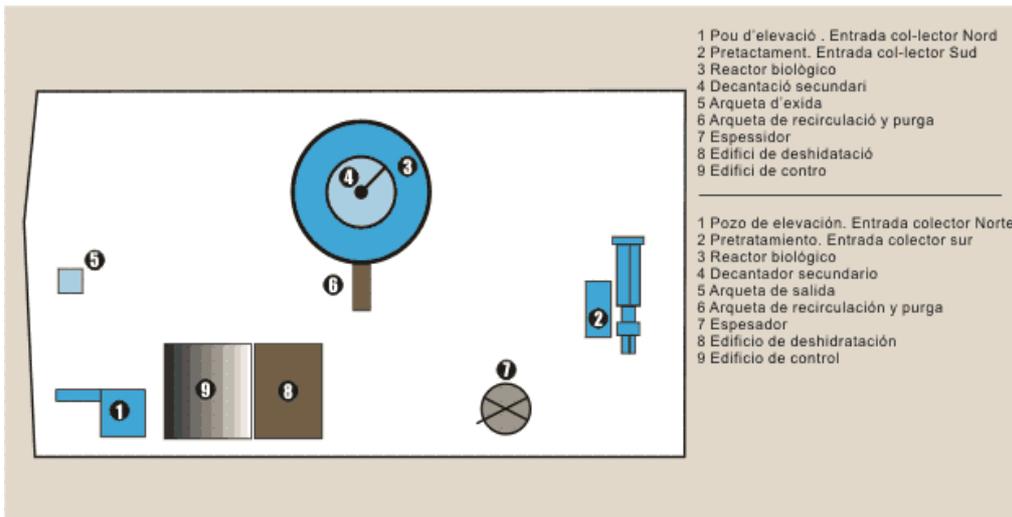


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistema de aireación prolongada. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, cuba de aireación y decantador secundario.

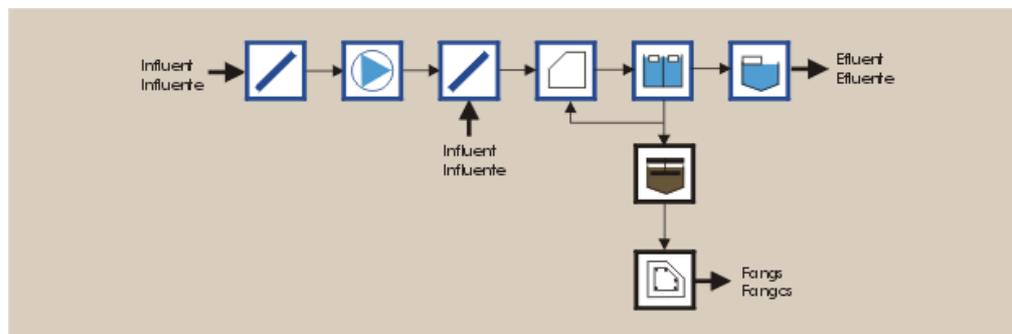
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

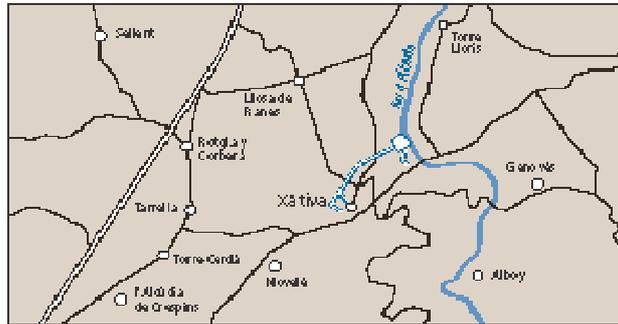
Caudal (m ³ /día):	869	Rendimientos (%)	SS:	97
Población (he):	1.943		DBO ₅ :	96
			DQO:	96

Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



XÀTIVA

Comarca :
La Costera

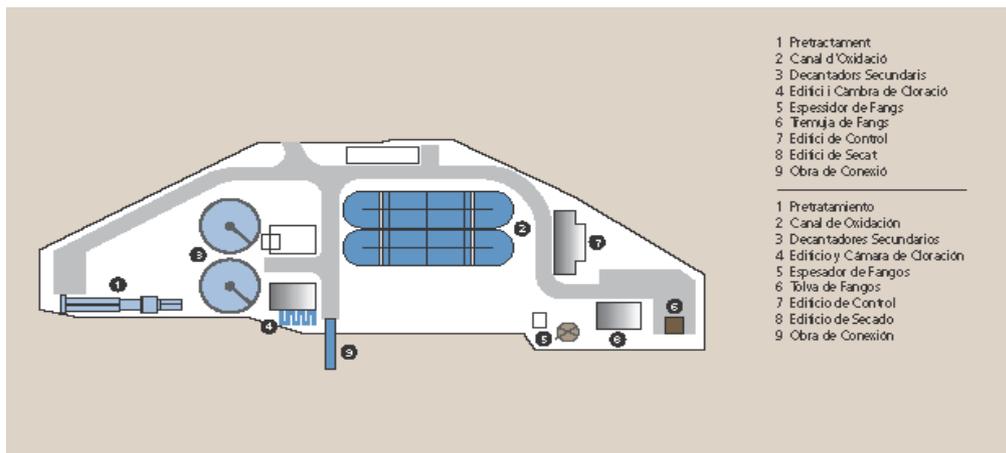


Descripció / Descripción :

Línea de agua:

Tratamiento biológico mediante fangos activados, sistemas de aireación prolongada. Consta de las siguientes etapas: pretratamiento, cuba de aireación y decantación secundaria.

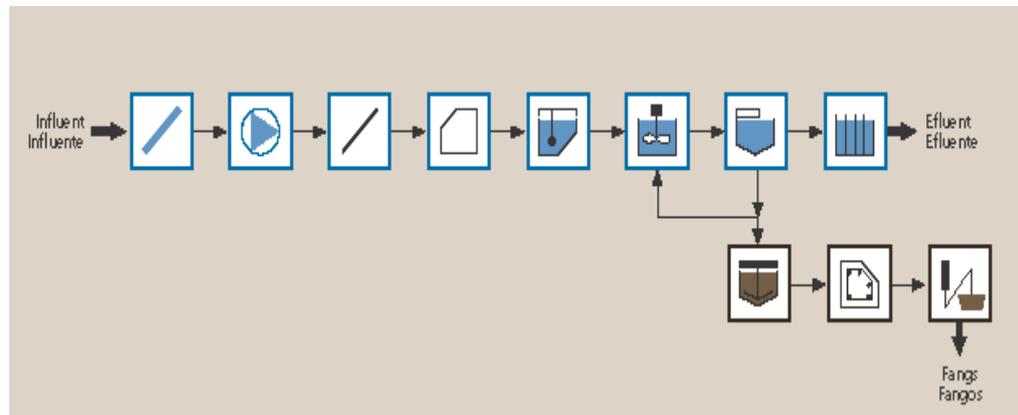
Implantació / Implantación



Dades funcionament / Datos funcionamiento 2003

Caudal (m ³ /día):	7.538	Rendimientos (%)	SS:	93
Población (he):	25.771		DBO ₅ :	95
			DQO:	90

Diagrama de blocs de proces / Diagrama de bloques de proceso



BOMBEEIG BOMBEO	MECLIA RÀPIDA FLOCULACIÓ MECLIA RÀPIDA Y FLOCULACIÓ	LLACUNA ANAERÒBIA LAGUNA ANAERÒBIA	FILTRE PERCOLADOR FILTRO PERCOLADOR	EMAGATZEMAMGE DE FANGS ALMACENAMGE DE FANGOS
DESMATS GRUÏKOS DESMATES GRUÏKOS	DECONTACIÓ DECANTACIÓ	LLIT DE TORBES LECHO DE TURBAS	SACS FILTRANTS SACOS FILTRANTES	INCINERACIÓ INCINERACIÓN
DESMATS FINS DESMATES FINOS	REACTOR BIOLÒGIC REACTOR BIOLÓGICO	TANC IMHOFF TANQUE IMHOFF	ESPESIMENTS DE FANGS PER GRAVETAT ESPESADO DE FANGOS POR GRAVEDAD	TRACTAMENT DE FUMS TRATAMIENTO DE HUMOS
TAMSAT TAMIZADO	CANAL D'OXIDACIÓ CANAL DE OXIDACIÓN	BOCIUNDRES-BODISCS BIOCIUNDROS-BODISCOS	ESPESIMENTS DE FANGS PER FLOTACIÓ ESPESADO DE FANGOS POR FLOTACIÓN	ERAS DE SECAT ERAS DE SECADO
DESARENAT DESCARENADOR DESARENADO DESARENADO	CLORACIÓ CLORACIÓN	LLACUNA D'AREACIÓ LAGUNA DE AREACIÓN	DIGESTIÓ AERÒBIA DIGESTIÓN AERÓBIA	COGENERADOR COGENERADOR
HOMOGENETZACIÓ HOMOGENEIZACIÓN	LLACUNA FACULTATIVA LAGUNA FACULTATIVA	EMISARI SUBMARÍ EMISARIO SUBMARINO	DIGESTIÓ ANAERÒBIA DIGESTIÓN ANAERÓBIA	BOMBEEIG BOMBEO EDAR EDAR COLLECTOR COLECTOR
DESULFURACIÓ DESULFURACIÓN	LLACUNA DE MADURACIÓ LAGUNA DE MADURACIÓN	FILTRE VERD FILTRO VERDE	DESHIDRATACIÓ DE FANGS CENTRIFUGACIÓ DESHIDRATACIÓN DE FANGOS CENTRIFUGACIÓN	

