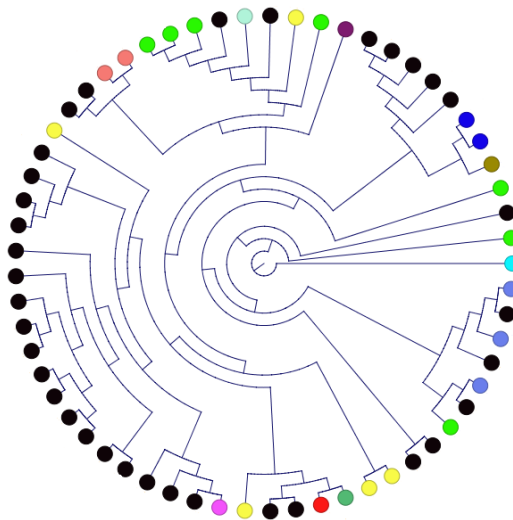




**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2015**

**MICOBACTERIAS AMBIENTALES ASOCIADAS  
A SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUAS  
POTABLES Y PURAS**



**Zoyla David Saurina**





**Universitat**  
de les Illes Balears

**TESIS DOCTORAL**  
**2015**

**Programa de Doctorado en Microbiología  
Ambiental y Biotecnología**

**MICOBACTERIAS AMBIENTALES ASOCIADAS  
A SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUAS  
POTABLES Y PURAS**

**Zoyla David Saurina**

**Directora: Margarita Gomila Ribas**  
**Director: Jorge Lalucat Jo**

**Doctora por la Universitat de les Illes Balears**



*A mi familia presente, pasada y futura.*



## AGRADECIMIENTOS

*Aunque pensemos que son otras personas, o las circunstancias, las que nos impiden alcanzar nuestros objetivos, en realidad no necesitamos a nadie. Somos nosotros mismos los que nos ponemos límites y es por esta razón que esta tesis se ha alargado en el tiempo, simplemente porque no creía que fuera capaz. Finalmente, ha sido posible y en esta sección tengo la oportunidad de agradecer a las personas que han contribuido a ello de alguna manera, directa o indirectamente.*

*Mis agradecimientos principales van dirigidos a las personas que han conseguido que me creyese que era capaz de terminar la tesis, y que además lo han hecho posible, mis directores; Jorge y Marga.*

*Agradecer a Jorge L. la confianza que depositó en mí para formar parte del equipo cuando empecé y el apoyo que siempre me ha brindado, además de su preocupación por mi situación. Agradecerle que haya sido mi director, porque ha sido un honor dada su incomparable trayectoria profesional, pero sobre todo por su accesibilidad y humildad, que merecen por mi parte una gran admiración. He tenido la suerte de contar contigo y de que las pocas veces que coincidíamos en los últimos años, siempre me animases y me dijese que hiciese caso a Marga. Tenías razón, eso hice y aquí estoy, inmensamente agradecida.*

*A Marga G. porque desde que comencé en el laboratorio me brindó su amistad, apoyo y todo cuanto necesitaba. Es una suerte que el laboratorio cuente con gente tan válida como tú, que no solo aporta experiencia como investigadora sino que también pone corazón, algo de lo que la gente se suele olvidar, muy frecuentemente. Con mi tesis terminas de dirigir el “tres en raya” de las tesis en tan solo un año, nada más y nada menos, y con toda la dificultad que ha implicado esta última, por el tiempo transcurrido desde que se inició. Gracias por tu amistad, fundamental para continuar mi relación con el laboratorio a pesar de estar trabajando fuera a partir del segundo año. Nunca podré agradecerte suficientemente todo lo que has hecho por mí, te has privado de tener vacaciones, de pasar más tiempo con tu familia y siempre con un optimismo envidiable y una confianza firme en que todo saldría bien, sin que yo te diera motivos para ello. Por todo esto, y por el privilegio de haber contado contigo de directora, MIL GRACIAS.*

*Haciendo un repaso de todo este tiempo, mis comienzos en el departamento de Microbiología fueron gracias a Rafa B. que me permitió participar de alumna colaboradora. Posteriormente, Javier B. † me aceptó también de alumna colaboradora, pero su triste e inesperada pérdida dejó atrás la posibilidad de empezar en el campo de la microbiología clínica, que era lo que quizás me atraía más, en parte influenciada por sus clases, de las que tengo muy buen recuerdo y desde las que soy, curiosamente y gracias a él, donante de sangre.*

*Elena G-V. me introdujo en el laboratorio y a ella le agradezco muy especialmente que me diera la oportunidad y que me guiase el primer año que aterricé después de acabar la carrera para empezar una tesis relacionada con el vertido del PRESTIGE pero que, con el tiempo, cambié por el tema de las micobacterias. Todo cuanto me enseñaste del laboratorio me ha servido muchísimo y, en especial, la importancia de ir guardándolo todo...referencias, secuencias que a priori no eran perfectas...porque todo podía ser de utilidad más adelante, como así ha sido.*

*Agradezco a Aina C. el esfuerzo que hizo, en un año que seguramente para ella no era de los mejores, por enseñarme todas las técnicas que necesitaba. Mi paso por el laboratorio fue breve, pero suficiente para hacer verdaderos amigos. Agradezco a todos ellos y a los que por entonces trabajaban por Micro, los grandes momentos vividos dentro y fuera del Labo, por contagiar el buen ambiente que se respiraba y por ayudarme en todo cuanto necesité: Magda y Toni Busquets (ha sido fundamental vuestra ayuda con las últimas secuencias!), Meri (gracias por ofrecerme tu amistad todo este tiempo), Cris, Bea, Marutxi y Joseph (gracias por compartir momentos inolvidables y por vuestra amistad), Mariana (gracias por revolucionar el Labo en su momento y por promover salidas a la montaña), Miki, de nuevo Marga, Celia, Toni Bennasar y Balbina. También agradezco a los que llegaron cuando ya trabajaba fuera del Labo y hacía incursiones esporádicas, por hacerme sentir una más y ayudarme cuando lo necesité; Claudia S., David, Arantxa, Margalida P. y Claudia P.*

*Agradecer al Dr. Antonio Ramírez su amabilidad al facilitarme todos los procedimientos para empezar la tesis y sobre todo por ayudarme, sin conocerme de nada, con todo el material necesario de las prácticas de Microbiología cuando hice una sustitución y también por la cesión de cepas de origen clínico. Al Dr. Joan Gascó por su implicación y colaboración en la toma de muestras de aguas de hemodiálisis del Hospital Son Llàtzer. De igual modo, agradecer a la Dra. Carmen Gallegos la cesión de las cepas clínicas que han sido analizadas en esta tesis.*

*A pesar de que el trabajo de redacción de la tesis ha sido muy difícil por el tiempo que había pasado desde que se inició, he de decir que todo en la vida tiene su momento y, a nivel personal, no ha habido un momento mejor para hacerlo. Compaginar estos años de trabajo en FOGAIBA (Fondo de Garantía Agraria y Pesquera de las Islas Baleares) con las sesiones de laboratorio por las tardes no fue tarea fácil, pero peor era la sensación de no poder acabar este capítulo. Estoy convencida de que acabar las cosas que se empiezan te da una satisfacción que te ayuda a seguir adelante con más confianza y esperanza de que las cosas pueden mejorar.*

*Agradezco a mi madre, Antonia M<sup>a</sup>, todo lo que ha hecho por mí. Sobre todo el esfuerzo que hizo económicamente, para que terminase los estudios sin necesidad de trabajar, y sin el que no hubiera sido posible nada de esto. A mi sister Sandra, y a la vez mejor amiga, por los ánimos, confianza ciega en mí y por ayudarme a ver las cosas desde otra óptica, indispensable para tomar la determinación de acabar la tesis. Al resto de mi familia, Malena, Vicente y Damià, por su apoyo en los momentos difíciles y a los peques, David C. y Margalida G., por inundarnos de momentos divertidos. A mi abuela, Margalida, que nos acompañó hasta el año pasado, por ponernos siempre los pies en la tierra y porque esta tesis va en compensación por la continuidad en los estudios que le negaron por temas ajenos a su capacidad, propios de las desigualdades de la época.*



*Agradecer a mi amigo Juanjo los ánimos para acabar esta tesis, tan interminable como nuestras charlas en la distancia donde nos imaginábamos entre risas lo que haríamos en investigación al terminar la tesis. Nadie hubiera dicho entonces que años más tarde estaríamos trabajando juntos. Gracias por tu particular humor en mis peores momentos, por tus dosis de realidad, por confiar en mí y por los buenos momentos vividos desde que nos hicimos amigos en la carrera.*

*Gracias al resto de amigos que me han apoyado con infinidad whatsapps dándome ánimos para acabar la tesis que parecía más una maratón que otra cosa; Marta “prima” (gracias por entender mi desaparición estos últimos meses), Andrea, Tere, Caty, Maka, Antonia, Ursu, los compañeros del grupo de Desprogramación B. y mis compis de trabajo, en especial a Aloha. También quiero agradecer muy especialmente a Miguel O. su gran apoyo durante mi época de laboratorio y sus incesantes ánimos para que acabase.*

*Agradezco a Felip, mi gran descubrimiento y apuesta, que haya puesto todo el empeño en que acabase este capítulo de mi vida que tanto me ha costado cerrar y que tanto me pesaba, porque ha conseguido lo imposible gracias a su inagotable energía, habilidades informáticas y dosis de buen humor, que me brinda día a día. Gracias por hacerme tan feliz, es un privilegio compartir la vida con alguien tan maravilloso como tú.*

*Finalmente, me gustaría agradecer a mi padre, Armando E. David Parionat, todo lo que me enseñó porque gracias a eso soy lo que soy y he podido llegar hasta aquí. Gracias porque aun hoy, después de 18 años de ausencia, siguen siendo válidos tus consejos. Gracias por ser ejemplo de ejercer tu profesión con envidiable humildad, pasión y vocación, pero sobre todo, con el objetivo de ayudar a los demás.*

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el proyecto CGL2011-24318/BOS del  
Ministerio de Economía y Competitividad.



## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN/RESUM/ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
1 MICOBACTERIAS AMBIENTALES O ATÍPICAS	13
1.1 Nomenclatura y características generales	13
1.2 Aspectos morfológicos	14
1.3 Aspectos fisiológicos y metabólicos	16
1.4 Reservorios principales	17
1.5 Diversidad de especies. Taxonomía y clasificación	18
1.6 Vías de exposición e infección	24
1.7 Aspectos epidemiológicos	26
1.8 Métodos de detección e identificación	26
1.8.1 Métodos clásicos o tradicionales	27
1.8.1.1 Descontaminación previa de la muestra	27
1.8.1.2 Aislamiento por cultivo	28
1.8.1.3 Identificación por características morfológicas y fisiológicas	29
1.8.1.4 Pruebas bioquímicas	29
1.8.1.5 Tinciones	30
1.8.2 Métodos actuales	31
1.8.2.1 Secuenciación	31
1.8.2.2 PCR-RFLP ( <i>hsp65</i> )	33
1.8.2.3 Hibridación en fase sólida	33
1.8.2.4 Identificación cromatográfica	34
1.8.2.4.1 Espectrometría de masas	34
2 AGUAS POTABLES Y PURAS. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	34
2.1 Aguas potables	34
2.2 Aguas puras	36
2.2.1 Aguas de hemodiálisis	37
2.2.1.1 Riesgos asociados	37
2.2.1.2 Tratamiento del agua en unidades de diálisis	39
2.3 Biopelículas	40
2.3.1 Concepto	40
2.3.2 Características generales	40
3 MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN AGUAS POTABLES Y PURAS	41
3.1 Micobacterias y biopelículas	43
<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	51
1.1 Origen y descripción de las muestras	51

1.1.1	Muestras obtenidas a partir de aguas puras hospitalarias	51
1.1.1.1	Tratamiento inicial de desinfección con hipoclorito sódico	52
1.1.1.2	Tratamiento de desinfección con ácido peracético	52
1.1.2	Muestras obtenidas a partir de aguas potables	52
1.1.2.1	Origen hospitalario	53
1.1.2.2	Origen no hospitalario	53
1.2	Cronología en la obtención de muestras	53
1.3	Recogida de muestras	54
2	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES, INDEPENDIENTES DE CULTIVO	55
2.1	Extracción de DNA y RNA total	56
2.2	Reacción de la transcriptasa-reversa (RT)	57
2.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional del gen del rRNA 16S	57
2.4	PCR anidada ( <i>nested</i> -PCR) del gen del rRNA 16S de micobacterias	58
2.5	RT-PCR y PCR del gen del rRNA 16S	59
2.6	Clonación	59
2.7	Selección de clones recombinantes (con inserto) obtenidos en las genotecas	59
2.8	Extracción de DNA plasmídico de los clones	60
2.9	Análisis de los clones de las genotecas	60
2.10	Secuenciación de los clones obtenidos	61
2.11	Análisis filogenético de las secuencias de los clones	62
2.12	Estimación de la cobertura de la genoteca e índices de diversidad	63
3	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS MEDIANTE MÉTODOS CLÁSICOS Y MOLECULARES, DEPENDIENTES DE CULTIVO	65
3.1	Filtración por membrana	65
3.2	Descontaminación de las muestras	65
3.3	Diluciones y recuento en placa de células viables	66
3.4	Aislamiento y cultivo	67
3.5	Determinación de la alcohol ácido resistencia (AAR)	68
3.6	Micobacterias de origen clínico	68
3.7	Extracción de DNA	69
3.8	Amplificación y secuenciación del DNA	70
3.9	Análisis filogenético de las secuencias de los aislamientos	72
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
	<b>CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA PRESENTE Y METABÓLICAMENTE ACTIVA EN EL AGUA DE HEMODIÁLISIS, MEDIANTE MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO</b>	<b>75</b>
C1-1	CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DE LAS GENOTECAS rDNA 16S Y rRNA 16S	77
C1-1.1	Análisis filogenético a nivel de filo, género y especie	85
C1-2	DIVERSIDAD BACTERIANA	90

<b>CAPÍTULO 2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES ASOCIADAS A SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUAS PURAS, MEDIANTE MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO</b>	<b>95</b>
C2-1 OPTIMIZACIÓN DE LA PCR ANIDADA	97
C2-2 OBTENCIÓN, <i>SCREENING</i> Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA GENOTECA DEL GEN DEL rRNA 16S ESPECÍFICA DE <i>Mycobacterium</i>	98
C2-3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y CURVAS DE RAREFACCIÓN	107
C2-4 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES MEDIANTE PCR DE GENES ESPECÍFICOS ( <i>hsp65</i> , <i>gyrB</i> y <i>rpoB</i> )	110
<b>CAPÍTULO 3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS MULTIGÉNICO DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES ASOCIADAS A SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUAS POTABLES Y PURAS, Y DE MICOBACTERIAS DE ORIGEN CLÍNICO</b>	<b>111</b>
C3-1 AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS DE ORIGEN AMBIENTAL	113
C3-1.1 Micobacterias ambientales seleccionadas por análisis de la alcohol ácido resistencia (tinción Ziehl-Neelsen)	114
C3-1.2 Recuperación de micobacterias ambientales mediante estrategia de descontaminación	116
C3-1.3 Recuperación de micobacterias ambientales sin tratamiento de descontaminación previa	129
C3-2 AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS DE ORIGEN CLÍNICO	136
C3-3 ANÁLISIS MULTIGÉNICO DE LAS MICOBACTERIAS AMBIENTALES Y CLÍNICAS OBTENIDAS	136
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>153</b>
1 RELEVANCIA DE LAS MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN HÁBITATS ACUÁTICOS	155
2 MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO	156
3 MÉTODOS DEPENDIENTES DE CULTIVO	159
4 COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO Y CON ESTUDIOS PREVIOS	162
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>165</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>169</b>
<b>ANEXO</b>	<b>199</b>
<b>CONTRIBUCIONES DE LA AUTORA</b>	<b>233</b>



RESUMEN

RESUM

ABSTRACT

---





Las micobacterias ambientales, conocidas también como micobacterias atípicas o micobacterias no tuberculosas, son microorganismos saprófitos, frecuentes en suelo, alimentos, polvo y especialmente, agua. Son oligotróficas, capaces de crecer en concentraciones bajas de materia orgánica y en un amplio rango de temperaturas, con variaciones de pH e incluso a bajas concentraciones de oxígeno, siendo resistentes a los desinfectantes, metales pesados y antibióticos. Pueden ser patógenos oportunistas de humanos y animales aunque, en general, son habitantes normales del medio ambiente. Son capaces de colonizar y crecer en las conducciones de agua en hospitales, edificios de apartamentos y casas, formando biopelículas, que pueden convertirse en una posible fuente de infección, al transmitirse a través de las aguas, aerosoles o polvo y ser inhaladas o ingeridas. Es por ello que su estudio es de interés en salud pública, adquiriendo una especial relevancia en los ambientes hospitalarios.

En los últimos años ha ido aumentando el interés por el potencial patogénico de las micobacterias, y también se ha puesto de manifiesto el papel ecológico que pueden jugar estos patógenos oportunistas presentes en las conducciones de agua. En un estudio pionero previo, llevado a cabo por el grupo de investigación de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares y de la unidad de diálisis del Hospital *Son Llàtzer* en Palma de Mallorca, se analizó la comunidad microbiana presente en aguas puras de hemodiálisis, por métodos dependientes e independientes de cultivo, y se detectó un inesperado porcentaje de aislados de micobacterias ambientales, una de las cuales dio origen a la descripción de una nueva especie, denominada *M. llutzerense*, posteriormente identificado como patógeno en muestras clínicas.

La presente tesis doctoral plantea como objetivo principal detectar y caracterizar micobacterias ambientales presentes en muestras de aguas potables y puras, por métodos dependientes e independientes de cultivo.

La detección de micobacterias por métodos independientes de cultivo, en las aguas puras de hemodiálisis, se ha basado en el análisis de genotecas del gen rDNA 16S y por RT-PCR del mismo gen utilizando cebadores universales, así como empleando cebadores específicos de micobacterias. En las dos primeras genotecas no se detectaron clones afiliados al género *Mycobacterium*. Éstos sí se revelaron al usar cebadores específicos en una PCR-anidada. En cuanto a los métodos dependientes de cultivo, se utilizaron distintas estrategias para la detección de micobacterias ambientales, evaluándose su eficacia. El análisis multigénico de los aislados obtenidos reveló que los aislados de origen ambiental se clasificaban exclusivamente en el grupo de micobacterias de crecimiento rápido, mientras que las de origen clínico pueden ser de crecimiento rápido o lento.

Se han aislado e identificado especies potencialmente patógenas, principalmente micobacterias de crecimiento rápido, tanto por métodos dependientes como independientes de cultivo, que en el caso de muestras hospitalarias pueden suponer un riesgo de infección para pacientes inmunocomprometidos. Este estudio hace especial hincapié en la necesidad de mejorar el control de los procesos de desinfección efectivos en estos tipos de aguas, monitorizar continuamente el suministro de agua y adoptar en el caso de muestras ambientales hospitalarias, medidas profilácticas eficientes para minimizar la exposición de pacientes inmunodeprimidos a fuentes contaminadas.

Els micobacteris ambientals, coneguts també com a micobacteris atípics o micobacteris no tuberculosos, són microorganismes sapròfits, freqüents a sòl, aliments, pols i especialment, aigua. Són oligotròfics, capaços de créixer a concentracions baixes de matèria orgànica i a un ampli rang de temperatures, amb variacions de pH i, fins i tot, a baixes concentracions d'oxigen. Són resistent als desinfectants, metalls pesants i antibiòtics. Poden ser patògens oportunistes d'humans i animals encara que, en general, són habitants normals del medi ambient. Són capaços de colonitzar i créixer a les conduccions d'aigua en hospitals, edificis d'apartaments i cases, formant biopel·lícules, que poden convertir-se en una possible font d'infecció, quan es transmeten a través de les aigües, aerosols o pols, i ser inhalades o ingerides. És per això, que el seu estudi és d'interès en salut pública, adquirint una especial rellevància en els ambients hospitalaris.

En els darrers anys ha anat augmentant l'interès pel potencial patogènic dels micobacteris, i també s'ha posat de manifest el paper ecològic que poden jugar aquests patògens oportunistes presents a les conduccions d'aigua. En un estudi pioner previ, dut a terme pel grup de recerca de Microbiologia de la Universitat de les Illes Balears i de la unitat de diàlisi de l'Hospital *Son Llàtzer* a Palma de Mallorca, es va analitzar la comunitat microbiana present a les aigües pures de hemodiàlisi, per mètodes dependents i independents de cultiu, i es va detectar un inesperat percentatge d'aïllats de micobacteris ambientals, un dels quals va donar origen a la descripció d'una nova espècie, anomenada *M. llatzerense*, posteriorment identificada com a patògen en mostres clíniques.

L'objectiu principal de la present tesi doctoral és detectar i caracteritzar els micobacteris ambientals presents a mostres d'aigües potables i pures, per mètodes dependents i independents de cultiu.

La detecció de micobacteris per mètodes independents de cultiu, a les aigües pures d'hemodiàlisi, s'ha basat en l'anàlisi de genoteques del gen rDNA 16S i per RT-PCR del mateix gen utilitzant encebadors universals, així com emprant encebadors específics de micobacteris. En les dues primeres genoteques no es van detectar clons afiliats al gènere *Mycobacterium*. Aquests sí que es van detectar quan s'empraren encebadors específics en una PCR-imbricada. Pel que fa als mètodes dependents de cultiu, es van utilitzar diferents estratègies per a la detecció de micobacteris ambientals, avaluant la seva eficàcia. L'anàlisi multigènica dels aïllats obtinguts va mostrar que els aïllats d'origen ambiental es classificaven exclusivament en el grup de micobacteris de creixement ràpid, mentre que les d'origen clínic poden ser de creixement ràpid o lent.

S'han aïllat i identificat espècies potencialment patògenes, principalment micobacteris de creixement ràpid, tant per mètodes dependents com independents de cultiu, que en el cas de mostres hospitalàries poden suposar un risc d'infecció per a pacients immunocompromesos. Aquest estudi fa especial èmfasi en la necessitat de millorar el control dels processos de desinfecció efectius en aquests tipus d'aigües, monitoritzar contínuament el subministrament d'aigua i adoptar en el cas de mostres ambientals hospitalàries, mesures profilàctiques eficients per minimitzar l'exposició de pacients immunodeprimits a fonts contaminades.

Environmental mycobacteria, also known as atypical mycobacteria or nontuberculous mycobacteria, are saprophytic microorganisms, frequent in soil, food, dust and especially water. They are oligotrophic, able to grow at low concentrations of organic matter and in a wide range of temperatures, pH, and even at low oxygen concentrations. Mycobacteria are resistant to disinfectants, antibiotics and heavy metals. They can be opportunistic pathogens of humans and animals but, in general, are considered environmental bacteria. They are able to colonize and grow in hospital water lines, apartment buildings and houses, forming biofilms, which can become a potential source of infection, transmitted through water, aerosols or dust and consequently be inhaled or ingested. For this reason their study is of interest in public health, acquiring special relevance in hospital environments.

The interest in the study of potential pathogenic mycobacteria has been increasing in the last years, and their ecological role in the water pipes has been also highlighted. In a previous pioneering study, conducted by the research group of Microbiology at the University of the Balearic Islands and the dialysis unit of the Hospital *Son Llàtzer* in Palma de Mallorca, the microbial community present in hemodialysis pure water was analyzed using culture dependent and independent methods. An unexpected high percentage of environmental mycobacteria were detected, one of which led to the description of a new species, *M. llatzerense*, later identified as an opportunistic pathogen in clinical samples.

The main objective of this doctoral thesis is the detection and characterization of environmental mycobacteria present in drinking water and pure water by using culture dependent and independent methods.

The detection of mycobacteria by culture independent methods, in hemodialysis pure water has been based on the analysis of 16S rRNA gene libraries and by RT-PCR from the same gene product using universal primers, and also specific primers for mycobacteria. No clones were assigned to the genus *Mycobacterium* in the first two 16S rDNA gene libraries. They were detected by using specific primers in a nested-PCR. In the culture dependent methods, different strategies for the detection of environmental mycobacteria were used, and their effectiveness was assessed. The multilocus sequence analysis of the isolates obtained revealed that isolates from environmental sources were classified only in the group of rapidly growing mycobacteria, while isolates of clinical origin could be classified as fast or slow growing mycobacteria.

Potentially pathogenic species have been isolated and identified, mainly rapidly growing mycobacteria, using both culture dependent and independent methods. In the case of hospital samples they may represent a risk for immunocompromised patients. This study strongly emphasizes the need to improve control of effective disinfection procedures in these types of waters, continuously monitor the water, and implement efficient prophylactic measures in the case of hospital environmental samples to minimize the exposure of immune compromised patients to the contaminated sources.



# INTRODUCCIÓN

---



## 1 MICOBACTERIAS AMBIENTALES O ATÍPICAS

### 1.1 Nomenclatura y características generales

Las micobacterias son un conjunto de microorganismos englobados dentro del género denominado *Mycobacterium*, que constituye el género tipo de la familia *Mycobacteriaceae* y el único integrante de la misma. Esta familia se caracteriza por integrar microorganismos que presentan ácidos micólicos con un gran número de átomos de carbono y por el predominio de menaquinonas dihidrogenadas con nueve unidades de isopreno (Magee y Ward, 2012). El género *Mycobacterium* se caracteriza a su vez, por presentar alcohol ácido resistencia (AAR) en alguna fase del crecimiento y por tener un elevado contenido de guanina y citosina (contenido G+C) en su DNA, en el rango de 57 a 73 % en moles, porcentajes similares a los de otras bacterias productoras de ácidos micólicos (Goodfellow *et al.*, 2012).

A nivel etimológico, el nombre del género proviene del prefijo griego *mukês*, que significa “hongo”, y del latín *bacterium*, que significa “pequeño bastón”, por lo que su denominación alude a un “pequeño bacilo similar a un hongo” (Dorronsoro y Torroba, 2007; Murray *et al.*, 2009).

El género *Mycobacterium* es conocido por incluir un grupo de especies de gran importancia desde el punto de vista de la patología infecciosa en humanos, al constituir agentes causales de enfermedades con una gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial, tales como la tuberculosis (TB), la lepra y, en las últimas décadas las denominadas “micobacteriosis” o enfermedades producidas por micobacterias diferentes de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Casal *et al.*, 1999). Las especies causantes de las “micobacteriosis”, se caracterizan por tener un menor poder patógeno, que varía entre especies, pudiendo ser oportunistas y causar patologías, generalmente, en pacientes con estado de inmunosupresión o inmunodepresión, condicionado en algunos casos al VIH (virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida; SIDA), cáncer, quimioterapia, enfermedades autoinmunes, enfermedades con obstrucción pulmonar crónica, fibrosis quística u otras condiciones de predisposición (Fernández de la Vega, 2005), por lo que han despertado un interés creciente en las últimas décadas.

El conjunto de especies del género *Mycobacterium*, diferentes del grupo de *M. tuberculosis* y *M. leprae*, constituyen un grupo heterogéneo, muy numeroso y difícil de sistematizar, que ha recibido diversas denominaciones desde sus primeras descripciones (1899); micobacterias atípicas (para diferenciarlas de las típicas, es decir, *M. tuberculosis*, sin embargo, no las diferencia como debería del grupo *M. leprae*), micobacterias no tuberculosas (a pesar de que producen lesiones con tubérculos), micobacterias diferentes de las tuberculosas (*mycobacteria other than tuberculosis*, MOTT, término largo y de difícil traducción a nuestro idioma), micobacterias oportunistas (término inadecuado porque incluye micobacterias no descritas como patógenas en humanos), micobacterias ambientales (se encuentran ampliamente diseminadas por el ambiente, si bien alguna especie descrita recientemente solo se ha aislado de muestras clínicas y no del ambiente; no es un término habitual en la

bibliografía en lengua inglesa) y otras denominaciones diversas, menos conocidas; bacilos pseudotuberculosos, bacilos paratuberculosos, micobacterias anormales, micobacterias anónimas, micobacterias inclasificadas y, finalmente, PPEM (*Potentially Pathogenic Environmental Mycobacteria*) (Valdés y Cid, 2004; García *et al.*, 2005).

Actualmente, no hay un verdadero consenso en la denominación más ajustada y correcta de estas micobacterias, sino que depende de la opinión de cada autor o sociedad científica. El grupo TIR (Tuberculosis e Infecciones Respiratorias), de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), recomienda la denominación binomial de forma sistemática y preferente (género y especie) y el término de "micobacterias ambientales" (MA) para la denominación global del grupo (García *et al.*, 2005).

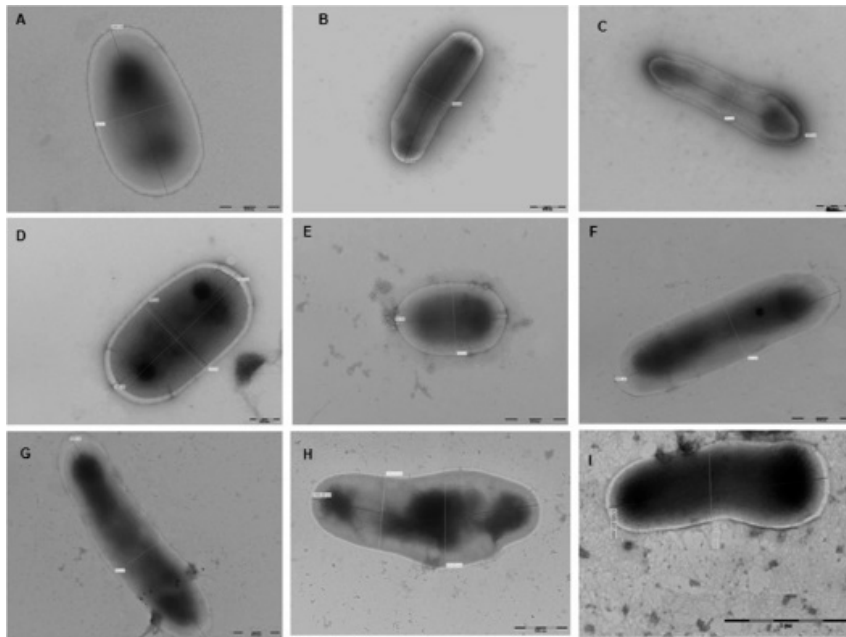
## 1.2 Aspectos morfológicos

El género *Mycobacterium* conforma un grupo de microorganismos de características morfológicas comunes entre las que se incluye la ausencia de flagelos que determinan la consideración de inmóviles a excepción de *M. marinum* que presenta movilidad en el interior de macrófagos (Stamm *et al.*, 2003). Son pleomórficos y pueden presentar un crecimiento en filamentos o similar a un micelio que, tras una ligera perturbación, se fragmenta en bacilos o elementos cocoides. Generalmente, son bacilos rectos o ligeramente curvados (Figura 1), no esporulados y con un tamaño de 0,2 a 0,6  $\mu\text{m}$  de ancho y 1 a 10  $\mu\text{m}$  de largo (Goodfellow *et al.*, 2012).

En cuanto a la morfología colonial, la mayoría de micobacterias forman más de un tipo de colonia. Las células de cepas rugosas generalmente son compactadas en hebras curvadas, mientras que las cepas lisas no tienen un patrón orientado. Al crecer en medio sólido suelen formar colonias apretadas, compactas y arrugadas, en las que los organismos se amontonan debido, probablemente, al elevado contenido de lípidos de la pared celular que le procura una superficie celular hidrofóbica (Madigan *et al.*, 2004). Las colonias pueden ser blancas o color crema, aunque algunas cepas producen colonias de pigmentación amarilla o naranja, con o sin estimulación de la luz (Goodfellow *et al.*, 2012).

Un rasgo distintivo de las micobacterias es la elevada concentración de lípidos que poseen en la pared celular, limitante de su permeabilidad a colorantes y que, consecuentemente, dificulta su tinción. A pesar de esta dificultad, son Gram positivas. Su elevada hidrofobicidad les proporciona adherencia superficial y capacidad de formación de biopelículas (Brennan y Nikaido, 1995), por lo que les confiere una elevada resistencia a determinados agentes químicos y antibióticos (Murray *et al.*, 2009). Algunos de los constituyentes lipídicos que integran la pared celular juegan un papel clave en la modulación de la respuesta del huésped durante la infección y, por tanto, en la patogenicidad de la micobacteria asociada a la persistencia intracelular (Schlesinger *et al.*, 1994; Chatterjee y Khoo, 1998; Nigou *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2003; Pfyffer, 2015).



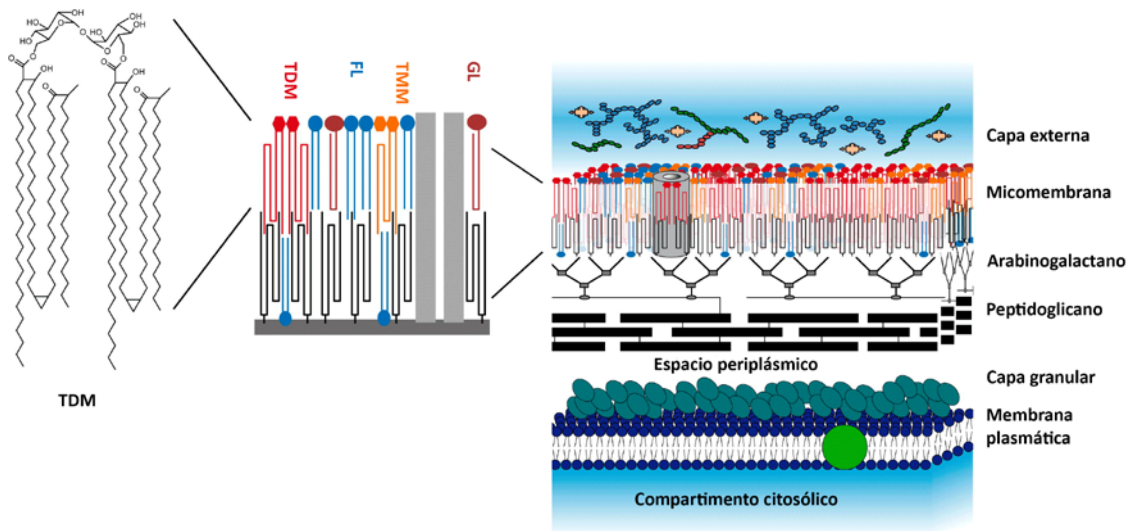


**Figura 1.** Imágenes de microscopía electrónica de algunas especies de micobacterias ambientales, como *M. gilvum* (A), *M. senegalense* (B), *M. conceptionense* (C), *M. rhodesiae* (D), *M. thermoresistibile* (E), *M. chelonae* (F), *M. smegmatis* (G), *M. abscessus* subsp. *abscessus* (H), y *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (I). Extraída de Lamrabet y Drancourt, 2013.

La pared celular de la micobacteria le proporciona la propiedad característica de resistencia a la decoloración en las tinciones de AAR. La AAR es la capacidad de formar complejos ácido-estables con colorantes arilmetánicos. Las micobacterias mantienen el primer colorante como carbolfucsina (tinción de Ziehl-Neelsen y Kinyoun) o fluorocromos (auramina-rodamina) al exponerlas a mezclas de alcohol ácido, hasta su visualización microscópica (De Naranjo *et al.*, 1988).

Las micobacterias presentan diferencias en la pared celular de las distintas especies, pero básicamente, se compone de un complejo constituido por peptidoglicano, que proporciona rigidez y forma a la bacteria, unido covalentemente a arabinogalactanos (AG) (Daffe *et al.*, 1990; McNeil *et al.*, 1990; Besra *et al.*, 1995; Brennan, 2003; Dover *et al.*, 2004) y ácidos micólicos (AM) (Hoffmann *et al.*, 2008), que son ácidos grasos de cadena larga (60-90 átomos de carbono), específicos de la envoltura celular de micobacterias, de gran importancia taxonómica y esenciales para la supervivencia de ciertos miembros del género *Mycobacterium*. Los glicolípidos presentes, que difieren de los habituales, incluyen fósforo-mio-inositolmanósidos (PIM), lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM) (Hill y Ballou, 1966; Hunter *et al.*, 1986; Besra *et al.*, 1997; Briken *et al.*, 2004). La cara interna de la micomembrana, o membrana externa, está compuesta por lípidos libres que incluyen trehalosa dimicolato (TDM), trehalosa monomicolato (TMM), varios glicolípidos (GL) y fosfolípidos (PL). La capa granular que se encuentra por encima de la membrana plasmática está compuesta por proteínas que pueden precipitar en tratamientos de bacterias, antes de la observación por microscopía electrónica de transmisión, y producir una apariencia más

gruesa a la cara externa de la membrana plasmática (Marrakchi *et al.*, 2014). En la Figura 2 se representa un modelo actual de la pared celular micobacteriana.



**Figura 2.** Modelo de pared celular micobacteriana. La capa externa se compone principalmente de glucano, proteínas y lípidos. La membrana externa o micomembrana está formada por una disposición en paralelo de las cadenas de ácidos micólicos (AMs, en negro) vinculados a arabinogalactano, que a su vez está unido covalentemente al peptidoglicano (PG); la cara interna de la micomembrana está compuesta de lípidos libres que incluyen trehalosa dimicolato (TDM, marcado en rojo), trehalosa monomicolato (TMM, en naranja), varios glicolípidos (GL, en marrón) y fosfolípidos (PL, en azul). Extraído y traducido de Marrakchi *et al.*, 2014.

### 1.3 Aspectos fisiológicos y metabólicos

Las micobacterias son aerobios obligados en su gran mayoría, a pesar de que ciertas especies pueden tolerar bajos niveles de oxígeno. No son esporulados, aunque se ha evidenciado su formación en determinadas especies como *M. marinum* y *M. bovis* (Singh *et al.*, 2010) y pueden perdurar durante semanas o meses sobre cualquier superficie inanimada siempre que estén protegidas de la incidencia directa de la luz solar. Presentan resistencia a la desecación y la congelación pero la luz ultravioleta, la pasteurización y determinados productos, como el óxido de etileno, formaldehído, etanol (70 %), glutaraldehído (2 %), ácido peracético o peróxido de hidrógeno estabilizado, consiguen inactivarlas (Pfyffer, 2015).

El crecimiento lento, característico de gran parte de las micobacterias y determinante a nivel taxonómico, está relacionado con el carácter hidrofóbico de la superficie celular, ya que impermeabiliza fuertemente las células frente a los nutrientes, requiriendo de 4 a 48 h para duplicarse, tiempo que parece variar entre especies en base al porcentaje de lípidos. Cabe destacar que el tiempo de duplicación de las micobacterias permite diferenciar las especies de crecimiento lento de especies de crecimiento rápido (Griffith *et al.*, 2007). Adicionalmente, la tasa de síntesis proteica y el crecimiento celular se ven limitados por el escaso número de copias de operones de rRNA, que se estiman en una o dos como máximo (Falkinham, 2008).

En general, el metabolismo de las micobacterias presenta similitudes frente al de otras bacterias, requiriendo, fundamentalmente, una fuente de carbono (glicerol, acetato o piruvato) y nitrógeno (amonio o aminoácidos), así como determinadas sales minerales. Se consideran protótrofas para todos los aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas del complejo B. Tan solo algunas especies precisan de suplementos especiales. Por otro lado, el crecimiento de las micobacterias se ve estimulado por la presencia de CO<sub>2</sub> y ácidos grasos (Goodfellow *et al.*, 2012). Acostumbran a crecer mejor en medio líquido que en medios sólidos, lo que se traduce en una mayor rapidez en la obtención de resultados (Griffith *et al.*, 2007). Inusualmente, producen exoquelinas secretadas desde las células y exomicobactinas de la pared celular (Ratledge, 1984), dos sideróforos necesarios para la captación del hierro, característicos de especies saprófitas y patógenas, respectivamente (Chan, 2009).

La temperatura óptima de crecimiento general en las micobacterias suele ser de 28 a 37 °C aunque existen determinadas especies que precisan de temperaturas por encima (42-52 °C) o por debajo (22 °C) de este rango para obtener una mayor tasa de crecimiento (Pfyffer, 2015). En general, la temperatura óptima de crecimiento es útil para discriminar un número muy limitado de especies (Hall y Roberts, 2006).

#### 1.4 Reservorios principales

El reservorio principal de las micobacterias es el ambiente, donde se encuentran omnipresentes en el agua, suelo, aerosoles, polvo, vegetación, protozoos, animales y seres humanos (Carson *et al.*, 1978; Le Dantec *et al.*, 2002; Falkinham, 2003; Primm *et al.*, 2004). La mayoría se encuentran presentes en el suelo, pero también en lagos, ríos y corrientes. Se encuentran en el suelo de bosques de coníferas y pantanos donde tienen preferencia por crecer debido al pH ácido y la estimulación del crecimiento por los ácidos húmicos y fúlvicos (Falkinham, 2015). Entre los animales, se encuentran en algunos vertebrados de sangre fría como anfibios, serpientes y peces; mamíferos (simios, ganado bovino y porcino) y también en aves. Tanto en humanos como en animales pueden habitar en superficies y secreciones sin causar enfermedad (García *et al.*, 2005), y se han detectado en leche cruda y pasteurizada (Sgarioni *et al.*, 2014).

Las micobacterias ambientales están particularmente bien adaptadas a los entornos construidos por el hombre (Falkinham, 2015). Pueden estar presentes en entornos tanto naturales como artificiales, donde forman biopelículas que representan una fuente importante de micobacterias ambientales, responsables de ciertas patologías (Carson *et al.*, 1978; Leão *et al.*, 2005; Del Solar *et al.*, 2005; Al-Mahruqi *et al.*, 2009). Dada la resistencia de algunas especies a la temperatura, se encuentran presentes en tuberías de agua caliente de hospitales y “spas”, así como máquinas de hielo (Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009). A pesar de ser comunes en aguas superficiales, no son considerados organismos acuáticos (Collins *et al.*, 1984).

### 1.5 Diversidad de especies. Taxonomía y clasificación

La familia *Mycobacteriaceae* a la que pertenece el género *Mycobacterium* se clasifica dentro del suborden *Corynebacterineae*, y a su vez en el orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae*, clase *Actinobacteria* y división o filo "Actinobacteria" del dominio "Bacteria", según la *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* (<http://www.bacterio.net>; Parte, 2014). En la segunda edición del manual *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volumen V *The Actinobacteria* (Goodfellow *et al.*, 2012), se incluyen modificaciones relacionadas con esta clasificación, que podrían asignar la clase *Actinobacteria* al orden de los *Corynebacteriales*.

De acuerdo a la lista de nombres procariotas válidamente descritos (<http://www.bacterio.net>; Parte, 2014), actualmente se incluyen en el género *Mycobacterium* un total de 164 especies diferentes y 13 subespecies (actualizado el 20 de Junio de 2015). En los últimos 25 años, se ha incrementado el número de aislamientos de especies conocidas y la descripción de nuevas especies pero, sobre todo, en los últimos 10 años, este crecimiento ha sido exponencial gracias al desarrollo de nuevas técnicas de identificación (Mather *et al.*, 2014). En la Figura 3, se muestra el número de especies o subespecies descritas en función del año, desde el 1883 hasta el 2014.

Tradicionalmente, las micobacterias ambientales o atípicas se han clasificado en cuatro grupos de acuerdo al denominado, sistema de Runyon de 1959 (Gangadharam, 1980; Jarzembowski y Young, 2008). Esta clasificación, propuesta inicialmente por Timpe y Runyon, está actualmente vigente, principalmente debido a la concordancia generalizada con los modelos genotípicos. En ella, las diferentes especies se dividen en función de su velocidad de crecimiento, morfología de las colonias y producción de pigmento (Gangadharam, 1980; Del Solar *et al.*, 2005; Sivasankari *et al.*, 2006; Jarzembowski y Young, 2008; Piersimoni y Scarparo, 2008).

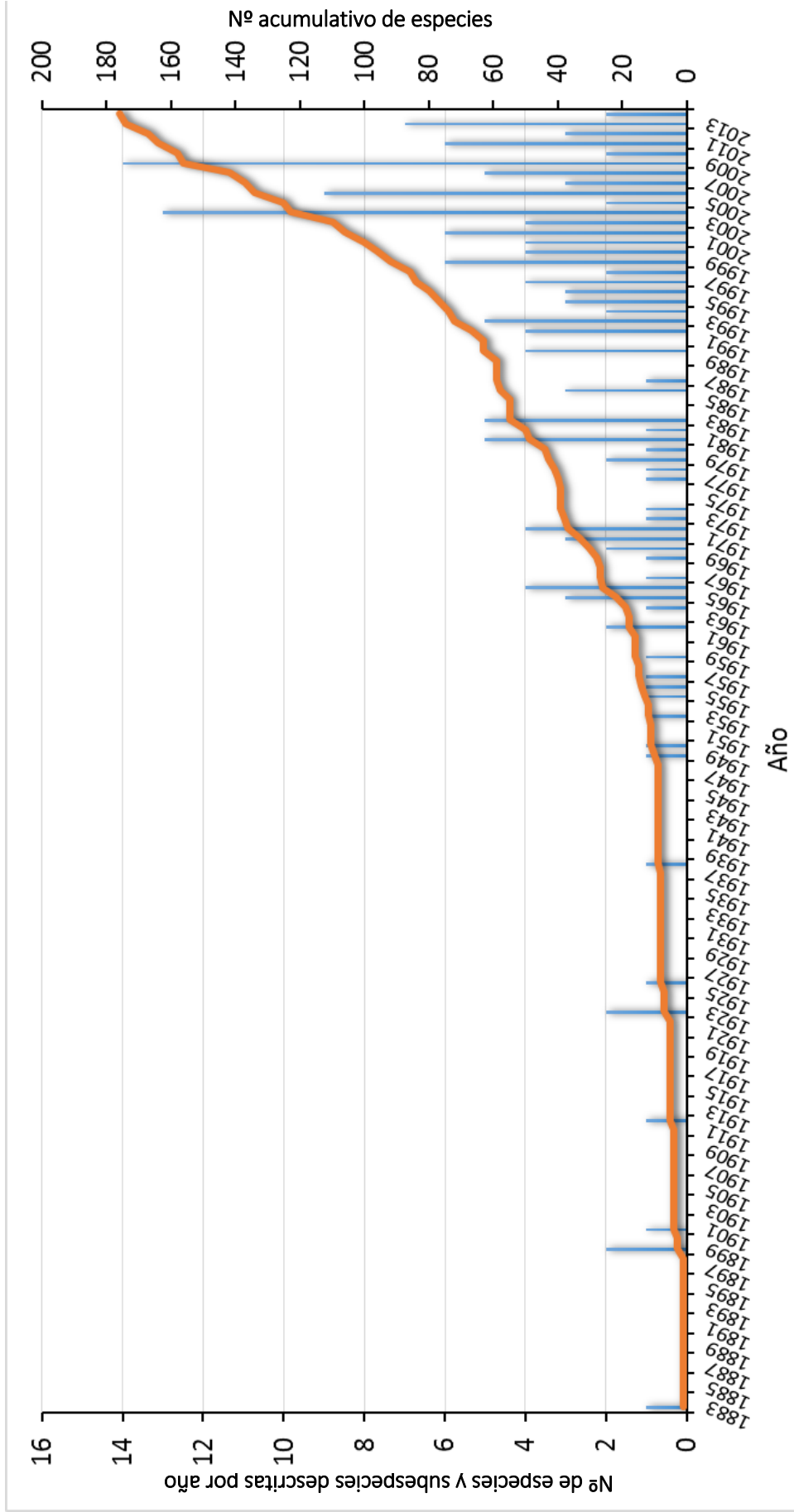
Según la velocidad de crecimiento, las micobacterias se subdividen en micobacterias de crecimiento rápido (MCR) y de crecimiento lento (MCL). Se considera que una micobacteria es de crecimiento lento cuando requiere más de siete días para producir colonias visibles en un medio sólido. En definitiva, según la clasificación de Runyon, los grupos I a III comprenden las micobacterias de crecimiento lento, mientras que el grupo IV, las de crecimiento rápido (Gangadharam, 1980; Adékambi y Drancourt, 2004; Jarzembowski y Young, 2008). A su vez, las MCL comprenden el grupo I de especies fotocromógenas (pigmento producido sólo en presencia de la luz), el grupo II de especies escotocromógenas (pigmento producido en la oscuridad) y el grupo III de especies no cromógenas (pigmento no producido) (Gangadharam 1980; Jarzembowski y Young, 2008).

Las investigaciones taxonómicas, posteriores a la clasificación tradicional, han sido más exigentes, debido a que los grupos de Runyon son muy heterogéneos, y los intentos por clasificar MCR y MCL, en base a las pruebas fenotípicas estándar, han reafirmado las limitaciones que ofrecían los grupos de Runyon (Goodfellow *et al.*, 2012).

Con la llegada de la técnica de secuenciación del gen que codifica para el rRNA 16S, ampliamente aceptado en la comunidad científica, se consiguió establecer una clasificación filogenética del género *Mycobacterium*. En la Figura 4 se muestra el árbol filogenético construido en base a las secuencias del gen rDNA 16S de las cepas tipo de las especies válidamente descritas, disponibles en la lista de Euzéby (<http://www.bacterio.net/>; Parte, 2014). En la Tabla 1 se listan los clados principales y las especies incluidas en cada uno de ellos, según el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Goodfellow *et al.*, 2012).

El hecho de que el gen del rRNA 16S fuera tan conservado, no permitía la discriminación a nivel de especie, siendo necesarios los métodos de hibridación DNA-DNA para obtener una asignación filogenética más precisa. Sin embargo, los estudios de hibridación DNA-DNA presentaban dificultades técnicas por lo que se empezaron a analizar otros genes esenciales, menos conservados que el gen del rRNA 16S como el gen *rpoB*, *recA*, *hsp65*, entre otros (Adékambi y Drancourt, 2004; Gomila *et al.*, 2007; Mignard y Flandrois, 2008). Cabe destacar que los enfoques filogenéticos, que se están adoptando para las especies de micobacterias, resultan cada vez más variados y ello dificulta su comparación, sobre todo en los casos donde se proporcionan datos fenotípicos inadecuados. La actualización de los estándares mínimos para la descripción de especies nuevas de MCL resulta necesaria, así como, la introducción de normas para el reconocimiento de especies de MCR (Goodfellow *et al.*, 2012).

Actualmente, la reconstrucción filogenética y la clasificación taxonómica dispone de una nueva herramienta, la genómica comparada, que busca encontrar relaciones entre genomas, a partir de los genomas secuenciados, y tiene el potencial de identificar componentes útiles para entender las relaciones bioquímicas, fisiológicas y patogénicas de los microorganismos. Uno de los principales objetivos en los análisis comparativos de los genomas secuenciados es identificar las secuencias que están conservadas entre las diferentes especies comparadas (Figura 5), contribuyendo a la identificación y clasificación filogenética de especies, al conocimiento de los mecanismos de evolución de las micobacterias y a la posible identificación de regiones únicas que puedan estar asociadas con diferencias fenotípicas (Chaves *et al.*, 2009).

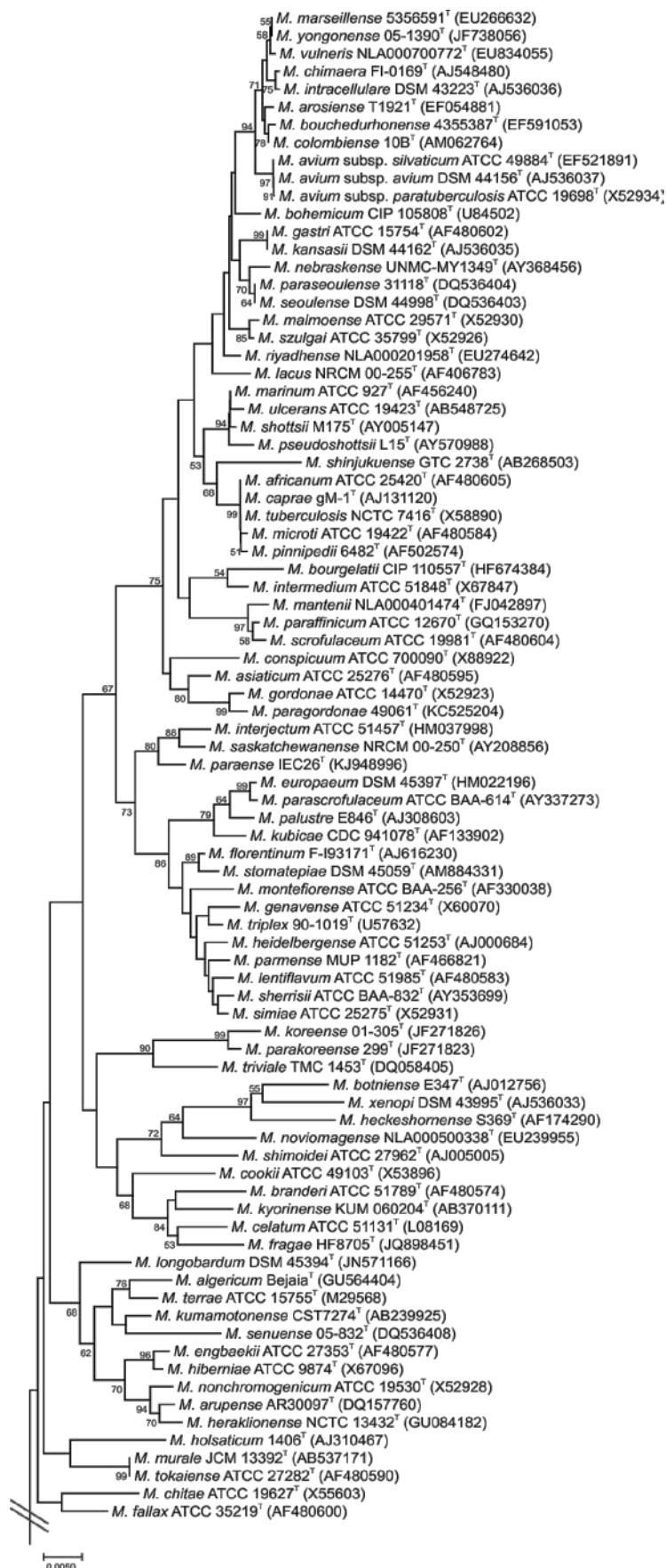


**Figura 3.** Gráfico ilustrativo del número de especies y subespecies del género *Mycobacterium* descritas en el período de tiempo comprendido entre 1883 y 2014 donde se aprecia el crecimiento exponencial que ha adquirido en los últimos 10 años, debido, principalmente, al desarrollo de nuevas técnicas de identificación. Datos extraídos en Junio de 2015 de la lista de Euzéby (<http://www.bacterio.net/>; Parte, 2014).

Tabla 1. Clados<sup>a</sup> de micobacterias de crecimiento lento (A) y rápido (B), y especies incluidas, según el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Goodfellow et al., 2012).

<b>A. Clados de micobacterias de crecimiento lento y especies incluidas</b>	
<b><i>M. tuberculosis</i></b>	<b><i>M. haemophilum</i></b>
<i>M. africanum</i>	<i>M. malmoense</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. bohemicum</i>
<i>M. caprae</i>	
<i>M. microti</i>	
<i>M. pinnipedii</i>	
<b><i>M. leprae</i></b>	<b><i>M. lepraemurium</i></b>
<b><i>M. interjectum</i></b>	<b><i>M. palustre</i></b>
<i>M. saskatchewanense</i>	<i>M. parascrofulaceum</i>
	<i>M. kubicae</i>
	<b><i>M. szulgai</i></b>
	<b><i>M. simiae</i></b>
	<i>M. florentinum</i>
	<i>M. heidelbergense</i>
	<i>M. triplex</i>
	<i>M. montefiorensis</i>
	<i>M. genavense</i>
	<i>M. parmense</i>
	<i>M. lentiflavum</i>
<b><i>M. lacus</i></b>	<b><i>M. intermedium</i></b>
	<b><i>M. cookii</i></b>
	<b><i>M. triviale</i></b>
	<b><i>M. tusciae</i></b>
	<b><i>M. shimoidae</i></b>
	<b><i>M. scrofulaceum</i></b>
	<b><i>M. xenopi</i></b>
	<i>M. heckeshornense</i>
	<i>M. botniense</i>
	<i>M. nonchromogenicum</i>
	<b><i>M. gordonae</i></b>
	<i>M. asiaticum</i>
	<i>M. marinum</i>
	<i>M. shottsii</i>
	<i>M. pseudoshottsii</i>
	<i>M. avium</i>
	<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
	<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>
	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
	<i>M. intracellulare</i>
	<i>M. chimera</i>
	<i>M. colombiense</i>
	<b><i>M. seoulense</i></b>
	<b><i>M. celatum</i></b>
	<i>M. branderi</i>
	<i>M. novocastrense</i>
	<i>M. duvalii</i>
	<b><i>M. flavescens</i></b>
	<b><i>M. agri</i></b>
	<i>M. thermoresistibile</i>
	<b><i>M. parafortuitum</i></b>
	<i>M. gilvum</i>
	<i>M. obuense</i>
	<b><i>M. fortuitum</i></b>
	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>
	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>
	<i>M. rhodesiae</i>
	<i>M. houstonense</i>
	<i>M. conceptionense</i>
	<i>M. senegalense</i>
	<i>M. farcinogenesisis</i>
	<i>M. septicum</i>
	<i>M. alvei</i>
	<i>M. porcinum</i>
	<i>M. boenickei</i>
	<i>M. neworleansense</i>
	<b><i>M. morioakaense</i></b>
	<b><i>M. madagascariense</i></b>
	<i>M. chlorophenolicum</i>
	<i>M. chubuense</i>
	<i>M. poriferae</i>
	<i>M. psychrotolerans</i>
	<b><i>M. sphagni</i></b>
	<i>M. monacense</i>
	<b><i>M. doricum</i></b>
	<i>M. vambaalenii</i>
	<i>M. vaccae</i>
	<i>M. aurum</i>
	<i>M. pyrenivorans</i>
	<b><i>M. peregrinum</i></b>
	<i>M. wollinskyi</i>
	<i>M. mageritense</i>
	<b><i>M. chelonae</i></b>
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> <sup>p</sup>
	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> <sup>b</sup>
	<i>M. immunogenum</i>
	<i>M. massiliense</i>
	<i>M. salmoniphilum</i>
	<b><i>M. hassiacum</i></b>
	<b><i>M. hodleri</i></b>
	<b><i>M. mucogenicum</i></b>
	<i>M. aubagnense</i>
	<i>M. phocaicum</i>
	<i>M. frederikbergense</i>
	<i>M. fluoranthenvivorans</i>
	<i>M. diernhoferi</i>
	<i>M. canariense</i>
	<i>M. cosmeticum</i>
	<b><i>M. gadium</i></b>

<sup>a</sup>El nombre del clado aparece marcado en negrita; <sup>b</sup>Las especies *M. bolletii* y *M. abscessus* han sido reclasificadas recientemente como *M. abscessus* subsp. *bolletii* y *M. abscessus* subsp. *abscessus*, respectivamente (Leão et al., 2011).



**Figura 4.** Árbol filogenético inferido a partir de las secuencias parciales del gen rDNA 16S del género *Mycobacterium* (1274 nucleótidos). La construcción del árbol filogenético se hizo en base al método de Neighbor-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el algoritmo de Jukes-Cantor. En los nodos se indican los porcentajes de valores de *bootstrap* superiores al 50 % de 1000 réplicas. La barra indica la divergencia de la secuencia. Se excluyen, por no alcanzar la longitud del análisis, las secuencias del gen rDNA 16S de las especies *M. bacteremicum*, *M. haemophilum*, *M. hippocampi*, *M. sphagni* y *M. timonense*.



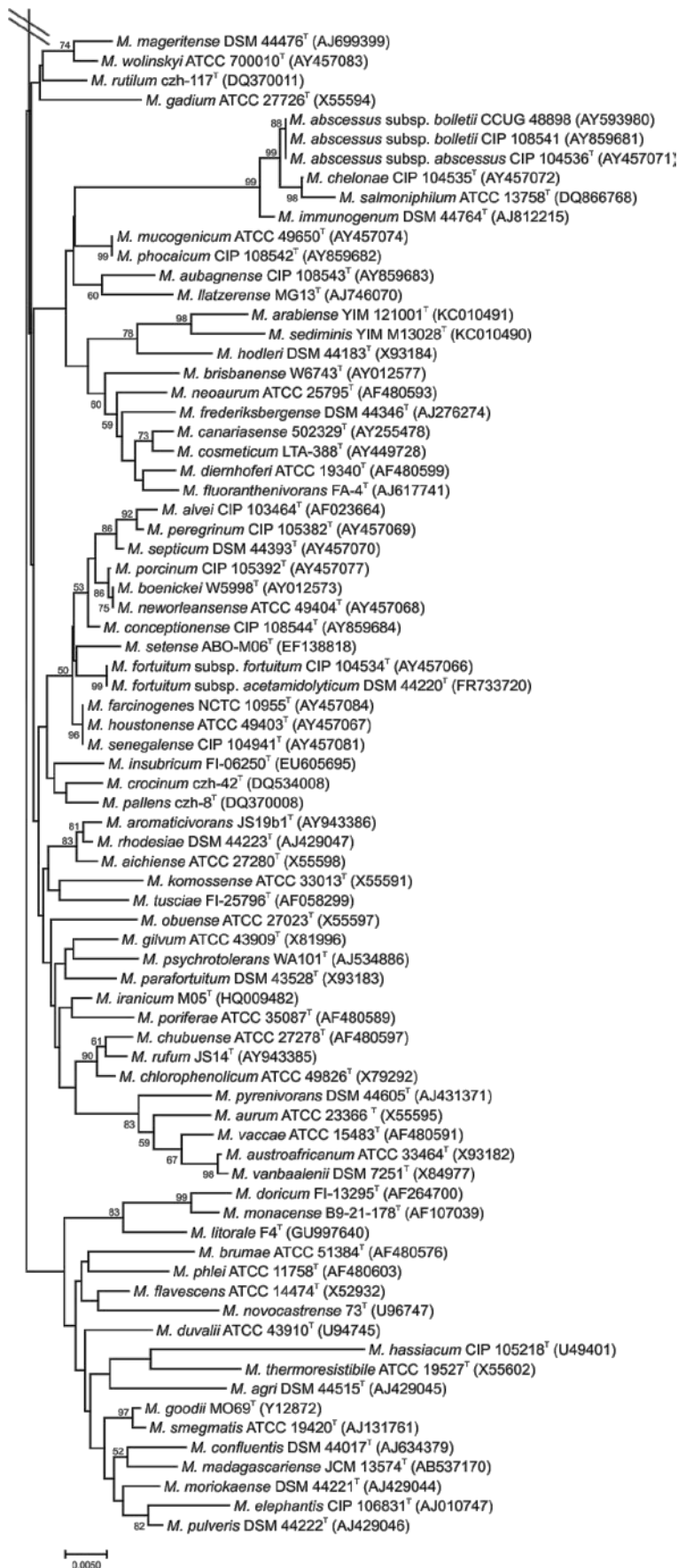
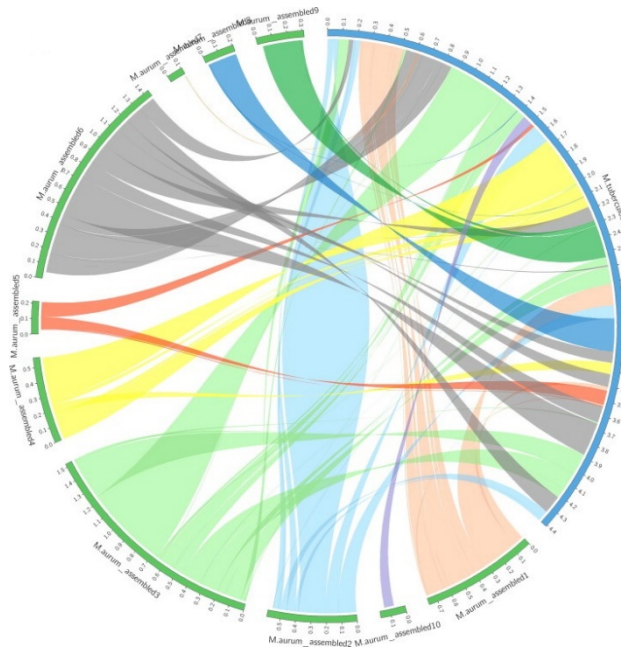


Figura 4. Continuación.



**Figura 5.** Homología entre genomas completos de *M. aurum* y *M. tuberculosis*. Extraído de Phelan *et al.*, 2015.

## 1.6 Vías de exposición e infección

Hoy en día, las micobacterias ambientales son reconocidas como verdaderos agentes patógenos, causantes de importantes infecciones (Jarzembowski y Young, 2008), con más de 50 especies asociadas a alguna enfermedad en humanos (Jordan *et al.*, 2007; Jarzembowski y Young, 2008; Wu *et al.*, 2009). Con pocas excepciones, las micobacterias son consideradas patógenos oportunistas (Falkinham, 2015).

Existe una gran variedad de situaciones en las que el hombre y la distribución de micobacterias ambientales pueden solaparse. Uno de los principales solapamientos se produce con el agua, en la bebida y el baño o la natación (Piersimoni y Scarparo, 2008).

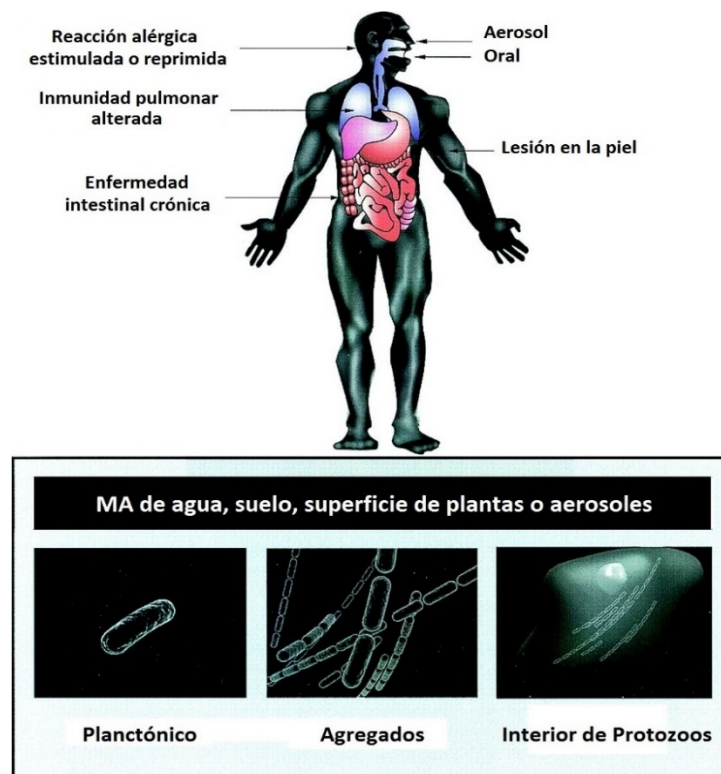
El hombre está en contacto regular con micobacterias ambientales a través de la inhalación e ingestión de partículas del medio ambiente, agua o alimentos contaminados. En consecuencia, el asentamiento temporal o permanente de nuestro tracto respiratorio o digestivo por estos organismos es muy común y se pueden encontrar también en la piel (Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009).

Las vías de infección de las micobacterias ambientales no están claras, pero se sospecha que podrían ser inhalación de agua, partículas o aerosoles, o la inoculación directa en el caso de la piel, a través de la ingestión, también se puede producir diseminación hematológica a partir del foco visceral, los alimentos para animales y aguas potables para los seres humanos (Figura 6) (Le Dantec *et al.*, 2002; Falkinham, 2003; Bartralot *et al.*, 2005; Hussein *et al.*, 2009). Las micobacterias son relativamente resistentes al pH del estómago (Falkinham, 2015). Existen

informes de infecciones causadas por equipos hospitalarios con una desinfección inadecuada (Saiman, 2004; Vijayaraghavan *et al.*, 2006). En cuanto al mecanismo de transmisión, hay poca evidencia de la posibilidad de transmisión directa de persona a persona mediante aerosol (Gangadharam, 1980; Le Dantec *et al.*, 2002) y no se han descrito casos de contagio interhumano.

Se han detectado cepas de varias especies recuperadas a partir de muestras ambientales (agua potable, polvo del suelo y aerosoles de la ducha), que eran idénticas a las aisladas de varios pacientes (Falkinham, 2015).

La fuente de infección de micobacterias ambientales, a través de sistemas de distribución de aguas potables, se ha determinado en casos de aguas hospitalarias con la especie *M. fortuitum* subsp. *paratuberculosis* (Jaubert *et al.*, 2015) por lo que la posibilidad inicial que se planteaba de considerar las micobacterias como fuente de infección se ha venido confirmando en los últimos años. Sin embargo, se requieren más datos sobre la eficacia de las medidas de control que podrían aplicarse para disminuir el riesgo potencial derivado (OMS, 2006).



**Figura 6.** Complejidad de las interacciones entre humanos y micobacterias. Dependiendo del estado de las micobacterias ambientales (MA) (panel inferior), la inmunocompetencia de los humanos, la vía de entrada de las micobacterias (lado derecho del panel superior), el número, el tipo de especie y la virulencia de la misma, además de otros factores; la interacción entre humanos y micobacterias puede dar lugar a diferentes efectos en los seres humanos (panel superior, lado izquierdo). Extraído y traducido de Primm *et al.*, 2004.

### 1.7 Aspectos epidemiológicos

Las enfermedades producidas por micobacterias ambientales no son de declaración obligatoria, por lo que los datos sobre su incidencia o prevalencia sólo pueden considerarse como aproximados y, en muchas ocasiones, lejos de la realidad y estrechamente ligados a las posibilidades de aislamiento e identificación de los laboratorios locales. En cualquier caso, siempre se ha aceptado que existe una gran variabilidad geográfica, tanto en la prevalencia de la enfermedad como de las especies responsables de la misma (Medina *et al.*, 1999).

La mayoría de las infecciones clínicas (> 90 %) se encuentran relacionadas con micobacterias ambientales de crecimiento rápido (Saldías *et al.*, 2013). Las formas clínicas de presentación más habitualmente descritas han sido la pulmonar, linfadenitis, abscesos de piel y partes blandas y osteomielitis, siendo los agentes más frecuentemente involucrados *M. avium complex*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. scrofulaceum* (Wolinsky, 1992).

En una gran mayoría de los países desarrollados se ha descrito un aumento importante en la incidencia de micobacteriosis por micobacterias ambientales (Yates *et al.*, 1997; Wickman, 1986) incluso en niños (Fergie *et al.*, 1997), que se ha relacionado con diferentes factores, como el incremento en la prevalencia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la mejora de las técnicas de diagnóstico, la naturaleza de los microorganismos, el aumento del reconocimiento clínico de la enfermedad y de su descripción en pacientes inmunocomprometidos y, sobre todo, por el aumento de afectados por el SIDA (Medina *et al.*, 1999) y al uso de fármacos inmunosupresores.

La prevalencia parece aumentar a nivel global, atribuyéndose 1,78 casos/100.000 habitantes, mientras que es notable una disminución de la prevalencia de tuberculosis (Bartralot *et al.*, 2005). En España, donde la incidencia y prevalencia de tuberculosis es más elevada que en otros países desarrollados, la incidencia de infecciones por micobacterias ambientales representa un 0,64-2,29 % de todas las infecciones por micobacterias (Martín *et al.*, 1985; Esteban *et al.*, 1992).

### 1.8 Métodos de detección e identificación

Los métodos utilizados para la detección e identificación de micobacterias ambientales abarcan una extensa variedad de métodos dependientes e independientes de cultivo entre los que existe, además, toda una serie de sistemas comerciales que responden a la necesidad de los laboratorios clínicos de disminuir el tiempo en la obtención de resultados para poder aplicar el tratamiento adecuado en el menor tiempo posible.

La identificación tradicional de las micobacterias se basa en el análisis de ciertas características fenotípicas (biológicas y bioquímicas) que incluyen una descontaminación previa de la muestra y el aislamiento por cultivo, resultando ser muy lento (Richardson *et al.*, 2009). Se

incluyen también las tinciones específicas de micobacterias para el análisis por microscopía óptica.

En cuanto a los principales métodos actuales, destacan las técnicas moleculares, tales como la secuenciación de genes específicos y universales, el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) o la hibridación en fase sólida, que precisan de una amplificación previa (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR), las técnicas de cromatografía típicas y, en los últimos tiempos, la técnica basada en espectrometría de masas, denominada MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight Mass Spectrometry*).

### 1.8.1 Métodos clásicos o tradicionales

Los métodos clásicos, entre los que se incluye el análisis de la velocidad de crecimiento, la producción de pigmento, la actividad de ciertas enzimas y/o la utilización de algunos sustratos, requieren de varias semanas y no posibilita, en muchos casos, la diferenciación de especies relacionadas (Godoy *et al.*, 2008).

Las identificaciones realizadas a través de métodos convencionales se consideran procesos difíciles, laboriosos, lentos, en ocasiones complejos, que pueden proporcionar ambigüedades o incluso resultados erróneos, y baja reproducibilidad (Kirschner *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 2000; Kellogg *et al.*, 2001; Deepa *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005; Griffith *et al.*, 2007; Yam *et al.*, 2006), debido a que diferentes especies pueden tener perfiles morfológicos y bioquímicos indistinguibles. Esto se da, especialmente, en determinadas especies descritas en los últimos 10 años, para las cuales los patrones fenotípicos característicos son ausentes o bien desconocidos (Yam *et al.*, 2006).

El aislamiento de micobacterias ambientales a partir de muestras clínicas y ambientales requiere el uso de métodos de descontaminación y de medios selectivos debido al sobrecrecimiento por bacterias y hongos presentes en las muestras, capaces de crecer a una mayor velocidad pudiendo, por lo tanto, inhibir el desarrollo de las mismas en los medios de cultivo (Du Moulin y Stottmeier, 1978; Hirsch y Christensen, 1983; Livanainen *et al.*, 1997).

#### 1.8.1.1 Descontaminación previa de la muestra

Los procedimientos para la descontaminación de muestras ambientales en la detección de micobacterias derivan de los procedimientos utilizados en el diagnóstico de la tuberculosis a partir de muestras clínicas, como esputo y biopsias (Du Moulin y Stottmeier, 1978; Songer *et al.*, 1980). Los métodos más comunes utilizan agentes químicos como ácidos, bases fuertes y compuestos de amonio cuaternario (Cortesia *et al.*, 2010).

Uno de los procedimientos de descontaminación más utilizados es el tratamiento con hidróxido de sodio (NaOH), debido al gran poder alcalino y descontaminante que posee. El

método del NaOH ha sido empleado a concentraciones entre 2 y 4 % (Rhines, 1935; Bullin *et al.*, 1970; McSwiggan y Collins, 1974) e inclusive en combinación con otros compuestos, como cloruros y alcoholes ácidos, obteniendo en casi todos los casos bajo rendimiento en la recuperación de micobacterias ambientales (Songer *et al.*, 1980). Es un agente que posee una acción bactericida frente a bacterias Gram negativas y virus con envoltura, mientras que no afecta a especies de *Mycobacterium* en unas condiciones controladas.

El uso de métodos de descontaminación de muestras ambientales permite el aislamiento de micobacterias a partir de las mismas. No obstante, el método seleccionado debe cumplir con los principios fundamentales de eliminar efectivamente a las otras bacterias y hongos también presentes en las muestras ambientales y a la vez no afectar la viabilidad de las micobacterias presentes en las muestras. Ello depende de factores como la concentración o el tiempo de exposición del tratamiento seleccionado (Brooks *et al.*, 1984; Jaramillo y McCarthy, 1986).

Otros métodos empleados en la descontaminación son los métodos del ácido oxálico 5 % ( $C_2H_2O_4$ ) (Songer *et al.*, 1980) y ácido sulfúrico 3 y 5M ( $H_2SO_4$ ) (Goslee y Wolinsky, 1976; Caroli *et al.*, 1965). El mecanismo de acción de estos agentes se fundamenta en la desnaturalización, o al menos, inhibición de la actividad de enzimas y moléculas lábiles a los ácidos, como el adenosín trifosfato (ATP), presente en las membranas de las bacterias. El verde malaquita también ha sido usado como agente químico descontaminante a una concentración de 0,2 % (Hedgecock y Faucher, 1961).

Los compuestos de amonio cuaternario (QACs) han sido utilizados desde 1950 para una gran variedad de propósitos clínicos, como la desinfección de salas preoperatorias, en heridas tisulares y en aplicaciones sobre mucosas debido a su excelente propiedad antimicrobiana (Russell, 2002). El cloruro de cetil piridinio (CPC) ha sido utilizado como agente químico descontaminante de organismos no ácido resistentes presentes en muestras de esputo (Smithwick *et al.*, 1975; Phillips y Kaplan, 1976; Du Moulin y Stottmeier, 1978).

Determinados estudios concluyen que los medios más adecuados para el cultivo de micobacterias ambientales, aisladas de muestras ambientales, son aquellos cuyo rango de pH oscila entre 5,5 y 6,5 (Livanainen *et al.*, 1997).

#### 1.8.1.2 Aislamiento por cultivo

Los medios más utilizados para el cultivo de micobacterias, son medios ricos elaborados a base de huevo como son los medios Lowenstein Jensen (LJ), Ogawa Kudoh (PK) y Stonebrik, los cuales están constituidos generalmente por una fuente de carbono (glicerol o piruvato), una fuente de nitrógeno (asparagina), sales minerales (citrato de sodio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio) y una solución de verde malaquita que permite la inhibición de bacterias y hongos. Este tipo de medio requiere de procesos de coagulación y tienen como ventaja que pueden resistir largos períodos de desecación así como neutralizar sustancias empleadas como agentes descontaminantes como NaOH y QACs. La desventaja que presentan es que no

pueden ser suplementados con antibióticos debido a que la concentración de éstos sufre modificaciones durante la coagulación de los medios (Kleeberg y Nel, 1973).

Dado que la mayoría de micobacterias ambientales pueden crecer a bajos niveles de sales minerales, se han desarrollado otros tipos de medios con agar como base. Entre estos medios se encuentran los de Middlebrook 7H9, 7H10 y 7H11 suplementados con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC), así como el medio Tripticasa de Soya. La ventaja de estos medios es la fácil elaboración y la posibilidad de suplementarse con antibióticos y fungicidas, pero a la vez son susceptibles a la desecación (Falkinham, 2010).

### 1.8.1.3 Identificación por características morfológicas y fisiológicas

Una vez obtenido el cultivo, la identificación de un aislamiento se puede llevar a cabo típicamente a través de sus características morfológicas y pigmentación de colonias, la temperatura y la velocidad de crecimiento (Kahana *et al.*, 1975; Barreto y Campos, 2000; Kellogg *et al.*, 2001; Deepa *et al.*, 2005; Yam *et al.*, 2006). Debido a la baja velocidad de crecimiento de las micobacterias, los procesos de aislamiento y la identificación pueden alcanzar varias semanas (Soini y Musser, 2001).

A pesar de que muchas pruebas tradicionales para la identificación de micobacterias ya no se usan en laboratorios de rutina, las tasas de crecimiento y la pigmentación son todavía muy útiles para una clasificación preliminar y pueden ayudar a la orientación y selección de procedimientos adecuados para su identificación (Kellogg *et al.*, 2001; Deepa *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005, Griffith *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso exclusivo de los métodos convencionales no permite la identificación de muchas especies descritas recientemente (Lee *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Griffith *et al.*, 2007).

### 1.8.1.4 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se han utilizado tradicionalmente para determinar las características fenotípicas de algunas especies de micobacterias más comunes (Jarzembowski y Young, 2008). Las más significativas son la reducción de nitratos, la producción de catalasa, catalasa inactivación a 68, hidrólisis del *Tween* 80, reducción de telurito de potasio, la tolerancia a cloruro sódico 5 % (NaCl), la captación de hierro, aril sulfatasa y la producción de ureasa (Jarzembowski y Young, 2008).

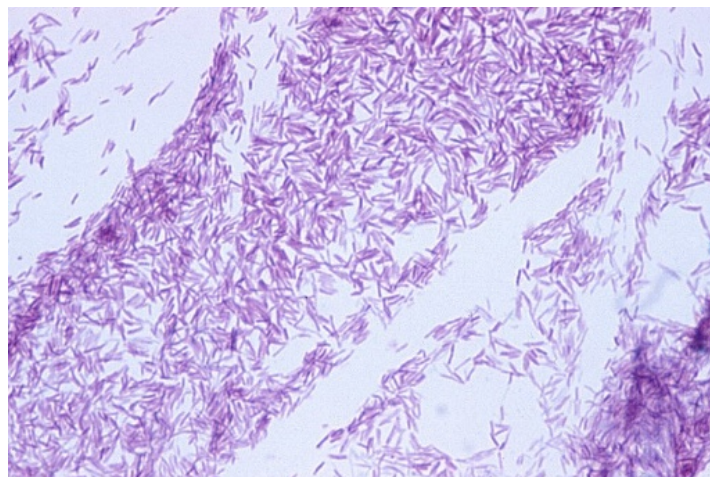
Las pruebas bioquímicas no son del todo reproducibles, ya que la expresión de un fenotipo determinado depende de las condiciones ambientales y por lo tanto, presenta una marcada variabilidad. Así, la metodología puede presentar diferentes resultados al modificarse factores tales como la preparación de los medios y reactivos, la cantidad y tiempo de crecimiento de la cepa a identificar, e incluso el observador, ya que se requiere de un ojo entrenado y un cierto grado de subjetividad. Todo ello dificulta notablemente la interpretación de los resultados obtenidos a través de este método (Godoy *et al.*, 2008).

### 1.8.1.5 Tinciones

El examen microscópico es un procedimiento rápido, económico y fácil de realizar que ofrece información relevante preliminar sobre la posible presencia de micobacterias, aunque no es útil para identificar micobacterias a nivel de especie (Hashimoto *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2012).

En la actualidad se siguen utilizando dos técnicas específicas para la detección de micobacterias, la clásica de Ziehl-Neelsen y la variante de tinción de fluorocromos. Las dos técnicas, si se manejan correctamente, son bastante equivalentes en cuanto al rendimiento (Kivihya-Ndugga *et al.*, 2003).

Dado que las micobacterias presentan un alto contenido de lípidos en la pared celular, particularmente de ácidos micólicos, poseen la propiedad de AAR, base de la tinción diferencial de Ziehl-Neelsen, en la que esta propiedad les permite captar en su pared, fucsina fenicada calentada y retenerla tras la acción de un decolorante alcohol ácido. Posteriormente, para que puedan contrastar se utiliza una coloración de contraste (azul de metileno), que tiñe el resto de la preparación. En el análisis microscópico, los bacilos de las micobacterias aparecen coloreados de fucsia y el resto aparecen de color azul (Liu *et al.*, 1999). El problema que se presenta es que no todas las estructuras alcohol ácido resistentes son micobacterias. Existen otros microorganismos que pueden presentar grados diferentes de alcohol ácido resistencia, como son especies de *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella* (*L. micdadei*), y los ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora* (López *et al.*, 2012). En la Figura 7 se muestra un ejemplo de la observación de la tinción Ziehl-Neelsen al microscopio óptico.



**Figura 7.** Fotografía de microscopía óptica de una muestra de *Mycobacterium chelonae* sometida a tinción Ziehl-Neelsen. Extraída de [http://www.gefor.4t.com/favorite\\_links.html](http://www.gefor.4t.com/favorite_links.html).

En el caso de las tinciones con fluorocromos (auramina y rodamina), éstos tienen la propiedad de fijarse a las paredes celulares de las micobacterias. Se utiliza además, un colorante de contraste que tiene como función evitar la fluorescencia inespecífica. El resultado se analiza



por microscopía de fluorescencia y se observa que las bacterias alcohol ácido resistentes aparecen de color amarillo-naranja brillante sobre un fondo verdusco (López *et al.*, 2012).

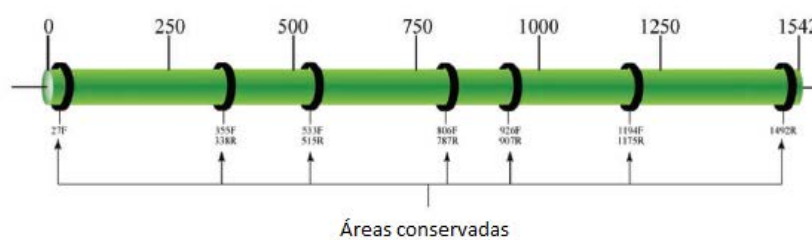
## 1.8.2 Métodos actuales

### 1.8.2.1 Secuenciación

El método de la secuenciación de ácidos nucleicos es considerado un método muy válido para la identificación de las micobacterias (Soini y Musser, 2001; Mijs *et al.*, 2002; Gitti *et al.*, 2006; Katoch *et al.*, 2007; Neonakis *et al.*, 2008). Este método implica una amplificación previa y permite la detección directa de las especies micobacterias que no crecen en medios de cultivo convencionales y también de diversas especies no conocidas (Soini y Musser, 2001). Resulta algo costoso y requiere de técnicos y equipos especializados, o en su defecto, recurrir a empresas especializadas. Diferentes autores han descrito distintos genes para llevar a cabo la afiliación de las cepas a la correspondiente especie del género *Mycobacterium*. A continuación, se describen los genes más utilizados con fines de identificación y afiliación filogenética.

#### Gen del rRNA 16S

En la década de 1980, investigadores demostraron que la relación filogenética puede ser comparada a través de un código genético estable. El código genético candidato de las bacterias es el gen que codifica el rRNA 16S (Shafipour *et al.*, 2014), presente en todas las especies bacterianas donde, además de contener regiones conservadas y variables, las mutaciones se producen a un ritmo lento y constante, por lo que es un objetivo ideal para la caracterización taxonómica (Ninet *et al.*, 1996; Soini y Musser, 2001) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema general del gen que codifica para el rRNA 16S (1.500 pares de bases, aproximadamente), que se encuentra en la subunidad ribosómica pequeña (30S). Los círculos representan regiones conservadas que sirven de dianas para la amplificación por PCR y secuenciación del DNA. Extraído de Petti, 2007.

Estudios filogenéticos y taxonómicos de diferentes especies de micobacterias se han realizado durante muchos años sobre la base del análisis de secuencias del gen del rRNA 16S (Adékambi y Drancourt, 2004), gracias al cual se han identificado y descrito nuevas especies (Lee *et al.* 2003; Ninet *et al.*, 1996; Katoch *et al.*, 2007.). Existen dos regiones hipervariables en el gen

rDNA 16S de micobacterias; la región A (nucleótidos 123 a 273) y la región B (nucleótidos 430 a 500) (Leão *et al.*, 2005). Estas regiones hipervariables pueden ser útiles para la identificación de micobacterias y para determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de micobacterias (Dvorská *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Yam *et al.*, 2006).

El número de copias que codifican el gen del rRNA 16S varía según las especies de micobacterias, y se ha demostrado que las especies de crecimiento rápido por lo general tienen dos copias, con excepción de *M. chelonae* y *M. abscessus*, mientras que las MCL poseen solo una copia, excepto *M. terrae* (Ninet *et al.*, 1996; Reischl *et al.*, 1998). Las copias del gen del rRNA 16S son muy similares y presentan pequeñas variaciones (Ninet *et al.*, 1996; Reischl *et al.*, 1998).

Una desventaja en el uso de la secuenciación del gen del rRNA 16S para la identificación de micobacterias se relaciona con la presencia de secuencias idénticas o muy similares, lo que limita su uso para la diferenciación e identificación de micobacterias (Mohamed *et al.*, 2005). Esto sucede en la identificación de especies estrechamente relacionadas, como *M. kansasii* y *M. gastri*, que poseen secuencias idénticas del gen del rRNA 16S (Dvorská *et al.*, 2001).

#### Internal transcribed spacer (ITS)

La secuenciación de la región espaciadora intergénica (*Internal transcribed spacer*, ITS) es una alternativa a la secuenciación del gen del rRNA 16S para la diferenciación de especies estrechamente relacionadas (Dvorská *et al.*, 2001). En comparación con la secuenciación del gen del rRNA 16S, la región ITS, resulta ser más eficaz para la identificación de determinadas cepas de micobacterias (Kuyper *et al.*, 2004), en particular, para diferenciar las MCL, que son idénticas o muy próximas para este gen (Roth *et al.*, 2000b; Dvorská *et al.*, 2001; Neonakis *et al.*, 2008). Así, en algunos casos, el alto grado de variabilidad de la región ITS permite la identificación de especies estrechamente relacionadas, como *M. kansasii* y *M. gastri*.

#### Gen *gyrB*

El gen *gyrB* codifica para la subunidad  $\beta$  de la DNA girasa o topoisomerasa II, implicado en la replicación del DNA bacteriano. La DNA girasa cataliza la interconversión de los isómeros topológicos del DNA e interviene en el proceso de transcripción del DNA a través de su actividad de superenrollamiento, durante el que la subunidad  $\beta$  suministra la energía necesaria para la acción catalítica de la subunidad  $\alpha$  mediante la hidrólisis de ATP (Olmos *et al.*, 2010). La secuenciación de este gen permite la diferenciación de especies que poseen la secuencia del ITS idéntica y permite una buena diferenciación de las especies *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. avium* y *M. intracellulare* (Kasai *et al.*, 2000).

#### Gen *hsp65*

La secuenciación del gen del rRNA 16S y la región ITS no es suficientemente discriminante para distinguir algunas especies de micobacterias (Turenne *et al.*, 2006). Por lo tanto, el gen *hsp65*,

que codifica la proteína de choque térmico de 65 kDa, ha sido muy útil en el diagnóstico de micobacterias (McNabb *et al.*, 2004; Turenne *et al.*, 2006). Debido a la hipervariabilidad del gen *hsp65*, su análisis se ha convertido en un método de rutina y de estudios taxonómicos de identificación de micobacterias (Ringuet *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2001; McNabb *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2006; Turenne *et al.*, 2006; Pourahmad *et al.*, 2009).

#### Gen *recA*

La secuenciación del gen *recA* también se utiliza como una alternativa al análisis de la secuencia del gen del rRNA 16S para la diferenciación de micobacterias (Dvorská *et al.*, 2001). La proteína activadora *recA* codificada por este gen está presente en todas las bacterias debido a su papel relevante en la recombinación de DNA homóloga en la reparación del DNA y la inducción de la respuesta SOS o sistema de reparación de emergencia (Blackwood *et al.*, 2000; Dvorská *et al.*, 2001). La amplificación de los dos fragmentos, A y B, del gen *recA*, permite diferenciar *M. kansasii* y *M. gastri* (fragmento A), así como, *M. xenopi*, *M. asiaticum* y *M. shimoidei* (Fragmento B) (Dvorská *et al.*, 2001).

#### Gen *rpoB*

La secuenciación del gen *rpoB* (que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa bacteriana) es útil en la diferenciación entre micobacterias, permitiendo la distinción entre las MCL y MCR (Kim *et al.*, 1999; Dvorská *et al.*, 2001; Adékambi *et al.*, 2003). El polimorfismo del gen *rpoB* se utiliza como una alternativa para identificar y distinguir micobacterias por su secuencia (Dvorská *et al.*, 2001).

#### Gen *sodA*

La secuenciación del gen que codifica para el enzima superóxido dismutasa (*sodA*) también se utiliza para discriminar entre especies de micobacterias por presentar una elevada heterogeneidad entre éstas (Wayne y Kubica, 1984; Adékambi y Drancourt, 2004).

### **1.8.2.2 PCR-RFLP (*hsp65*)**

La técnica de PCR-RFLP está basada en la amplificación por PCR del gen *hsp65* y su posterior análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante dos enzimas de restricción (*BstEII* y *HaeIII*). Consigue una identificación rápida, precisa y económica de todas las cepas micobacterianas. Aunque existen otras técnicas similares, es la mejor desarrollada, con una aplicación práctica de indudable valor (Fernández de Vega, 2006).

### **1.8.2.3 Hibridación en fase sólida**

La hibridación en fase sólida es una técnica que se aplica en el ámbito clínico e implica una amplificación previa. Está basada en sondas cortas de DNA, específicas de la especie, y

presentadas en formatos más o menos convencionales (placas con micropocillos, tiras de nitrocelulosa, etc...) y otros de futura aplicación como son los microchips (APEX, Nanogen, Inc./ Becton Dickinson Mycrobiology Systems). En una sola prueba, se aplicaría el producto de amplificación sobre diversas sondas de los microorganismos más frecuentemente aislados (Fernández de Vega, 2006).

#### 1.8.2.4 Identificación cromatográfica

Una alternativa quimiotaxonómica es el análisis lipídico de estos microorganismos mediante diversos estudios cromatográficos: cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases/espectrometría de masas. El estudio de los ácidos micólicos mediante HPLC ha demostrado ser rápido, reproducible, específico de especie y de aplicación universal en la identificación micobacteriana. No obstante, al igual que el resto de técnicas cromatográficas, resulta complejo y requiere una infraestructura costosa y un gran entrenamiento (Fernández de Vega, 2006).

##### 1.8.2.4.1 Espectrometría de masas

En los últimos tiempos, la identificación bacteriana se está basando en la espectrometría de masas, específicamente en el MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight Mass Spectrometer*), un método rápido para la identificación de microorganismos mediante el perfil de expresión de proteínas, principalmente proteínas ribosómicas. Permite la identificación de una molécula mediante la medición de su masa en relación a su carga, así como de los fragmentos generados a partir de ella. El MALDI-TOF MS utiliza el cálculo del tiempo de migración (*time-of-flight*) de cada fragmento de una molécula, a través de un trayecto predeterminado, previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada. Este espectrómetro tiene la capacidad de medir macromoléculas de hasta 100.000 Da (dentro de los cuales se encuentran los péptidos y proteínas que forman parte de hongos y bacterias), permitiendo la identificación de estos microorganismos.

El MALDI-TOF MS resulta de gran utilidad en la identificación de micobacterias ya que éstas siempre han presentado dificultades en la identificación y un microorganismo analizado mediante esta técnica presentará siempre el mismo espectro de masas, aunque una de las desventajas que presenta es la necesidad de obtención de un buen extracto proteico para llevar a cabo el análisis (Aranda, 2014).

## 2 AGUAS POTABLES Y PURAS. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

### 2.1 Aguas potables

Las aguas potables, o aguas de consumo humano, vienen definidas en España por el Real Decreto 140/2003, que establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo

humano a nivel nacional. Según la citada normativa son consideradas aguas de consumo humano las siguientes:

- a) Todas aquellas aguas, ya sea en su estado original, ya sea después del tratamiento, utilizadas para beber, cocinar, preparar alimentos, higiene personal y para otros usos domésticos, sea cual fuere su origen e independientemente de que se suministren al consumidor a través de redes de distribución públicas o privadas de cisternas, de depósitos públicos o privados.
- b) Todas aquellas aguas utilizadas en la industria alimentaria para fines de fabricación, tratamiento, conservación o comercialización de productos o sustancias destinadas al consumo humano, así como a las utilizadas en la limpieza de las superficies, objetos y materiales que puedan estar en contacto con los alimentos.
- c) Todas aquellas aguas administradas para consumo humano como parte de una actividad comercial o pública, con independencia del volumen medio diario de agua suministrado.

La garantía de la inocuidad microbiana del abastecimiento de agua de consumo se basa en la aplicación, desde la cuenca de captación al consumidor, de barreras múltiples para evitar la contaminación del agua de consumo o para reducirla a niveles que no sean perjudiciales para la salud. La seguridad del agua se mejora mediante la implantación de barreras múltiples, como la protección de los recursos hídricos, la selección y aplicación correctas de una serie de operaciones de tratamiento, y la gestión de los sistemas de distribución (por tuberías o de otro tipo) para mantener y proteger la calidad del agua tratada (WHO/PAHO, 1987).

Las estaciones de tratamiento de agua potable (ETAPs) son las encargadas de tratar el agua captada para hacerla apta al consumo humano. Los diferentes tratamientos aplicados en las ETAPs permiten reducir la concentración y la diversidad microbiológica. Los procesos de floculación (que resultan en el aumento del peso de las partículas) y filtración (mediante la utilización de filtros de arena) no afectan significativamente a la carga bacteriana presente. Sin embargo, la utilización de desinfectantes tales como el cloro, las cloraminas y el ozono reducen significativamente la concentración y la diversidad de especies (Eichler *et al.*, 2006; Loret y Greub, 2010; Thomas *et al.*, 2011; Vaz-Moreira *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2013).

La protección de los sistemas de distribución del agua es la última barrera y una de las más importantes en la provisión de agua potable segura (LeChevallier *et al.*, 2004).

Existen diversos estudios acerca de la composición de la microbiota en el agua, pero en los últimos años, y gracias a la evolución de las técnicas moleculares, se han realizado estudios de las comunidades microbiológicas y la dinámica de éstas a lo largo de los sistemas de suministro de agua potable, incluyendo las principales etapas desde el punto de captación hasta el consumidor (Eichler *et al.*, 2006; Vaz-Moreira *et al.*, 2014). Las especies microbianas que componen cada comunidad son tan variables como los puntos de captación de agua, por tanto, cada sistema distribución tiene una composición propia, a pesar de que se han podido establecer ciertos patrones.

En términos generales, el agua dulce del punto de captación es la que presenta la mayor concentración y diversidad microbiológica. Los filos bacterianos más abundantes en este punto del sistema son las *Proteobacteria*, principalmente las *Alpha-* y *Betaproteobacteria*, y en menor proporción las *Gammaproteobacteria*, y las *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes* y *Bacteroidetes* (Eichler *et al.*, 2006; Vaz-Moreira *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2013).

Los diferentes tratamientos aplicados en las ETAPs se encargan de reducir tanto la concentración como la diversidad microbiológica. La influencia de los procesos de floculación y filtración, con filtros de arena, es relativamente baja en relación a las bacterias y las amebas de vida libre. La utilización de desinfectantes como el cloro, las cloraminas y el ozono reducen significativamente la concentración y la diversidad de especies (Eichler *et al.*, 2006; Loret y Greub, 2010; Thomas *et al.*, 2011; Vaz-Moreira *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2013).

Con el fin de mantener la calidad del agua, a lo largo de la red de distribución, se aplican tratamientos de desinfección secundaria que mantienen el nivel residual de desinfectantes, ejerciendo un efecto directo sobre los microorganismos presentes en el agua (Zeng *et al.*, 2013).

Estudios sobre recrecimiento de bacterias heterótrofas en redes de distribución, han permitido identificar los principales factores que lo promueven; la concentración del carbono orgánico disuelto biodegradable (BDOC); la concentración de cloro libre residual en la red de distribución; el tiempo de residencia del agua tratada en la red de distribución, desde que abandona la ETAP hasta el consumidor; la temperatura del agua; y las características del material que recubre el interior de los tubos o tuberías (Niquette *et al.*, 2001).

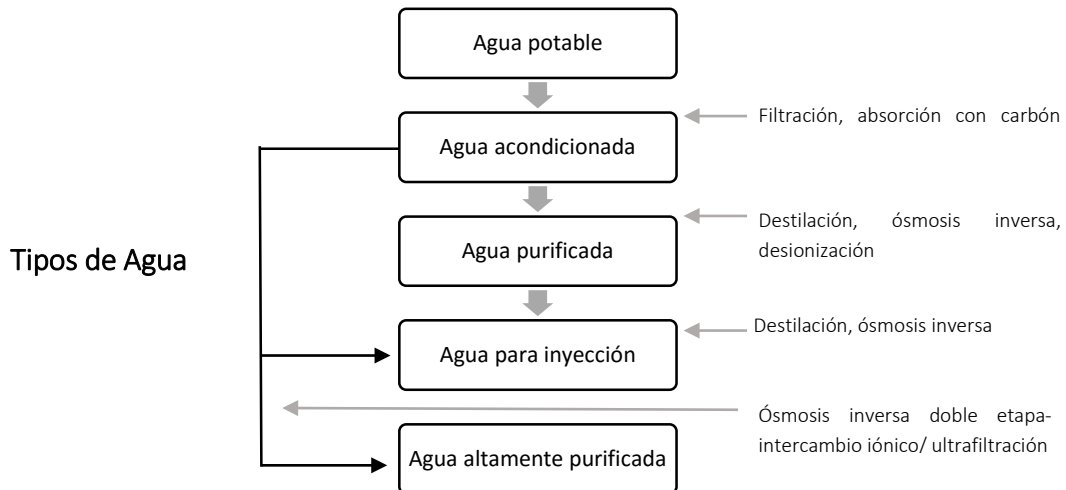
Los microorganismos patógenos o potencialmente patógenos presentes en el agua potable se introducen generalmente en los sistemas de distribución a través de la contaminación fecal de las fuentes de captación de agua. Sin embargo, en los sistemas de agua también están presentes microorganismos ambientales capaces de multiplicarse en el agua como pueden ser *Acanthamoeba* sp., *Burkholderia pseudomallei*, *Legionella* sp., *Mycobacterium* sp. y *Naegleria fowleri*.

Las rutas de transmisión de infecciones a través del agua potable pueden tener diversos orígenes y principalmente por inhalación de aerosoles generados a partir del agua contaminada. El contacto directo con la piel y mucosas puede acabar originando infecciones a nivel del tracto respiratorio o lesiones tanto en la piel como el cerebro (WHO, 2008).

## 2.2 Aguas puras

Las aguas puras son aguas purificadas a partir de las que cumplen con la normativa reguladora de aguas potables y no contienen sustancias agregadas. Se utilizan para la producción de preparaciones oficiales, tales como limpieza de ciertos equipos y en la preparación de determinados productos. El agua purificada debe cumplir los requerimientos de pureza tanto

inorgánica como orgánica y debe estar protegida de la proliferación bacteriana. Se purifica usando operaciones unitarias que incluyen desionización, destilación, intercambio iónico, ósmosis inversa, filtración u otros procedimientos adecuados (*United State Pharmacopea, USP*) (Figura 9).



**Figura 9.** Diagrama de preparación de los distintos tipos de agua según el uso. Modificado de Real Farmacopea Española (2005).

## 2.2.1 Aguas de hemodiálisis

### 2.2.1.1 Riesgos asociados

Los pacientes con insuficiencia renal crónica o aguda necesitan eliminar los productos de desecho, junto con el exceso de agua y sales minerales, acumulados en el organismo y que no son excretados. Por ello, son sometidos a un procedimiento terapéutico denominado hemodiálisis (HD). El tratamiento de HD consiste en el paso de la sangre del paciente a través de unos capilares finos dentro de la máquina de diálisis. Los capilares actúan como membrana semipermeable y se encuentran rodeados de líquido de diálisis (LD) formado por agua previamente tratada (pura) junto con electrolitos. Las sustancias de desecho presentes en la sangre del paciente pueden difundirse hacia el LD para ser eliminadas del organismo. Sin embargo, esta membrana semipermeable a su vez puede permitir el acceso de los contaminantes que puedan estar presentes en el LD en dirección a la sangre del paciente. Dado este riesgo, conseguir mantener el grado de pureza en el agua hasta el momento de su empleo (máquina de HD) es tan importante como contar con la mejor planta de tratamiento.

Una persona sana, aproximadamente, ingiere 2 L diarios de agua que son asimilados a través de la barrera intestinal altamente selectiva y con gran capacidad para defenderse de los posibles contaminantes bacterianos. En el caso de los pacientes con enfermedad renal, en tratamiento regular de HD, se someten a unas tres sesiones semanales, de tres a cuatro horas cada una, donde la sangre del paciente está potencialmente expuesta a unos 150 L de LD,

producido en línea a partir de agua purificada y del concentrado de diálisis. De esta manera, el paciente queda expuesto aproximadamente a 23.400 L por año (Nystrand, 2008).

La exigencia de la calidad del agua y del LD ha ido aumentando a lo largo de la historia de la HD. Al principio, se trataba de prevenir el síndrome de agua dura y las contaminaciones bacterianas (descalcificadores). El tipo de tratamiento de agua que debe utilizarse depende de la calidad del agua suministrada por la red municipal, de la cantidad de agua que es necesario tratar atendiendo al tamaño de la Unidad de HD y de la pureza que se quiere alcanzar.

El LD se fabrica en el momento y en la propia unidad de HD, sin posibilidad de controles de calidad previos a su utilización e indudablemente bajo la responsabilidad del personal médico (García, 2008). Por tanto, el análisis de la calidad microbiológica de las aguas de hemodiálisis es un componente principal en el control de la calidad y la seguridad de los pacientes de hemodiálisis. La exposición prolongada del paciente al agua que pudiera estar contaminada, en combinación con el hecho de que los pacientes en HD tienen un sistema inmunológico comprometido, acompañado frecuentemente de complejas enfermedades, los pone en mayor riesgo de sufrir una infección. Cuanto más tiempo se exponga el paciente a un fluido de diálisis potencialmente contaminado mayor es el riesgo de infección.

El control de la calidad microbiológica del agua en la HD depende del mantenimiento de todo el sistema de agua. Se ha demostrado que los problemas de contaminación microbiana de los sistemas de diálisis son el producto de muchos factores que incluyen sistemas de tratamiento insuficiente del agua y de los sistemas de distribución del dializado. A pesar del tratamiento del agua, la eliminación completa de microorganismos en las aguas de HD se considera prácticamente imposible (Kulakov *et al.*, 2002).

De manera general, los sistemas de distribución de aguas, tubos, tanques y grifos representan reservorios de microorganismos que contribuyen a la creación de biopelículas que, una vez formados, son extremadamente difíciles de erradicar mediante métodos químicos o mecánicos. De hecho, diversos estudios muestran cómo la presencia de biopelículas en tubos y tanques acarrea una alta resistencia a agentes químicos (Oie *et al.*, 2003; Cappelli *et al.*, 2006) y son una de las causas principales de la falta de efectividad en la eliminación completa de la comunidad microbiana, a través de las desinfecciones mensuales preventivas.

El agua obtenida en las etapas de purificación contiene niveles bajos de bacterias y de sustancias químicas pero permite el crecimiento de bacterias oligotróficas. Esto puede permitir la difusión de bacterias potencialmente patógenas y/o subproductos de estas bacterias a la sangre de los pacientes en tratamiento con HD, con sus consecuentes efectos perjudiciales (Gomila *et al.*, 2005, 2006).

Elevadas concentraciones de contaminación bacteriana en los fluidos de diálisis se asocian con una mayor incidencia de reacciones febriles. La evidencia epidemiológica ha mostrado un aumento del riesgo de reacciones pirogénicas y septicemia. Reacciones inflamatorias



subclínicas repetitivas en pacientes de HD se pueden atribuir a un dializado contaminado (Canaud *et al.*, 2000). Además accesos vasculares frecuentes y prolongados permiten la entrada de bacterias en el torrente sanguíneo del paciente en hemodiálisis.

### 2.2.1.2 Tratamiento del agua en unidades diálisis

El líquido de diálisis consta de una solución electrolítica preparada extemporáneamente por el monitor de hemodiálisis a partir de agua purificada y solutos proporcionados en forma de concentrados electrolíticos o sales no disueltas. La composición del LD así formado, es prácticamente isotónica y tiene una composición electrolítica similar al plasma.

El agua utilizada es potable y tratada, mezclada con una solución concentrada de electrolitos, equivalente a la concentración de electrolitos en el agua del plasma, un tampón y glucosa. Así, el agua potable empleada para el consumo humano no se considera válida para la fabricación de LD, sino que es imprescindible purificarla (Pérez *et al.*, 1999). A pesar de que el agua utilizada en la hemodiálisis no es estéril, los niveles de bacterias y productos derivados de bacterias deben ser lo suficientemente bajos. Las asociaciones renales españolas y europeas recomiendan valores por debajo de 100 ufc/ml.

El tratamiento adecuado del agua para HD incluye distintas etapas de preparación, pretratamiento, tratamiento y distribución.

La preparación del agua consiste en eliminar la mayoría de las partículas en suspensión mediante filtros, de 500 a 5 mm de diámetro de poro. Previamente a estos filtros, el depósito de grandes cantidades de agua puede actuar eliminando partículas por sedimentación. Posteriormente, se colocan filtros en serie, de mayor a menor porosidad. Estos filtros se renuevan periódicamente en función de su estado y si se produce una caída de presión.

El pretratamiento consigue la mayor eliminación posible de partículas, la desaparición de las cloraminas, y otra materia orgánica, y la disminución de la cantidad de cationes. Todo ello es fundamental para alcanzar el rendimiento óptimo del tratamiento y la adecuada conservación de las membranas de la ósmosis. Se consigue a través de un descalcificador doble, seguido de microfiltros que evitan la suelta de partículas desde las resinas de intercambio, y dos filtros de carbón activado, seguidos de microfiltros, necesarios para retener posibles partículas desprendidas del filtro de carbón.

En la fase tratamiento, el elemento clave es la ósmosis inversa, que debe presentar suficiente superficie para conseguir el caudal de agua tratada necesario sin recurrir a rendimientos excesivos. En este punto, debe mantenerse la presión adecuada del sistema que, en ningún caso, será superior a la especificada para el tipo de membranas utilizadas. Si se precisa agua ultrapura, resulta necesario colocar en serie un desionizador u otro sistema de ósmosis inversa. Actualmente, el estándar de calidad supone contar con dos ósmosis en serie (Pérez y Rodríguez, 2001).

## 2.3 Biopelículas

### 2.3.1 Concepto

En el siglo XVII, Van Leeuwenhoek, fue el primero en describir la presencia de microorganismos adheridos a superficies dentales, por lo que se le considera el descubridor de las biopelículas bacterianas (Donlan, 2002). Tres siglos después, tratando de encontrar una explicación a la resistencia bacteriana frente a los desinfectantes en sistemas de aguas industriales, se descubrió la existencia de comunidades bacterianas embebidas en matrices glicoproteicas desarrolladas en superficies en contacto con el agua, a las que denominaron biopelículas (Costerton *et al.*, 1978).

La presencia de bacterias en el agua de consumo no comporta directamente un riesgo para la salud. La presencia y sobre todo su concentración son considerados factores indicadores de la calidad del agua. Si no se aplican medidas para evitar los recrecimientos, las bacterias heterótrofas y microorganismos presentes en la red de distribución se acumulan en las tuberías en forma de biopelículas (*biofilms*).

Una biopelícula es una asociación compleja de microorganismos, constituida por una o varias especies, unidos a una superficie y embebidos en una matriz de polímeros extracelulares de origen microbiano (Stoodley *et al.*, 2002) que posee propiedades adhesivas y donde las células se multiplican (Donlan, 2002).

### 2.3.2 Características generales

Las biopelículas son complejas, multilaminares y constituyen auténticos ecosistemas gracias a la presencia de representantes de tres grupos funcionales: productores primarios (es decir, fotoautótrofos), consumidores y descomponedores. Los tapetes microbianos pueden considerarse ecosistemas en el sentido de que presentan un ciclo de materia casi cerrado, al menos en sentido vertical (eje Z), y una expansión superficial no limitada (ejes X, Y) (Guerrero *et al.*, 2002).

La adhesión de los microorganismos desencadena la expresión de compuestos que favorecen la activación de un gran número de genes. Fenotípicamente, estas células sésiles son distintas de cuando eran planctónicas. La formación de la biopelícula es un fenómeno de percepción de quórum (*quorum-sensing*) (Henke y Bassler, 2004b; Abraham, 2006). Durante este proceso, las bacterias pueden usar trazas de nutrientes orgánicos e inorgánicos, triplicarse para formar biopelículas y adherirse a las superficies, que incluyen tejido vivo, equipamiento hospitalario, tuberías de los sistemas de agua potable o agua industrial, filtros o en los sistemas acuáticos naturales (Donlan, 2002).

Generalmente, cada célula secreta pequeñas cantidades de una “molécula de comunicación” (p.ej. N-acil-homoserina lactona). Alcanzado un determinado nivel de densidad poblacional, la concentración de esta sustancia aumenta, con lo que se activan diferentes genes de cada

célula. Las bacterias en el interior de la biopelícula forman una comunidad funcional coordinada y se protegen de las variaciones bruscas de las condiciones ambientales o de un medio hostil mediante el mantenimiento de una “homeostasis primitiva” dentro de la matriz de exopolímeros (Paerl *et al.*, 2000; Des Marais, 2003; Hall-Stoodley y Stoodley, 2009). Estos polímeros retienen la humedad y los nutrientes, y permiten la formación de microambientes dentro de la matriz, que distribuyen los organismos en función de las condiciones abióticas óptimas o permisivas imperantes. La selección positiva de las biopelículas en los ecosistemas actuales se pone de manifiesto por el predominio de este modo de crecimiento de células “inmovilizadas” en una matriz de exopolisacárido en todos aquellos ecosistemas que lo permiten (Navarrete *et al.*, 2000; Abed y García-Pichel, 2001; Wieland *et al.*, 2003; Villanueva *et al.*, 2004).

Una vez adheridas, las bacterias se encierran en sí mismas en una matriz hidratada de polisacáridos y proteínas y forman una capa de biopelícula viscosa que, a su vez, se desprenden al madurar, pasando a ser planctónicas (McFeters *et al.*, 1993), potencialmente patógenas y pueden ser causa de liberación de endotoxinas, pequeños fragmentos de DNA bacteriano, esfingolípidos u oligonucleótidos. Una biopelícula establecida causa contaminación recurrente y es muy difícil de erradicar con los procedimientos de desinfección habituales (Cappelli *et al.*, 2006).

Las biopelículas continuamente liberan células de su superficie y, adicionalmente, se presenta un desprendimiento inducido por el esfuerzo cortante que genera el agua sobre su superficie. El desprendimiento aumenta con el incremento de la fuerza cortante y no solo influye la fuerza de cohesión de la biopelícula si no también la de adhesión (Stoodley *et al.*, 2001).

En la biopelícula puede haber dispersión por la emisión de las células hijas, producto de la actividad celular de crecimiento, por la migración debida a la limitación de nutrientes o por la competencia de espacio (Donlan, 2002). En el desprendimiento que se da en las biopelículas debido a las limitaciones o variaciones de los nutrientes, se relaciona la tasa de agotamiento de nutrientes con la tasa de desprendimiento de las células en las biopelículas (Sawyer y Hermanowicz, 1998).

Dentro de estas comunidades, se establecen diferentes interrelaciones que proporcionan a sus componentes mecanismos de resistencia frente a biocidas, por la protección física del acceso de los desinfectantes a través de la matriz extracelular (Stewart y Costerton, 2001) o por el nivel de actividad fisiológica y expresión génica individual de las células que comporta una diferente susceptibilidad frente a ciertos biocidas (Cochran *et al.*, 2000; Wimpenny *et al.*, 2000; Molin y Tolker-Nielsen, 2003; Schwartz *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004).

### 3 MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN AGUAS POTABLES Y PURAS

En los últimos años, diversos investigadores han demostrado la presencia de micobacterias en los sistemas de distribución de agua potable de todo el mundo (Vaerewijck *et al.*, 2005; Von Baum *et al.*, 2010; Thomson *et al.*, 2013; Briancesco *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2012;

Klanicova *et al.*, 2013; Genc *et al.*, 2013.; Crago *et al.*, 2014; Donohue *et al.*, 2015; Gómez-Álvarez *et al.*, 2015; Richards *et al.*, 2015), así como en ambientes hospitalarios (Zlojtro *et al.*, 2015). En algunos casos, se demuestra una relación directa entre infecciones por micobacterias ambientales y la presencia de estos patógenos en el agua potable (Nishiuchi *et al.*, 2007; Pierce, 2009; Von Baum *et al.*, 2010; Thomson *et al.*, 2013), también en aguas hospitalarias (Jaubert *et al.*, 2015). Por lo tanto, el agua potable puede considerarse como fuente potencial de exposición a micobacterias ambientales (Falkinham, 2011).

Del orden de 20 especies de micobacterias ambientales han sido aisladas de sistemas de agua potable (Tsitko *et al.*, 2006; Hussein *et al.*, 2009). También se han aislado varias especies de micobacterias en aguas hospitalarias (Jaubert *et al.*, 2015; Zlojtro *et al.*, 2015). Este predominio se explica por su capacidad innata de resistir a la mayoría de los procesos de potabilización (p. ej. cloro, ozono, filtración), observándose solo una reducción en el número de éstas, pero no su eliminación (Primm *et al.*, 2004) y su tolerancia a amplias variaciones de pH y temperatura, que permite la colonización, la supervivencia y el crecimiento en el agua del grifo (Le Dantec *et al.*, 2002; Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009). Por otro lado, el tratamiento de suministros de agua con cloro u ozono provoca un cambio en la población bacteriana, que favorece una prevalencia de micobacterias ambientales en el suministro de agua pública (Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009).

Las micobacterias en los sistemas de distribución de agua pueden ser originadas en la fuente, sea superficial o subterránea, o por contaminación en procesos de reparaciones o construcción de nuevas redes en el sistema de distribución. Los factores que contribuyen a la presencia y crecimiento de las micobacterias, en los sistemas de distribución de aguas potables en edificios y casas, incluyen la naturaleza cerúlea de la pared celular, la cual puede ayudar a estos organismos a resistir el cloro residual durante un tiempo prolongado (Chen *et al.*, 2012), el crecimiento a concentraciones bajas de carbono orgánico y la habilidad que presentan las micobacterias en metabolizar compuestos orgánicos complejos que no son metabolizados por otros microorganismos del agua potable. Se han registrado incrementos en las cantidades de estas bacterias en zonas finales de las tuberías de distribución, donde el cloro residual disminuye, y donde se incrementan las concentraciones totales de carbono orgánico, el cual sirve como suministro de nutrientes (Hall-Stoodley *et al.*, 1999).

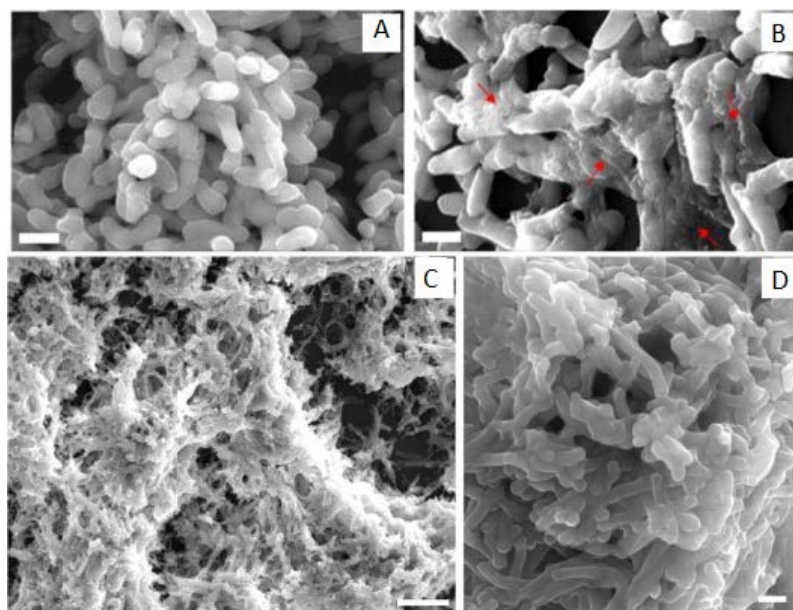
Otro factor de supervivencia de las micobacterias en sistemas de distribución de aguas potables es su asociación con las amebas de vida libre y otros protozoos. Las amebas no sólo pueden servir como reservorios, sino también como vehículos de transmisión. En estudios recientes se han relacionado aislados de amebas sobre todo con la especie *Mycobacterium llatzerense* (Delafont *et al.*, 2014).

Las diferencias encontradas en la frecuencia de enfermedades ocasionadas por micobacterias ambientales reflejan la variación en química y microbiología de los sistemas de distribución y su agua. En áreas donde la prevalencia es significativamente más baja, se relaciona con la ausencia de micobacterias ambientales en aguas potables y aguas de calidad superior, quizás debido a los suelos alcalinos y al agua dura (Falkinham, 2015).

Respecto a las micobacterias ambientales en aguas puras, diversos estudios han demostrado su presencia en sistemas de distribución de aguas de unidades de diálisis (Carson *et al.*, 1988; Gomila *et al.*, 2005; Montanari *et al.*, 2009; Sartori *et al.*, 2013). Es, en este tipo de aguas, donde se ha descrito una especie nueva, *M. llatzerense* (Gomila *et al.*, 2008), como un microorganismo autotrófico facultativo, oxidador de hidrógeno, que también se ha aislado recientemente, y por primera vez como patógeno en humanos, en un absceso abdominal de un paciente del Hospital Universitario de Pensilvania (Cárdenas *et al.*, 2014).

### 3.1 Micobacterias y biopelículas

La elevada hidrofobicidad de micobacterias y su resistencia a los antibióticos, desinfectantes y metales pesados, permiten la formación de biopelículas en una variedad de superficies orgánicas (plásticos, caucho, silicona, celulosa, etc...) y superficies inorgánicas (cobre, vidrio, etc...). Las biopelículas pueden constituir fuentes importantes de micobacterias ambientales. Sin embargo, la función protectora de biopelículas en relación a estas micobacterias contra factores ambientales agresivos y en algunos casos, en la promoción de su crecimiento, no ha sido aún bien caracterizada. Su presencia en las biopelículas puede, por tanto, presentar un impacto en la salud humana, ya que podrían ser responsables de los problemas de contaminación y algunas enfermedades (Leão *et al.*, 2005). En la Figura 10 se muestran micrografías de biopelículas de diferentes especies de micobacterias.



**Figura 10.** Micrografías de biopelículas de micobacterias ambientales. (A) *M. fortuitum* y *M. chelonae* (B); Presencia de la matriz extracelular (EPS) en una biopelícula de *M. chelonae* (C) *M. smegmatis* (D); Extraída de Sousa *et al.*, 2015.

Las micobacterias tienen la capacidad de formar biopelículas en las tuberías de los sistemas de distribución del agua potable, lo que les hace posible permanecer en este tipo de lugares durante años (Vaerewijck *et al.*, 2005; Falkinham, 2010). Han sido detectadas en biopelículas

desde 1989 y en los primeros estudios se mostró que *M. kansasii* y *M. flavescens*, podían estar presentes en las biopelículas (Schulze-Röbbecke y Fischeder, 1989). Posteriormente, en un estudio realizado en sistemas de distribución de aguas en Francia y Alemania se mostró que un 90 % de las muestras de biopelículas recogidas (50) fueron positivas para especies micobacterianas (Schulze-Röbbecke *et al.*, 1992). A nivel de ensayos de laboratorio se ha inoculado *M. chelonae* en tuberías de policloruro de vinilo (PVC) donde se ha evidenciado colonización a las ocho semanas (Vess *et al.*, 1993). Se ha analizado también, el potencial de estos organismos de desarrollarse en condiciones variables de disponibilidad de nutrientes y en diferentes tipos de materiales. Los resultados muestran que las especies *M. fortuitum* y *M. chelonae*, se desarrollan en el mismo grado, en diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes (alta y baja), y en distintos materiales, polietileno de alta densidad (HDPE) y caucho *Silastic*<sup>®</sup> (Hall-Stoodley *et al.*, 1999). El rápido desarrollo de estos organismos puede ser explicado por la naturaleza hidrofóbica de la pared celular, la cual facilita la adherencia a las superficies (Schulze-Röbbecke *et al.*, 1992).

Aunque los estudios de laboratorio ayudan a definir los parámetros de crecimiento de las micobacterias ambientales en biopelículas, poco se sabe de los relacionados con la configuración del medio ambiente, tales como el número de cada especie, en biopelículas de especies múltiples, la frecuencia con que se desprenden en el suministro de agua, y lo más importante para la salud del ser humano, el grado de virulencia cuando llegan al usuario, durante baños o duchas, reprocesamiento de productos sanitarios, u otras exposiciones (Williams *et al.*, 2009).

Estudios en mutantes creados de *M. avium* han detectado que no forman biopelículas como el tipo salvaje, y a su vez, que son menos infecciosos que el tipo salvaje (Yamazaki *et al.* 2006). Para *M. abscessus*, se ha detectado lo contrario, que las cepas más invasivas forman menos biopelículas en un modelo de laboratorio estático (Howard *et al.*, 2006). De este modo, la capacidad de formación de biopelículas, la estructura de la biopelícula y virulencia se pueden vincular en determinadas micobacterias (Williams *et al.*, 2009).

# OBJETIVOS





En estudios previos, realizados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares en aguas puras de hemodiálisis, se encontró un inesperado y elevado número de micobacterias ambientales. Las micobacterias detectadas mostraron una gran diversidad, dando lugar en algunos casos a la descripción de nuevas especies. En base a estos estudios, se planteó evaluar la relevancia de las micobacterias en la comunidad microbiana de estos hábitats, así como su participación o función en la producción de biopelículas.

La presente tesis doctoral plantea como objetivo principal detectar y caracterizar micobacterias ambientales presentes en muestras de aguas potables y puras. Para la consecución del objetivo principal se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Valorar la capacidad de detección de micobacterias ambientales mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo aplicadas a muestras de aguas potables (hospitalarias y no hospitalarias) y puras (hemodiálisis).
2. Analizar y comparar la diversidad presente y la activa en aguas puras de hemodiálisis.
3. Identificar las micobacterias ambientales presentes en muestras de aguas potables y puras; y estudiar su diversidad en el marco de la comunidad microbiana.
4. Establecer diferencias o semejanzas entre las poblaciones de micobacterias presentes en aguas potables y aguas puras.
5. Comparar los aislamientos de micobacterias de origen ambiental y clínico a través de un análisis multigénico.
6. Incrementar la colección de aislados de micobacterias ambientales del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los estudios que componen esta tesis se realizaron a partir de muestras de aguas puras y aguas potables, de origen hospitalario y no hospitalario. La recogida de muestras se centró en el Hospital *Son Llätzer* y en la Universidad de las Islas Baleares, ubicados en el municipio de Palma de Mallorca (*Illes Balears*, España) y cuyo plano de situación se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Plano de situación del área que incluye los centros de obtención de muestras analizadas en la presente tesis.

### 1.1 Origen y descripción de las muestras

Con el fin de cumplir los objetivos propuestos, se recogieron muestras de aguas puras y potables, cuyo origen y condiciones específicas se recogen en los apartados siguientes.

#### 1.1.1 Muestras obtenidas a partir de aguas puras hospitalarias

Las muestras de aguas puras provenían de la Unidad de hemodiálisis del Hospital *Son Llätzer*. En esta Unidad se mejoró el sistema de tratamiento del agua de hemodiálisis a lo largo de este trabajo, por lo que se consideraron dos tipos de muestras: las recogidas con el sistema inicial de tratamiento donde se realizaba un proceso de desinfección de éstas con hipoclorito sódico

a 30 ppm (hipercloración) mensualmente y las que se recogieron con la novedad del sistema de purificación, donde se realizaba una desinfección quincenal del sistema de distribución de éstas con ácido peracético.

#### 1.1.1.1 Tratamiento inicial de desinfección con hipoclorito sódico

El sistema inicial de tratamiento del agua de hemodiálisis del que disponía el Hospital *Son Llätzer* en el momento de la recogida de determinadas muestras, partía del suministro de agua del abastecimiento público y se cloraba a 30 ppm. Los siguientes pasos consistían en circular el agua a través de filtros de arena, descalcificarla, y someterla al tratamiento de ósmosis inversa. A continuación, el agua se almacenaba en dos depósitos, se distribuía a las máquinas de hemodiálisis después de la dechloración a través de filtros de carbón activado y se hacía pasar por microfiltros en serie, ordenados de mayor a menor, de 5, 0,8 y 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Posteriormente, el agua era propulsada por una bomba de presión a través de un circuito de distribución de tuberías de PVC Saenger 32-1,0 de 25 mm de diámetro (norma UNE 5311231994138) y 185 m de longitud, para alcanzar así los monitores de diálisis, pasando a través de un filtro capilar constituido por membrana de polisulfona antes de que el líquido fuera reconstituido, como se representa en la Figura 12.

#### 1.1.1.2 Tratamiento de desinfección con ácido peracético

Se obtuvieron diversas muestras de agua que provenían del sistema de distribución general del agua de hemodiálisis del Hospital *Son Llätzer*, una vez implantado el tratamiento adicional y quincenal con ácido peracético, aplicado como consecuencia de los resultados obtenidos en la tesis de la Dra. Margarita Gomila (Tesis doctoral, 2007).

El ácido peracético como agente oxidante para el proceso de desinfección en agua se implantó debido a su marcado poder oxidante y su amplio espectro biocida aún en presencia de materia orgánica (Rossi *et al.*, 2007), cuya eficacia ha sido comprobada frente a bacterias (Falsanisi *et al.*, 2006), hongos (Baldry y French, 1989), virus (Rutala y Weber, 1999) y esporas (Kitis, 2004).

#### 1.1.2 Muestras obtenidas a partir de aguas potables

Se obtuvieron muestras de agua potable sin más tratamiento que el efectuado a nivel de la red de abastecimiento público del municipio de Palma de Mallorca, en el ámbito hospitalario (Hospital *Son Llätzer*) y no hospitalario (Universidad de las Islas Baleares).

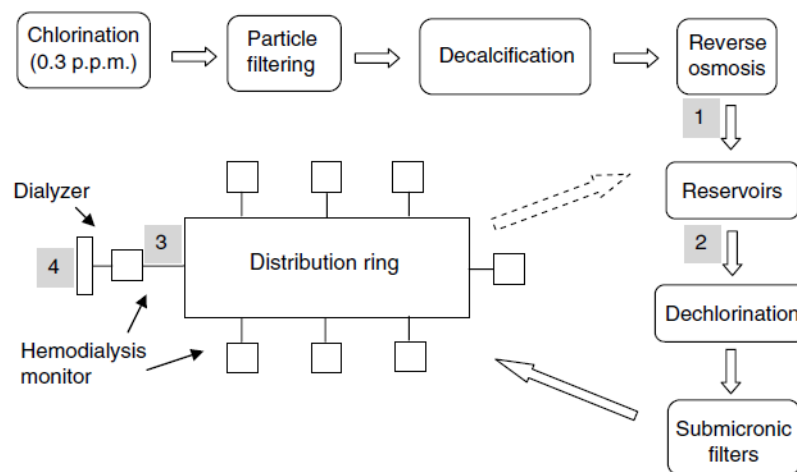


Figura 12. Esquema del tratamiento inicial del agua de hemodiálisis en el Hospital Son Llàtzer (Gomila *et al.*, 2006).

### 1.1.2.1 Origen hospitalario

Las muestras de agua potable del ámbito hospitalario se obtuvieron a partir de los puntos de suministro de abastecimiento público ubicados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y en el Servicio de Microbiología del Hospital *Son Llàtzer*.

El suministro de agua potable proviene de una compleja red de distribución que va desde los embalses o acuíferos de origen hasta el destinatario final, pasando por una desinfección a base de cloro y por el almacén en depósitos reguladores donde periódicamente pasa los controles de calidad.

### 1.1.2.2 Origen no hospitalario

Las muestras de agua potable del ámbito no hospitalario provienen de puntos de suministro de agua ubicados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares cuyo control de calidad de abastecimiento público, al igual que el Hospital *Son Llàtzer*, se gestiona a nivel municipal.

## 1.2 Cronología en la obtención de muestras

La recogida de las diversas muestras de agua para los estudios que se llevaron a cabo desde el año 2004 al 2010, se resumen por orden cronológico en la Tabla 2, donde se relaciona el número de muestra con la fecha de obtención de la misma, el tipo de muestra según si son de aguas puras o aguas potables, el origen en cuanto a ubicación y sistema de tratamiento del agua y el volumen recogido, datos que se desarrollan en la sección siguiente, 1.3.

**Tabla 2.** Muestras analizadas a lo largo de esta tesis doctoral.

Muestra	Fecha	Tipo de aguas	Origen <sup>a</sup>	Volumen (L)
1	24/11/04	Puras	HSSL-HC	200
2	09/03/05	Puras	HSSL-AP	0,1
3	27/10/05	Potables	UIB	1
4	06/02/06	Potables	UIB	1
5	29/03/06	Potables	UIB	1
6	11/04/06	Potables	UIB	2
7	12/04/06	Potables	UIB	2
8	18/04/06	Potables	UIB	2
9	19/04/06	Potables	UIB	2
10	22/05/06	Puras	HSSL-AP	3
11	23/11/07	Puras	HSSL-AP	0,1
12	24/11/07	Puras	HSSL-AP	0,1
13	21/12/07	Puras	HSSL-AP	0,1
14	22/12/07	Puras	HSSL-AP	0,1
15	16/01/08	Puras	HSSL-AP	0,1
16	17/01/08	Puras	HSSL-AP	0,1
17	20/02/08	Puras	HSSL-AP	0,1
18	21/02/08	Puras	HSSL-AP	0,1
19	26/02/10	Potables	HSSL-SM	2
20	26/02/10	Potables	UCI	2
21	26/02/10	Potables	UIB	2

<sup>a</sup>HSSL-HC, indica las muestras provenientes del Hospital *Son Llàtzer* (Unidad de Diálisis) sometidas a un tratamiento de desinfección mensual con hipoclorito sódico; HSSL-AP, indica las muestras del Hospital *Son Llàtzer* (Unidad de Diálisis) sometidas a un tratamiento de desinfección quincenal con ácido peracético; HSSL-SM, indica las muestras recogidas en el Servicio de Microbiología del Hospital *Son Llàtzer*; UIB, indica las muestras recogidas en la Universidad de las Islas Baleares; UCI, indica las muestras recogidas en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital *Son Llàtzer*.

### 1.3 Recogida de muestras

La totalidad de las muestras se recogió en condiciones de asepsia con el objetivo de evitar la contaminación de las mismas.

La muestra 1 provenía de la filtración prolongada de 200 L de agua, en condiciones asépticas, de un punto de recogida dentro del sistema inicial de purificación del agua de hemodiálisis del Hospital *Son Llàtzer*. Concretamente, del punto 3 de la Figura 12, en el puerto de conexión del equipo de hemodiálisis al anillo de distribución, previo a la entrada de agua en el monitor de diálisis. El filtro de membrana a través del cual se hizo pasar el volumen total de la muestra *in situ* era de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore SVGPB1010, Sterivex<sup>TM</sup> – GP 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro).

La muestra 2 se obtuvo del punto 3 de la Figura 12 y se recogió en un recipiente de plástico de boca ancha con tapa de rosca hermético y estéril de 100 ml de capacidad.



Las muestras 3 a 9 se recogieron de agua del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares (UIB) y se obtuvieron de la toma situada en la sala de filtrado (muestras 3 y 4) y de la situada en la sala de preparación de geles de agarosa (muestras 5 a 9). La recogida de las muestras se efectuó en recipientes limpios y esterilizados de vidrio de 1 L de capacidad con tapón roscado (1 o 2 botellas según el volumen especificado en la Tabla 2). En este caso, previamente se retiró manualmente el filtro del grifo y se dejó correr el caudal del agua a elevada presión antes de proceder a la toma de muestra transcurridos aproximadamente 2 minutos. En condiciones de asepsia, las botellas se llenaron hasta su capacidad máxima.

Las muestras 10 a 18 se tomaron de la unidad diálisis del Hospital *Son Llàtzer* cuando ya se había implantado el tratamiento del agua de hemodiálisis con ácido peracético. La muestra 10 se recogió del punto M3, una vez implantado el tratamiento con ácido peracético. Las muestras 11 a 18 se recogieron de los puntos 3 y 4 (Figura 12) mensualmente y durante un total de cuatro meses continuados en cada uno de los cuales se obtuvieron muestras el día previo al tratamiento de desinfección con ácido peracético y el día posterior, con el fin de realizar un control de éste. El punto 4 corresponde a hemodiafiltración. La toma de muestra se realizó en recipientes de vidrio de 1 L de capacidad con tapones roscados, limpios y esterilizados.

Las muestras 19 a 21 se recogieron en tomas situadas en el Servicio de Microbiología y la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital *Son Llàtzer* y en el laboratorio de Microbiología de la UIB, respectivamente, en recipientes limpios y esterilizados de vidrio de 1 L de capacidad con tapón roscado (2 botellas según el volumen especificado en la Tabla 2).

En general, las muestras recogidas con un volumen de 0,1 L no se filtraron, simplemente se utilizaron para realizar el banco de diluciones seriadas en solución Ringer. Las muestras en las que se recogió 1 L se filtraron para concentrar el número de micobacterias de la muestra y en el caso de las muestras de 2 L, se amplió el volumen en base a los resultados que se iban obteniendo a lo largo de la realización de la tesis.

Todas las muestras fueron recogidas en recipientes con tapa a rosca para evitar el derrame durante el transporte. El transporte de las muestras obtenidas, en su caso, y el almacén previo a su procesamiento se hizo a una temperatura de 4 °C, en ausencia de luz. El procesamiento de las muestras se hizo en un tiempo inferior a 4 h, a excepción de la muestra 1 que provenía del filtrado de 200 L de agua y que se había conservado a una temperatura de - 80 °C.

## **2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES, INDEPENDIENTES DE CULTIVO**

El análisis microbiológico llevado a cabo mediante métodos moleculares independientes de cultivo se realizó a partir de la muestra 1. La metodología utilizada comprende en primer lugar, una extracción de ácidos nucleicos, DNA y RNA, seguida de la amplificación por reacción en

cadena de la polimerasa, la construcción de genotecas y la secuenciación de los clones obtenidos.

## 2.1 Extracción de DNA y RNA total

La extracción de ácidos nucleicos totales (DNA y RNA) se hizo en la muestra 1 directamente de la superficie del filtro de membrana donde se encontraban las células bacterianas retenidas, mediante un proceso de lisis de la pared celular con la adición de 3 ml de tampón de extracción compuesto por Tris-HCl y Na-EDTA a una concentración final de 100 mM cada una y pH 8,0. A la solución de tampón, se añadió dodecil sulfato sódico (SDS) al 1 %, proteinasa K (150 µg/ml), lisozima (3 mg/ml) y mutanolisina (1,7 µg/ml). Seguidamente, se alternaron tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación utilizando nitrógeno líquido (-196 °C) y baño de inmersión a una temperatura de 65 °C, respectivamente para asegurar la rotura de la pared celular. Posteriormente, se purificó el DNA por el método de bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) (Wilson, 1987), seguido de dos extracciones sucesivas con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 (v/v/v) y una última con cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v). Los ácidos nucleicos totales se precipitaron con etanol absoluto y acetato sódico (3 M, pH 5,2) y se recogió por centrifugación a 13.000 rpm durante 20 minutos. Se hizo un lavado del sedimento con etanol al 70 % (v/v) y una vez seco, se resuspendió en 50 µl de agua MilliQ tratada con DEPC autoclavada. Una alícuota de la muestra se digirió con 30 U de DNasa I libre de RNasa (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) en 10 mM de acetato sódico y 0,5 mM de MgSO<sub>4</sub> (pH 5.0) a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, la muestra fue conservada a una temperatura de -80 °C hasta su posterior análisis.

Los ácidos nucleicos extraídos totales se analizaron visualmente mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) con tampón TAE 1X (Sambrook y Russell, 2001), teñido con bromuro de etidio.

La muestra obtenida se comparó con el marcador de peso molecular del DNA del fago Lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* (Progen Industries Ltd /Gibco BRL®). Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0,8 % sumergido en 350 ml de TAE 1X dentro de la cubeta de electroforesis (RunOne™ System) y se sometió a una potencia de 100 V durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, se introdujo el gel en una tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 15 minutos, tiempo necesario para poder visualizar la banda del producto de PCR a través de luz ultravioleta en un transiluminador UVP.

Todos los reactivos y materiales usados en el proceso de extracción fueron tratados para prevenir la contaminación por ribonucleasa (RNasa).

## 2.2 Reacción de la transcriptasa-reversa (RT)

La reacción de la transcriptasa-reversa se llevó a cabo usando la enzima Superscript II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de la reacción RT (20  $\mu$ l) contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ditiotreitól, cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato a una concentración 500  $\mu$ M, 250 ng de *random primers*, y 200 U de la transcriptasa reversa Superscript II. Previamente a la adición de la transcriptasa reversa Superscript II, los *random primers* se incubaron durante 10 min a 25 °C. Las reacciones RT se llevaron a cabo durante 50 minutos a 42 °C, seguido de una incubación de 15 minutos a 70 °C para inactivar la transcriptasa reversa. Los productos de la RT se utilizaron inmediatamente en la PCR o se guardaron a -80 °C para su uso posterior. Para evitar la posible contaminación de DNA en los extractos de RNA utilizados para la RT-PCR, se prepararon mezclas de PCR control que contuviera RNA y que no fuesen previamente sometidas a RT.

## 2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional del gen del rRNA 16S

A partir de la muestra de DNA total conservada a -80 °C (muestra 1) se llevaron a cabo dos amplificaciones por PCR convencionales (Mullis y Faloona, 1987). Una de ellas, con la finalidad de crear una genoteca de clones del gen rDNA 16S y la otra para construir una genoteca del gen rDNA 16S específica de micobacterias, realizando consecutivamente una PCR anidada (*nested-PCR*), consistente en una amplificación mediante una pareja de cebadores diferente a la primera amplificación, de un fragmento interior del primer producto amplificado.

Los genes de la secuencia del DNA ribosómico (rDNA), que codifican para el RNA ribosómico 16S de la subunidad menor de los ribosomas procariontes, se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa convencional utilizando cebadores universales (Lane, 1991) que se unen a regiones conservadas del gen rDNA 16S. Las secuencias y características de los cebadores se especifican en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Secuencias y especificaciones de los cebadores universales del gen rDNA 16S utilizados en este estudio.

	Cebadores	Secuencia de 5' a 3'	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)	Referencia
PCR	16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	55	Lane, 1991
convencional	16R1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		55	

En ambos casos, para la PCR convencional, se obtuvo un volumen final de 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción de PCR, conteniendo tampón de reacción 10x (KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 9,0), desoxinucleósidos trifosfato a 200  $\mu$ M (dNTPs, *Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH*, Freiburg, Germany), la pareja de cebadores (10  $\mu$ M), 1,5 U Taq DNA Polimerasa (*Amersham Biosciences*) y muestra de DNA total (1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l y 5  $\mu$ l en reacciones por separado). En el control negativo, se utilizó la misma mezcla de reacción añadiendo agua MilliQ autoclavada en lugar de la muestra de DNA.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador *Mastercycler* personal (*Eppendorf*). Las condiciones de PCR con cebadores universales fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94 °C, seguida de treinta ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, anillamiento de 1 minuto a 55 °C y elongación de 1 minuto y 30 segundos a 72 °C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 72 °C durante 10 minutos y finalmente, refrigeradas a 4 °C hasta su posterior análisis.

Los productos resultantes de la PCR con los cebadores universales se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa (Sigma) al 1,5 % (p/v) con tampón TAE 1 x (Sambrook y Russell, 2001). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se visualizaron a través de luz ultravioleta en un transiluminador UVP.

## 2.4 PCR anidada (*nested*-PCR) del gen del rRNA 16S de micobacterias

El producto de una de las amplificaciones convencionales del gen rDNA 16S anteriormente descrita, fue inmediatamente utilizado como molde para la PCR anidada. Los cebadores (internos) utilizados para la segunda reacción de PCR, específicos de micobacterias, fueron los descritos por Mendum *et al.*, 2000 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Secuencias y especificaciones de los cebadores del gen rDNA 16S específicos de micobacterias utilizados en este estudio.

	Cebadores	Secuencia de 5' a 3'	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)	Referencia
PCR	<i>Myc Forward</i>	ATGCACCACCTGCACACAGG	473	60	Mendum <i>et al.</i> , 2000
anidada	<i>Myc Reverse</i>	GGTGGTTGTGCGGTTGTTTC		60	

La mezcla de reacción de la PCR anidada fue la misma que en la convencional descrita anteriormente, cambiándose únicamente los cebadores y la muestra de DNA (1 µl del producto amplificado anterior).

Las condiciones de la PCR anidada fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 10 minutos a 94 °C, seguida de treinta ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, anillamiento de 1 minuto a 60 °C y elongación de 1 minuto y 30 segundos a 72 °C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 72 °C durante 10 minutos y refrigeradas a 4 °C.

Previamente, y con la finalidad de optimizar al máximo las condiciones de PCR de los cebadores descritos por Mendum *et al.* (2000) se amplificaron muestras de DNA de micobacterias aisladas de agua potable, así como de otros géneros, tales como *Agrobacterium* sp., *Ochrobactrum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Sinorhizobium* sp., de origen ambiental y clínico, a unas temperaturas de anillamiento de 55 °C y 60 °C.

## 2.5 RT-PCR y PCR del gen del rRNA 16S

La región del gen rDNA 16S comprendida entre las posiciones nucleotídicas 27 y 907 según la numeración de la secuencia de *Escherichia coli*, correspondiente a aproximadamente la primera mitad del gen completo rDNA 16S, se amplificó usando como molde el DNA y el cDNA. Los cebadores utilizados fueron el F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y el 907R (5'-CCGCAATTCMTTTRAGTTT-3'). Cada mezcla de PCR (25 µl) contenía la mezcla de reacción (10 mM Tris-HCl y 50 mM KCl), 200 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato (*Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Germany*), 0,5 µl de cada uno de los cebadores, *forward* y *reverse* (10 µM), 1,5 U Taq DNA polimerasa (*Amersham Biosciences*) y 3 µl del DNA molde (DNA o cDNA).

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de la marca *Eppendorf*, con un paso inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, y 1 minuto 30 segundos a 72 °C. Tras la amplificación, las muestras se incubaron 10 minutos a 72 °C, manteniéndose a continuación a 4 °C.

Se analizaron 5 µl de los productos resultantes, de la RT-PCR y PCR realizadas con los cebadores universales, por electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 1,5 % (p/v) con tampón TAE 1 x (Sambrook y Russell, 2001), y se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), para posteriormente ser visualizados a través de luz ultravioleta en un transiluminador UVP.

## 2.6 Clonación

Los productos que se obtuvieron en la PCR convencional, PCR anidada y RT-PCR, fueron clonados por separado para construir las diferentes genotecas o librerías de clones. La genoteca del gen rDNA 16S pretendía revelar la diversidad de la comunidad microbiana en la muestra, la genoteca del cDNA 16S, la población activa de la muestra y por último, la genoteca del gen rDNA 16S específico de micobacterias, las micobacterias presentes en la muestra del sistema antiguo de purificación del agua de hemodiálisis del Hospital *Son Llätzer*, una vez secuenciados los amplicones del gen rDNA 16S.

El producto de PCR se ligó en el plásmido vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (3,9 kb) con el kit de clonación TOPO<sup>®</sup> TA cloning kit (*Invitrogen Life Technologies SA, España*), transformándose a continuación en células competentes de *Escherichia coli* DH5-T1R (*Invitrogen Life Technologies SA, España*), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante.

## 2.7 Selección de clones recombinantes (con inserto) obtenidos en las genotecas

Los clones recombinantes se seleccionaron por siembra en placas de agar Luria-Bertani (LB, Scharlau) que contenían 40 µl de ampicilina (100 mg/ml), 40 µl de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, 40 mg/ml) y 20 µl de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido, 100 mM) y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

El gen de resistencia a ampicilina, presente en el plásmido (bases 2131-2991), permitió seleccionar las bacterias que portaban estos plásmidos, dado que son capaces de crecer en presencia de dicho antibiótico. El sitio de clonación múltiple presente en el plásmido (bases 234-357) dentro del gen de la  $\beta$ -galactosidasa permite la inactivación del mismo, una vez que el DNA inserto se ha clonado en esta región.

Por otro lado, el medio de cultivo que contiene el análogo de la lactosa, X-gal, permitió distinguir las colonias que contenían el vector recombinante (con inserto) de aquellas que habían recibido un vector no recombinante (sin inserto). Los clones que recibían el vector recombinante no podían utilizar lactosa ni su análogo y formaban colonias blancas. Los clones que recibían un vector no recombinante sí podían utilizar la lactosa o su análogo en presencia de IPTG y formaban colonias azules.

Tras la incubación, se seleccionaron los clones que dieron lugar a colonias de color blanco, que correspondían a los recombinantes que habían incorporado el inserto esperado en el plásmido.

Los clones secuenciados se conservaron en glicerol al 20 % a una temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sambrook y Russell, 2001)

## 2.8 Extracción de DNA plasmídico de los clones

Para confirmar la presencia del inserto, cada clon seleccionado se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de tampón TE (10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA, pH 8,0) y el DNA se extrajo por lisis celular sumergiendo las células en baño maría a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13.000 rpm.

Finalizada la centrifugación, se extrajeron 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se almacenaron a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a la espera de su posterior análisis.

## 2.9 Análisis de los clones de las genotecas

Los insertos clonados de las genotecas realizadas se amplificaron por PCR convencional utilizando la pareja de cebadores que se unían al vector pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>; M13F universal ( $-20$ ) con la secuencia 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' y M13R universal 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'.

La mezcla de reacción utilizada en la PCR fue la misma que se describió anteriormente (apartado 2.3) pero con los cebadores M13F y M3R y con una muestra de 1  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de la extracción de plásmido anterior.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 5 minutos a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguida de treinta ciclos de desnaturalización de 1 minuto a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , anillamiento de 1 minuto

a 55 °C y elongación de 1 minuto y 30 segundos a 72 °C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 72 °C durante 10 minutos y refrigeradas a 4 °C.

Se comprobó el tamaño del inserto por electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (p/v) tal como se describe en el punto 2.3.

## 2.10 Secuenciación de los clones obtenidos

Una vez visualizadas y verificadas las bandas por electroforesis en gel de agarosa, se seleccionaron los clones con el inserto del tamaño esperado y se descartaron el resto de tamaños no esperados. Posteriormente, se purificaron con el kit *Microcon centrifugal filter devices*/Microcon® YM-100 (Millipore) según indicaciones del fabricante, se comprobó la purificación del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y finalmente, se secuenciaron.

Los insertos de los clones se secuenciaron en un solo sentido con el cebador M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'). La mezcla de reacción para la PCR de secuenciación se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing v.3.1 (Applied Biosystems)*, con las cantidades siguientes: 1,5 µl de tampón de secuenciación (5x), 2 µl de BigDye (versión 3.1), 0,5 µl de cebador M13F, 2,5 µl o 5 µl del producto amplificado y purificado según si la intensidad de la banda obtenida en la electroforesis en gel de agarosa era de mayor o menor intensidad, respectivamente, y agua milliQ autoclavada hasta llegar al volumen final de 10 µl.

Las condiciones de la PCR de secuenciación eran de una primera fase de 2 minutos a 96 °C seguida de 25 ciclos de 15 segundos a 96 °C, 15 segundos a 60 °C y 4 minutos a 60 °C. Finalizados los ciclos se mantenían refrigeradas las muestras a 4 °C.

Las reacciones de secuenciación se precipitaron con etanol, añadiendo al producto de reacción de secuenciación 90 µl de agua MilliQ, 250 µl de etanol absoluto a 4 °C y 10 µl de acetato sódico 3M, pH 5,2. Tras agitar durante 15 segundos se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 minutos, y una vez descartado el sobrenadante se añadieron 300 µl de etanol al 70 % (v/v) frío al precipitado, para centrifugar nuevamente a 13.000 rpm durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por evaporación en campana.

Las muestras se conservaban a -20 °C y solo se resuspendían en 20 µl de agua MilliQ autoclavada el mismo día que se enviaban a analizar por separación electroforética realizada en un analizador automático de secuencias ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*) operado por técnicos de los Servicios Científico-Técnicos de la UIB.

### 2.11 Análisis filogenético de las secuencias de los clones

Las secuencias parciales del gen rDNA 16S obtenidas en cada una de las genotecas se visualizaron individualmente y los posibles errores y/o ambigüedades se corrigieron manualmente mediante el programa BioEdit (Hall, 1999). Cada una de las secuencias de nucleótidos obtenidas de los clones en las diferentes genotecas, una vez corregidas, fueron analizadas por comparación con las secuencias disponibles en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Posteriormente, se compararon con las secuencias de referencia del gen rDNA 16S de las cepas tipo de especie disponibles en el servidor EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Chun *et al.*, 2007).

Además de las secuencias correspondientes a nuestros clones, se incluyeron en el análisis todas aquellas secuencias de referencia incluidas en el EZ-Taxon de ese mismo género o géneros próximos que mostrasen un porcentaje de similitud igual o superior al 95 % con cada una de nuestras secuencias del grupo. El alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de los clones obtenidos en las diferentes genotecas se realizó mediante un método jerárquico implementado en la herramienta *Clustal X2* (<http://www.clustal.org/>; Larkin *et al.*, 2007). Secuencias con posiciones alineadas ambiguamente y/o incorrectamente se corrigieron manualmente.

Las secuencias de los clones se analizaron adicionalmente con distintas herramientas para determinar las posibles quimeras y eliminarlas en caso necesario. Las posibles secuencias quiméricas se determinaron con la herramienta CHIMERA-CHECK implementada en la pipeline RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) basada en la herramienta de análisis de secuencias ultrarápida USEARCH 6.0 (Edgar *et al.*, 2011) y con la herramienta *Chimera-Uchime* implementada en el programa Mothur versión 1.35.1 ([http://www.mothur.org/wiki/Main\\_Page](http://www.mothur.org/wiki/Main_Page)).

Los árboles inferidos se realizaron con el paquete PHYLIP (*Phylogenetic Inference Package*, versión 3.6; Felsenstein, 2005) aplicando el método de distancia genética de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) y el algoritmo de agrupamiento de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), para estimar las distancias evolutivas. El análisis de *bootstrap* (1000 réplicas) se hizo con el paquete bioinformático PHYLIP. Los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500 se indican como porcentaje en los nodos correspondientes en cada uno de los árboles filogenéticos. La topología de los árboles se visualizó con el programa Treeview 1.6.6 (Page, 1996).

Los clones se asignaron a una misma especie cuando éstos se agrupaban claramente en la misma rama que la cepa tipo de esa especie, y los valores de similitud en la secuencia del gen rDNA 16S eran iguales o superiores al 97 %. En los casos en los que la similitud con la especie más próxima, fuese inferior al 97 % ese clon se asignó únicamente al género correspondiente más próximo. Este criterio no se aplicó en los clones de la genoteca del gen rDNA 16S específica del género *Mycobacterium* ya que diferentes especies pueden compartir porcentajes superiores al 99 % de similitud de secuencia.



## 2.12 Estimación de la cobertura de la genoteca e índices de diversidad

El programa PAST 3.06 (Hammer *et al.*, 2001), disponible en la página web <http://folk.uio.no/ohammer/past/>, se utilizó para obtener datos estadísticos de análisis de la diversidad alfa (Whittaker, 1972), es decir, la riqueza de especies de esta comunidad particular objeto de estudio a la que consideramos homogénea, y construir una curva de rarefacción que permitiera estimar la riqueza máxima de especies en la comunidad.

A partir del programa PAST también se obtuvieron los índices de dominancia, de diversidad, de uniformidad y los métodos no paramétricos que fueron analizados.

En relación a los índices de dominancia, se considera la medida más simple de diversidad, teniendo en cuenta tanto la abundancia como la riqueza de especies, a partir del índice de diversidad de Simpson  $\lambda$  (1949);  $\lambda = \sum \left( \frac{n_i^2}{N^2} \right) = \sum p_i^2$ . Donde  $p_i$  se considera la abundancia proporcional de la especie  $i$ , lo cual implica obtener el número de individuos de la especie  $i$  ( $n_i$ ) dividido entre el número total de individuos de la muestra ( $N$ ). El índice de Simpson proporciona la uniformidad y oscila entre 0 y 1. Debido a que este valor es inverso a la equidad, la diversidad alfa se puede calcular como  $1 - \lambda$  (Lande, 1996) y el valor de dominancia ( $D$ ) como  $1 - D$ . Así, la fórmula de Dominancia a considerar es;  $D = \frac{1}{\sum p_i^2}$ . Este índice  $D$  se calcula a partir de la proporción de individuos de cada especie  $i$  que contribuyen al total de la muestra. Para una riqueza dada,  $D$  aumenta con la equidad, y para una equidad dada,  $D$  se incrementa con la riqueza. Oscila entre 0 (todas las especies/ géneros están presentes igualmente) y 1 (una especie/género domina completamente en la comunidad).

Otro índice de dominancia calculado es el de Berger-Parker  $d$ , (1970);  $d = \frac{N_{max}}{N}$ . Donde  $N_{max}$  es el número de individuos en la especie más abundante. Un incremento en el valor de este índice se interpreta como un aumento en la equidad y una disminución de la dominancia.

Se calculó el índice de Shannon (1948):  $H' = -\sum p_i \ln p_i$ , con el que se expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Se mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenece un individuo escogido al azar de una colección. Se asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Sus valores oscilan entre 0 (cuando hay una sola especie) y el logaritmo de  $S$ , cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran, 1988).

El otro índice de equidad que se calculó fue el de Brillouin (1962), útil cuando la aleatoriedad de la muestra no puede garantizarse. Su valor es menor al del índice de Shannon porque no hay incertidumbre:  $HB = \frac{\ln N! - \sum \ln N_i!}{N}$ . Donde  $N$  es el número total e individuos,  $N_i$  el número total e individuos de la especie  $i$ . La expresión  $N!$  significa  $N$  factorial.

El índice de *evenness* o uniformidad de Buzas y Gibson (1969) es considerado una medida de la uniformidad de la distribución:  $E = \frac{e^H}{S}$ . Donde S es igual al número de especies/géneros.

Entre los índices basados en la abundancia proporcional se calculó el índice de Margalef (1958) que viene dado por la expresión:  $D_{mg} = \frac{S-1}{\ln N}$ . Siendo N el número total de individuos y S el número total de especies.

El índice de *richness* o riqueza de Menhinick (1964) también se basa en la relación entre el número de especies y el número total de individuos observados:  $D_{Mn} = \frac{S}{\sqrt{N}}$ . Siendo N el número total de individuos y S el número total de especies. El valor de este índice se aproxima a cero cuando N es grande. Si todos los individuos son cada uno de una especie (S=N).

Se considera la uniformidad como la proporción de abundancias de los individuos de cada una de las especies. Al plantear la relación entre el índice de la diversidad obtenido y el valor máximo de ese índice, como una medida de la relatividad del mismo, se llega al concepto de uniformidad y entonces se trata de un parámetro descriptivo de las relaciones de abundancia. La estimación de la uniformidad para el índice de Shannon se conoce como la equidad de Pielou (Moreno, 2000) cuya fórmula es:  $E = \frac{H}{H_{max}} = \frac{H}{\ln S}$ . Su valor se encuentra entre 0 y 1, de forma que 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes.

Para determinar la diversidad de especies se aplicó el índice de diversidad alpha de Fisher (1943):  $S = \alpha \ln \left( 1 + \frac{n}{\alpha} \right)$ . Donde S sería el número de especies de la muestra, N, el número de individuos en la muestra y  $\alpha$ , el índice de diversidad. Este índice funciona mejor con datos donde la mayoría de especies tienen una abundancia de uno o dos individuos.

La estimación de la riqueza utilizando métodos no paramétricos se calculó mediante Chao1 que es un estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras o poco abundantes en la muestra (Chao, 1984; Chao y Lee, 1992; Smith y Van Belle, 1984).  $Chao\ 1 = S_{obs} + \frac{a^2}{2b}$ .  $S_{obs}$  corresponde al número de especies observadas en una muestra,  $a$  el número de especies que están representadas solamente por un único individuo en esa muestra (número de *singletons*) y  $b$  el número de especies representadas por dos individuos en la muestra (número de *doubletons*, Colwell, 1997; Colwell y Coddington, 1994). Este índice se basa en la abundancia, por lo que los datos que requiere se refieren a la abundancia de individuos que pertenecen a una determinada clase.

Los estimadores de cobertura se basan en el reconocimiento de que las especies que son abundantes tienen mayor probabilidad de ser incluidas en cualquier muestra y contienen muy poca información sobre el tamaño total de la comunidad. A partir de los datos obtenidos se calculó el índice de "cobertura muestral" basado en todas las especies de las genotecas

mediante la fórmula;  $C = 1 - \frac{n_1}{N}$ . Donde  $n_1$  representa el número de clones únicos y N el número total de clones analizados.

Finalmente, un enfoque alternativo a la estimación no paramétrica de la riqueza, se aportó gracias al método de rarefacción por individuos propuesto por Sanders (1968) y corregido por Hurlbert (1971) y Simberloff (1972) para estimar la riqueza máxima en la comunidad. El número de especies/géneros esperados en una muestra de tamaño n viene dado por;

$$E(S_n) = \sum_{i=1}^S \left[ 1 - \frac{\binom{N-n_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right].$$

Donde N es el número total de especies/géneros en la muestra,  $n_i$  el número de individuos de la especie i y S el número total de especies/géneros.

### 3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS MEDIANTE MÉTODOS CLÁSICOS Y MOLECULARES, DEPENDIENTES DE CULTIVO

Los análisis dependientes de cultivo se realizaron en las muestras comprendidas entre la número 2 y la 21. Los diferentes procesamientos y técnicas utilizadas se especifican en los apartados siguientes.

#### 3.1 Filtración por membrana

Al tratarse de aguas potables y puras, con el fin de permitir recuperar bajas tasas de microorganismos en volúmenes más elevados y aumentar la representatividad de las muestras, se hicieron pasar por un filtro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro (Millipore GVWP04700, Durapore® *Membrane Filters*) para retener, de este modo, los microorganismos en su superficie. Se filtraron 2 L en las muestras 6 a 10, y 1 L en el resto de muestras, con el objetivo de aumentar el número de aislamientos de micobacterias ambientales en la estrategia de descontaminación previa de la muestra (Sección 3.2) Adicionalmente, en la muestra 10, se filtró 1 L más por separado, con el fin de comparar diferentes aislamientos entre el medio de cultivo agar R2A y una modificación de éste, para una misma muestra.

El sistema de vacío se aplicó para acelerar la filtración y obtener tasas de flujo más elevadas. Para ello se utilizó un soporte, pinza metálica, embudo de Büchner, filtro de membrana, matraz de Kitasato, adaptador de caucho, varilla de vidrio y conexión a un sistema de vacío (bomba de succión).

Todo el proceso de filtración se llevó a cabo en condiciones de esterilidad (mechero Bunsen) para evitar contaminar la muestra.

#### 3.2 Descontaminación de las muestras

Con el objetivo de detectar micobacterias ambientales en las muestras de agua 3 a 10 y 19 a 21, se hizo un tratamiento previo a la siembra en placa de las mismas con el fin de eliminar

todas aquellas células que no tuvieran la propiedad de ser alcohol ácido resistentes, característica distintiva de las micobacterias. El método se basaba en la capacidad casi exclusiva de las micobacterias de resistir alteraciones del pH (pH ácidos o alcalinos). Se trataba de un proceso de descontaminación estándar con una solución de hidróxido de sodio al 2 % (NaOH) como agente descontaminante (Kubica *et al.*, 1963).

En primer lugar, se resuspendió el filtro de membrana obtenido en 6 ml de solución Ringer y se homogenizó la muestra manteniéndola en agitación durante 1 h a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C). A continuación, se incorporó el mismo volumen de solución citrato sódico-NaOH al 4 % (1N) y se homogenizó la muestra con un mezclador vorticial durante 15–20 segundos. El hidróxido sódico es el agente descontaminante más empleado que posee, además, propiedades mucolíticas. Al tratarse de un álcali muy potente resulta crítica la concentración empleada, así como el tiempo de actuación. En el siguiente paso, se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Seguidamente, se neutralizó el sedimento con solución de tampón fosfato al 7,1 % (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) 0,067 M a pH 6,8, llenando el tubo hasta los 45 ml. A continuación, se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos y se volvió a decantar. Tras vortear el sedimento (5 ml) se comprobó el pH con tiras, de tal manera que se garantizaba que estuviera comprendido entre 7- 7,5. En este punto del procesamiento, si el pH resultante era alcalino por encima de 7,5, se repetía el proceso desde la neutralización con solución de tampón fosfato al 7,1 % (*Phosphate Buffered Saline*, PBS).

Con el fin de garantizar el adecuado proceso de descontaminación de las muestras, se llevó a cabo de forma paralela una muestra control que contenía la cepa *M. abscessus* subsp. *abscessus* CCUG 20993<sup>T</sup>.

### 3.3 Diluciones y recuento en placa de células viables

El conteo de células viables se realizó en todas las muestras (muestras 2 a 21), en base a la técnica de diluciones seriadas en solución Ringer, bajo condiciones de esterilidad y agitando con vórtex antes de tomar una alícuota de cada dilución. Para llevar a cabo el conteo en placa, se utilizó el método de siembra en superficie sobre placas con medio de cultivo sólido agar R2A (Scharlau) (Reasoner y Geldreich, 1985). El agar R2A permite proporcionar una estimación de los cambios en la población bacteriana del agua, en relación al tratamiento o degradación de la calidad de agua en los sistemas de distribución, y permite recuperar células estresadas o resistentes a la cloración, de aguas potabilizadas. Es un medio pobre en nutrientes que combinándolo con largas incubaciones a bajas temperaturas permite recuperar células que de otro modo serían difíciles de detectar. En el agar R2A, la peptona (0,25 g/l) y el hidrolizado de caseína (0,5 g/l) son las fuentes de nitrógeno, el extracto de levadura (0,5 g/l) suministra las vitaminas y otros factores de crecimiento, y la glucosa (0,5 g/l) constituye la fuente de carbono. El piruvato (0,3 g/l) facilita la recuperación de las células estresadas y el almidón (0,5 g/l) funciona como detoxificante. El sulfato magnésico (0,024 g/l) y el fosfato potásico (0,3 g/l)

aportan los iones necesarios para mantener la presión osmótica y el agar-agar (15 g/l) es el agente solidificante.

Para detectar posibles crecimientos de micobacterias en una misma muestra pero en medios de cultivo diferentes, el filtro de membrana resultante del filtrado de 1 L de la muestra 10 se colocó directamente sobre una placa con medio sólido agar R2A modificado compuesto por almidón soluble 0,2 %, sulfato magnésico (0,024 g/l), fosfato potásico (0,3 g/l) y agar-agar (15 g/l). Por otro lado, las muestras 19 a 21 se sembraron adicionalmente en medio de cultivo agar Middlebroock 7H11 (Difco), diseñado para micobacterias.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C), en condiciones aeróbicas, durante un período que osciló entre 7 y 21 días. Cada dilución se sembró por duplicado. Transcurrido el período de incubación, las placas fueron examinadas para determinar el crecimiento y la pigmentación de las colonias que habían crecido. Se efectuaron los recuentos en placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC).

### 3.4 Aislamiento y cultivo

Para las diferentes muestras, se utilizaron distintos criterios para el aislamiento de las colonias obtenidas, basándonos en los resultados obtenidos y según iba avanzando la realización de la tesis doctoral. Los aislamientos de las colonias se seleccionaron escogiendo de dos a tres representantes de cada morfología diferente en las muestras 11 a 21, y de morfologías características de micobacterias ambientales en las muestras 4 a 10. En la muestra 2, en primer lugar, se aislaron todas las colonias presentes en cinco de las placas de dilución  $10^{-2}$ . En segundo lugar, se aislaron todas las colonias sin pigmentación amarilla de las cinco placas restantes de la dilución  $10^{-2}$ . Por último, se aislaron las colonias sin pigmentación amarilla de las diez placas de dilución  $10^{-1}$ , a partir de las diluciones seriadas y sembradas en placa. En la muestra 3, se aislaron todas las colonias de las placas de tratamiento de descontaminación.

Una vez seleccionados los aislados, se resembraron de nuevo en placas con medio de cultivo agar R2A, para comprobar la pureza del cultivo. Así pues, una vez confirmada la viabilidad y pureza se procedió para cada uno de los aislamientos, a conservarlos en sales a -70 °C (Schleif y Wensink, 1981) para su posterior análisis. Las sales -70 °C (2 x *Freezing Medium for Cells*) contenían para 100 ml de agua destilada la siguiente composición; 1,26 g de  $K_2HPO_4$ , 0,09g de  $Na^+$ -citrato, 0,018 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,18 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,36 g de  $KH_2PO_4$  y 8,8 g de glicerol. Para la conservación de los aislamientos, se mezclaron en un tubo *Eppendorf* 700  $\mu$ l de solución de sales -70 °C autoclavada con la mayor cantidad de colonias del aislado en placa recogidas con el asa de siembra. Posteriormente, se cubrió el tubo cerrado con película sellante Parafilm® M y se conservaron las muestras a -80 °C.

Un volumen parcial de 1 L de la muestra 10, no fue sometido a diluciones seriadas y el filtro de membrana resultante del filtrado, se sembró directamente en placa con un medio de cultivo R2A modificado, tal y como se detalla en el apartado anterior.

### 3.5 Determinación de la alcohol ácido resistencia (AAR)

A partir de las colonias aisladas en la muestra 2, se hizo la selección de micobacterias con la determinación de la alcohol ácido resistencia, mediante la tinción diferencial de Ziehl-Neelsen. El componente clave de esta tinción lo constituye el ácido micólico, fracción lipídica característica de micobacterias. El grupo carboxilo del ácido micólico queda libre (sin esterificar) y reacciona con el ion amonio de la fucsina. El ácido micólico forma un complejo con el peptidoglucano de la pared de la micobacteria y dicho complejo impide de alguna manera el contacto con el disolvente alcohol ácido en la etapa de decoloración (Madigan *et al.*, 2004).

Para llevar a cabo la tinción de Ziehl-Neelsen en primer lugar, se fijaron las células de una colonia aislada, al portaobjetos con metanol. En la tinción alcohol ácido se utilizó una mezcla de fucsina básica (0,3 g fucsina básica, 10 ml de etanol 95 %) y fenol (fucsina fenicada); la tinción penetra dentro de las células al calentar el portaobjetos lentamente hasta que se produce la emisión de vapores, evitando la ebullición del agua, aproximadamente durante 5 minutos. Se repitió la obtención de vapores cuatro veces y evitando en todo caso que hirviera. La función del fenol es potenciar la penetración de la fucsina en los lípidos de la pared. Después de lavar la preparación con agua destilada y decantar, se decoloró con alcohol ácido al 3 % (v/v HCl y etanol al 95 %), durante 2 minutos. Este procedimiento elimina la tinción de fucsina de los microorganismos que no presentan esta característica, pero es retenida por las micobacterias. Después de lavar con agua destilada y decantar de nuevo, se hizo una tinción de contraste con azul de metileno, durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaba, decantaba y se dejaba secar antes de observar en el microscopio con el objetivo 100x usando aceite de inmersión. Al final de la preparación, las micobacterias aparecían en color fucsia, mientras el resto de microorganismos aparecían en color azul.

### 3.6 Micobacterias de origen clínico

Simultáneamente a la obtención de micobacterias de origen ambiental a lo largo de la elaboración de esta tesis doctoral, se obtuvieron micobacterias atípicas de origen clínico del laboratorio de microbiología del antiguo Hospital Universitario *Son Dureta*, cedidas por el facultativo Antonio Ramírez, y del Hospital *Son Llätzer*, cedidas por la Dra. María del Carmen Gallegos. En su conjunto, el estudio incluía un total de 30 aislamientos de micobacterias. Del Hospital *Son Llätzer* se obtuvieron seis aislados en el año 2005 (HSLL1 a HSLL6) y quince en el año 2009 (M1 a M15). Del Hospital Universitario *Son Dureta* se obtuvieron nueve, denominados M1SD a M9SD.

Los aislados fueron proporcionados en medio de cultivo agar Löwenstein-Jensen a excepción del aislamiento denominado HSLL5 que se recibió en frasco de hemocultivo y se recuperó posteriormente con aguja de punción. Todos los aislamientos se sembraron en agar R2A incubándose 3-4 días a 30 °C. Transcurrido este período, y una vez comprobado el cultivo puro, se procedió a preservarlos en sales -70 (Schleif y Wensink, 1981) y guardarlos a -80 °C. A su

vez, se procedió a inocularlos en medio de cultivo R2A líquido y se mantuvieron a una temperatura de 30 °C *overnight* (o/n) para, posteriormente, ser sometidos a extracción del DNA por el método de CTAB según el procedimiento especificado en el apartado siguiente (3.7). Posteriormente, a partir de ese DNA total obtenido para cada aislamiento, se realizó una PCR y secuenciación del gen del rRNA 16S, así como de los genes específicos de micobacterias; ITS1, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB* y *sodA*. Los cebadores específicos y las condiciones de PCR y secuenciación se especifican en el apartado 3.8.

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas se realizó siguiendo el procedimiento especificado en los apartados 3.9 y 3.10.

### 3.7 Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo a partir de las colonias aisladas de las muestras de agua y en las muestras de aislamientos de micobacterias atípicas de origen clínico.

Los diferentes aislados se inocularon en medio de cultivo R2A líquido y se mantuvieron a una temperatura de 30 °C *overnight* (o/n) para ser sometidas a extracción del DNA por el método de CTAB y posteriormente ser analizadas.

Una vez se obtuvo el crecimiento de los cultivos puros en medio líquido, se centrifugaron 3 ml a 13.000 rpm, durante 5 min, para obtener un sedimento que constituía el punto de partida de la extracción de DNA. A continuación, se practicaba una lisis química y enzimática, resuspendiendo las células en 564 µl TE a pH 8,0. Para ello, se agregaron 30 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) 10 % (Sigma) y 6 µl de proteinasa K (10 mg/ml; Roche), incubando a 37 °C durante 2 horas. A continuación, la lisis aplicada fue de tipo mecánica o física al hacer pasar la suspensión repetidas veces a través una aguja de 0,6 µm de diámetro. Posteriormente, se añadieron 100 µl de NaCl 5M y, para favorecer la desproteinización, se agregaron 80 µl de CTAB/NaCl (bromuro de cetil-metil-amonio al 10 % en NaCl 0,7M), incubando 10 minutos a una temperatura de 65 °C.

Para separar los ácidos nucleicos de las proteínas, se realizó una extracción con disolventes orgánicos. Se extrajeron con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, 800 µl, y agitación a 37 °C durante 10 minutos, centrifugándose a continuación durante 5 minutos a 13.000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se añadieron 6 µl de RNasa a 10 mg/ml que actuó durante 10 minutos a 65 °C. Posteriormente, se añadió un volumen de fenol tamponado refrigerado y, tras mezclar adecuadamente, se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. Recuperada de nuevo la fase acuosa, se adicionó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), para volver a centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm. Recuperada la fase acuosa, se incluyó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), centrifugando posteriormente la mezcla durante 5 min a 13.000 rpm. Una vez se obtuvo la interfase limpia, se recuperó la fase acuosa y se añadió 0,1 volumen de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, para precipitar los ácidos nucleicos. Tras reposar durante 30 min a -70 °C,

se centrifugó durante 20 min a 13.000 rpm. Se añadieron 500 µl de etanol al 70 % (v/v) y se centrifugó la mezcla durante 10 min a 13.000 rpm. Tras decantar el sobrenadante y dejar secar el precipitado, se resuspendió cada muestra en 50 µl de agua MilliQ autoclavada.

La comprobación del DNA recuperado se hizo por electroforesis horizontal en gel de agarosa (SIGMA) al 1 % con TAE 1x (Sambrook y Russell, 2001) para comprobar el estado del DNA. Los geles se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) con luz ultravioleta en un transiluminador UVP.

### 3.8 Amplificación y secuenciación del DNA

Las muestras de DNA correspondientes a los cultivos puros aislados de las diferentes muestras, junto con las muestras de DNA de los aislamientos de micobacterias atípicas proporcionados por el Hospital *Son Llätzer*, se sometieron a la amplificación y secuenciación parcial del gen rDNA 16S. Únicamente en los aislamientos, que una vez analizadas sus secuencias se identificaban como miembros pertenecientes al género *Mycobacterium*, se amplificaron los genes ITS1, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB* y *sodA*, con cebadores específicos de micobacterias, tal y como se describe en el protocolo desarrollado por Gomila y colaboradores (2007). Los cebadores utilizados y sus especificaciones se muestran en la Tabla 5.

Las reacciones de PCR se prepararon para un volumen final de 50 µl de la mezcla de reacción de PCR, conteniendo tampón de reacción 10x (KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 9,0), desoxinucleósidos trifosfato a 200 µM (dNTPs, *Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH*, Freiburg, Alemania), 2,5 µl del cebador *forward* y del *reverse* (10 µM), 1,5 U Taq DNA polimerasa (*Amersham Biosciences*) y 1 µl de muestra de DNA de cada aislamiento. En el control negativo, se utilizó la misma mezcla de reacción añadiendo agua MilliQ autoclavada en lugar de la muestra de DNA.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler* personal (*Eppendorf*) y las condiciones para los cebadores universales del gen rDNA 16S fueron las siguientes: Desnaturalización inicial durante 5 minutos a 94 °C, seguida de treinta ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 94 °C, anillamiento de 1 minuto a 55 °C y elongación de 1 minuto y 30 segundos a 72 °C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 72 °C durante 10 minutos y refrigeradas a 4 °C, hasta su posterior análisis.



**Tabla 5.** Secuencias y especificaciones de los cebadores utilizados en el análisis multigénico de las micobacterias.

Gen	Cebadores	Secuencia de 5' a 3' <sup>a</sup>	Tamaño (pb)	Temperatura anillamiento (°C)	Referencia
<b>rDNA 16S</b>	16F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	60	Lane, 1991
	16R1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		60	
<b>ITS1</b>	sp1	ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC	200-330	60	Roth <i>et al.</i> , 2000b
	sp2	GATGCTCGCAACCACTATCCA			
<b>gyrB</b>	gyrBA	GAGTTGGTGCGGCGTAAGAGC	322	55	Dauendorffer <i>et al.</i> , 2003
	gyrBE	CGGCCATCCARCACGATCTTG			
<b>hsp65</b>	TB11	ACCAACGATGGTGTGCCAT	439	60	Steingrube <i>et al.</i> , 1995
	TB12	CTTGTCGAACCGCATACCCT			
<b>recA</b>	recF3	GGCAARGGYTCGGTSATGC	890	50/45	Blackwood <i>et al.</i> , 2000
	recF4	TCGACCAACTACTTCTARCG	390		
	recR2	TTGATCTTCTTCGATCTC		60	
<b>rpoB</b>	MycoF	GGCAAGGTCACCCGAAGGG	760	50-55	Adékambi <i>et al.</i> , 2003
	MycoR	AGCGGCTGCTGGGTGATCATC			
	MycoseqF	GAAGGGTGAGACCGAGCTGAC			
<b>sodA</b>	MycoseqR	GCTGGGTGATCATCGAGTACGG	495	60	Zolg y Philippi-Schulz, 1994/ Devulder <i>et al.</i> , 2005
	Z205F	ACGTTACACACAGCAAGCACCA			
	Z212R	TCGGCCCAGTTCACGACGTT			
	GSOD2R	TCGGCCAGTTCACGACGTTCCA			

<sup>a</sup>M= A/C; R= A/G; S= C/G; Y= C/T

Las reacciones de amplificación realizadas para el espaciador ITS1, y los genes *hsp65*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *sodA* de micobacterias, se especifican en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de la reacción de PCR para cada uno de los genes amplificados de micobacterias ambientales.

Pasos PCR	ITS1	<i>gyrB</i>	<i>hsp65</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>
Desnaturalización inicial (°C/min o seg)	96/5'	94/10'	96/5'	94/5'	95/10'	94/10'
Número de ciclos	38	40	35	5+25	35	40
Desnaturalización (°C/min o seg)	94/1'	94/1'	94/30"	94/1'	94/30"	94/30"
Anillamiento (°C)	60/1'	55/1'	60/30"	50-45/1'	50-55/30"	60/30"
Elongación (°C/min o seg)	72/1'	72/1'	72/2'	72/1'	72/1'30"	72/1'
Elongación final	72/10'	72/10'	72/10'	72/10'	72/5'	72/10'

Los productos resultantes de la PCR se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa (Sigma) al 1,5 % (p/v) con tampón TAE 1x (Sambrook y Russell, 2001), que se sometió a tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y fue visualizado a través de luz ultravioleta en un transiluminador UVP.

Una vez visualizadas y verificadas las bandas por electroforesis en gel de agarosa, se purificaron con el kit *Microcon centrifugal filter devices*/Microcon® YM-100 (Millipore), según indicaciones del fabricante y se comprobó la purificación del producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %. Finalmente, los insertos de los clones se secuenciaron en un solo sentido con los cebadores que se especifican en la Tabla 5. La mezcla de reacción para la PCR de secuenciación se hizo en base al kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing v.3.1* (*Applied Biosystems*), con las cantidades siguientes; 1,5 µl de tampón de secuenciación (5x), 2 µl de BigDye (versión 3.1), 0,5 µl de cebador, 2,5 µl o 5 µl del producto amplificado y purificado, según si la intensidad de la banda obtenida en la electroforesis en gel de agarosa era de mayor o menor intensidad respectivamente, y agua milliQ autoclavada hasta llegar al volumen final de 10 µl.

Las condiciones de la PCR de secuenciación para cada uno de los genes se indican en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Condiciones de la reacción de secuenciación de los distintos genes específicos de micobacterias ambientales analizados.

Pasos PCR secuenciación	ITS1	<i>gyrB</i>	<i>hsp65</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>
Desnaturalización inicial (°C/min o seg)	96/2'	96/2'	96/2'	96/2'	96/2'	96/2'
Número de ciclos	25	25	25	30	25	25
Desnaturalización (°C/min o seg)	96/15"	96/15"	96/15"	96/10"	96/15"	96/15"
Anillamiento (°C)	60/15"	55/15"	60/15"	60/15"	50-55/15"	60/15"
Elongación (°C/min o seg)	60/4'	60/4'	60/4'	60/4'	60/4'	60/4'

Las reacciones de secuenciación se precipitaron por el método especificado en el apartado 2.10 y se resuspendieron en 20 µl de agua MilliQ autoclavada para ser analizadas por separación electroforética en un analizador automático de secuencias ABI PRISM 3130 (*Applied Biosystems*), operado por técnicos de los Servicios Científico-Técnicos de la UIB.

### 3.9 Análisis filogenético de las secuencias de los aislamientos

Las secuencias obtenidas para cada uno de los genes se visualizaron individualmente y los posibles errores y/o ambigüedades se corrigieron manualmente mediante el programa Bioedit (Hall, 1999). Cada una de las secuencias de nucleótidos obtenidas, una vez corregidas, fueron analizadas por comparación con las secuencias disponibles en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). El resultado obtenido, para las secuencias del gen del rRNA 16S, se comparó con las secuencias de referencia del gen rDNA 16S de las especies tipo disponibles en el servidor EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Chun *et al.*, 2007).

Las secuencias de los distintos genes se alinearon con las secuencias más próximas obtenidas de la base de datos BLAST y el EzTaxon-e en el caso del gen rDNA 16S. El alineamiento se hizo por un método jerárquico de alineamiento múltiple implementado en la herramienta *Clustal X2* (<http://www.clustal.org/>; Larkin *et al.*, 2007). Las secuencias con posiciones alineadas

ambigua e incorrectamente se corrigieron de forma manual. Las similitudes y distancias evolutivas se calcularon con los programas implementados en PHYLIP (*Phylogenetic Inference Package*, versión 3.6) (Felsenstein, 2005). Los árboles filogenéticos fueron inferidos por el método Neighbor-joining con el modelo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) para estimar las distancias evolutivas. El análisis de *bootstrap* (1000 réplicas) se hizo con el paquete bioinformático PHYLIP. Los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500 se indican como porcentaje en los nodos correspondientes en cada uno de los árboles filogenéticos. La topología de los árboles se visualizó con el programa Tree View 1.6.6. (Page, 1996). Además de los árboles realizados para cada uno de los genes, se realizó un análisis concatenado de las secuencias obtenidas para cada gen.

Los aislados se asignaron a una misma especie cuando se agrupaban claramente en la misma rama que la cepa tipo de esa especie, y los valores de similitud en la secuencia del gen rDNA 16S eran iguales o superiores al 97 %. En los casos en los que la similitud con la especie tipo más próxima, fuese inferior al 97 % ese aislado se asignó únicamente al género correspondiente más próximo. Este criterio no se aplicó en los aislados afiliados al género *Mycobacterium*, ya que diferentes especies pueden compartir porcentajes de similitud superiores al 99 %.

En base a las diferentes estrategias aplicadas en este estudio para la detección de micobacterias por métodos dependientes de cultivo, se calculó la tasa de positividad según la relación del número total de aislamientos analizados, o número de muestras analizadas, respecto del número de aislamientos que se afiliaron a especies del género *Mycobacterium* sp. al realizar el análisis filogenético, o número de muestras donde se detectaron aislamientos de micobacterias.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA PRESENTE Y METABÓLICAMENTE ACTIVA EN EL AGUA DE HEMODIÁLISIS, MEDIANTE MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO



En el primer capítulo de la presente tesis doctoral, se exponen los resultados obtenidos en la caracterización de la comunidad microbiana presente en las aguas de hemodiálisis, mediante métodos independientes de cultivo basados en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos (DNA y RNA) de la muestra 1, obtenida en el punto M3 del sistema de distribución de aguas del Hospital *Son Llätzer*. El RNA se transcribió a DNA mediante la reacción de la transcriptasa reversa (RT). El producto obtenido mediante la RT y el DNA total se utilizaron para llevar a cabo una PCR con cebadores universales del gen del rRNA 16S. Los productos de PCR resultantes se clonaron y posteriormente se analizaron las secuencias de los clones obtenidos, para valorar la diversidad de la comunidad microbiana, la comunidad bacteriana metabólicamente activa y, específicamente, la presencia de miembros del género *Mycobacterium* en la muestra.

### **C1-1 CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DE LAS GENOTECAS DE rDNA 16S Y rRNA 16S**

Se realizaron y analizaron dos genotecas obtenidas a partir del producto de PCR amplificado del gen rDNA 16S (aproximadamente 900 pb) del DNA total y del producto de RT-PCR obtenido por transcriptasa reversa a partir del RNA total extraído, respectivamente.

En total, se obtuvieron y analizaron 126 clones: 64 clones de la genoteca del gen rDNA 16S, designados con un número y precedidos por la letra C, y 62 clones de la genoteca correspondiente a la RT-PCR designados con un número y precedidos de las letras RT. De los 126 clones obtenidos solo 92 de ellos, 50 clones para la genoteca del gen rDNA 16S y 42 para la RT-PCR, mostraron el tamaño de inserto esperado y se analizaron mediante secuenciación parcial con el cebador M13F del vector.

Los 92 electroferogramas de las secuencias correspondientes a los distintos clones obtenidos se analizaron visualmente y se corrigieron los posibles errores y/o ambigüedades, eliminándose las partes de la secuencia correspondientes al vector y no al inserto clonado. Las secuencias resultantes se analizaron con distintas herramientas para determinar las posibles quimeras y eliminarlas si fuese necesario. Las posibles secuencias quiméricas se determinaron con la herramienta CHIMERA-CHECK implementada en la pipeline RDP y con la herramienta Chimera-Uchime implementada en el programa Mothur versión 1.35.1.

La herramienta CHIMERA-CHECK mostró 4 posibles quimeras en total, 1 para la genoteca de DNA (C9) y 3 en la genoteca de la RT-PCR (RT25, RT42 y RT53), mientras que el algoritmo Chimera-Uchime estableció 18 quimeras en total, 15 en la genoteca de DNA (C1, C2, C7, C8, C11, C13, C14, C16, C22, C36, C37, C39, C46, C49 y C63) y 3 en la genoteca de la RT-PCR (RT13, RT33 y RT50). Al no haber una concordancia entre los distintos algoritmos utilizados y las posibles quimeras obtenidas, éstas se analizaron con más detalle de forma manual, dividiendo la secuencia obtenida para cada clon en fragmentos y analizando estos por separado. Si ambos fragmentos se asignaban a un mismo género o un género próximo, se consideraba que la

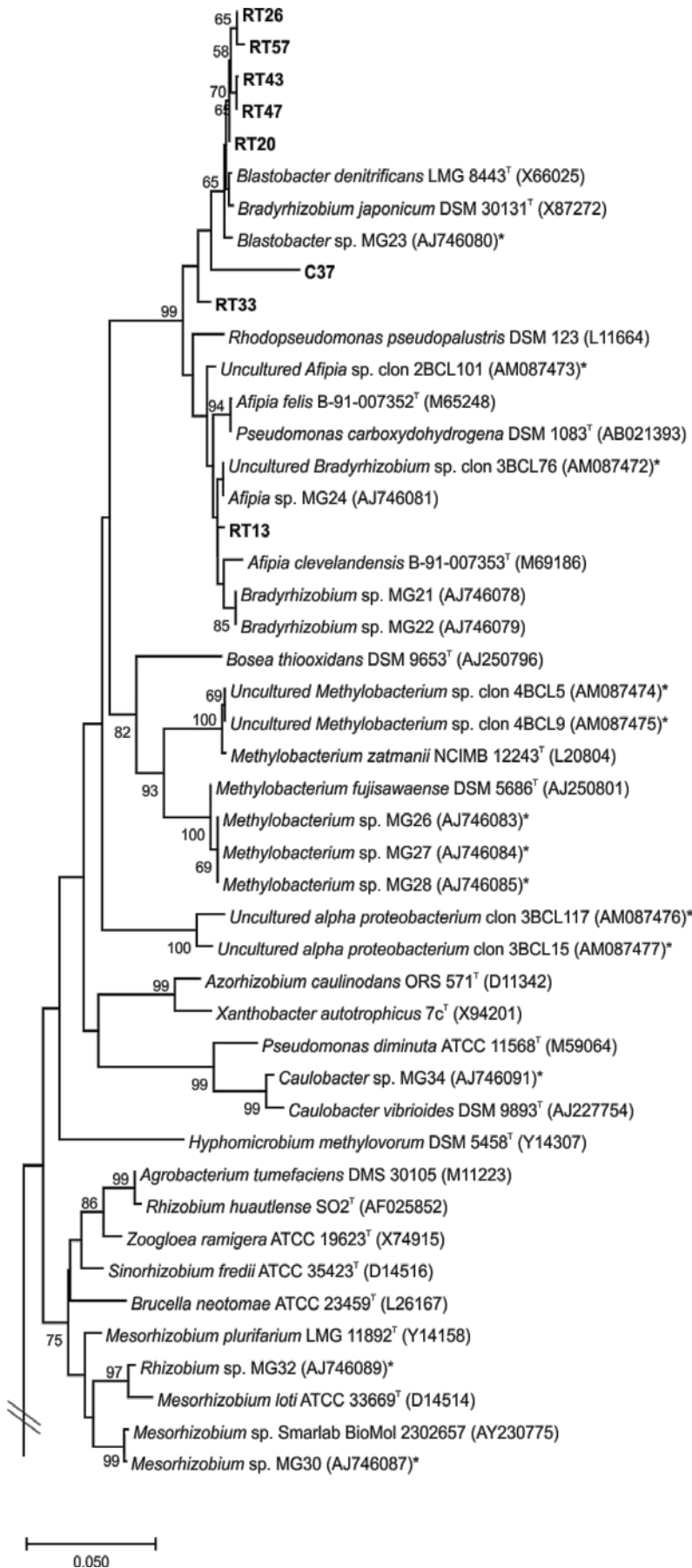
secuencia era válida. Todos los clones a excepción del clon C30 (no detectado por los métodos automáticos), que fue omitido del análisis posterior, se consideraron aceptables.

Cada una de las secuencias de nucleótidos obtenidas de los clones en las diferentes genotecas, una vez corregidas, fueron analizadas por comparación con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, mediante el programa BLAST, y se compararon con las secuencias de referencia del gen rDNA16S de las cepas tipo de especie disponibles en el servidor EzTaxon-e, con el fin de agruparlas por grupos filogenéticos. Los distintos clones se afiliaron filogenéticamente a la cepa/especie más próxima de las bases de datos, a nivel de género o especie, en función de los valores de similitud de secuencias. Las secuencias con similitudes iguales o superiores al 97 % se agruparon y se asignaron a la misma especie o grupo filogenético (filotipo). Los clones/filotipos que mostraban igual o más de un 97 % de similitud con alguna de las especies tipo presentes en la base de datos EzTaxon-e se asignaron a esa especie y, si el porcentaje de similitud era inferior al 97 % e igual o superior al 95 % se asignaron únicamente a nivel de género. En caso contrario, se utilizó para su identificación la secuencia más próxima disponible en la base de datos del NCBI.

La mayoría de los clones no se pudieron afiliar a nivel de género/especie (67). Treinta y ocho clones de la genoteca de DNA y 29 de los clones en el caso de la genoteca de RT-PCR mostraron menos de un 95 % de similitud con una especie/género reconocido. En las Tablas suplementarias S1 y S2 del anexo se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los clones de DNA y RT-PCR, respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó la correspondiente clasificación filogenética a nivel de filo, género y especie, y se realizaron los correspondientes árboles filogenéticos considerando las clases *Alpha-*, *Beta-* y *Gammaproteobacteria* y los filos *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria* (Figura 13-17). En los árboles filogenéticos individuales y con fines comparativos, se incluyeron las secuencias obtenidas en estudios previos por Gomila y colaboradores (2005 y 2006) en estas mismas muestras de aguas de hemodiálisis, analizadas mediante métodos dependientes e independientes de cultivo. Las secuencias obtenidas a partir de métodos dependientes de cultivo se indican con las siglas MG seguidas del número correspondiente (Gomila *et al.*, 2005), mientras que las secuencias correspondientes al método independiente de cultivo se indican con un número (2, 3 o 4) según el punto de muestreo analizado a lo largo del anillo de distribución; B o A según si se trataba de muestras antes o después del proceso de desinfección por hipercloración; y las siglas CL para indicar que son clones seguidos del número de clon correspondiente (Gomila *et al.*, 2006). Las secuencias de clones designadas con el número 3 al inicio son equivalentes a nuestros clones obtenidos.





**Figura 13.** Afilación filogenética de los clones secuenciados pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*. En el árbol filogenético se han incluido las secuencias obtenidas en estudios previos por Gomila y colaboradores (2005 y 2006) a partir de muestras de aguas de hemodiálisis, marcadas con un asterisco. La construcción del árbol filogenético se hizo en base al método de Neighbor-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el algoritmo de Jukes-Cantor. En los nodos se indican en porcentaje los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500. La barra indica la divergencia de la secuencia. En negrita se destacan los clones obtenidos en las genotecas de DNA (C) y RNA (RT). Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis.

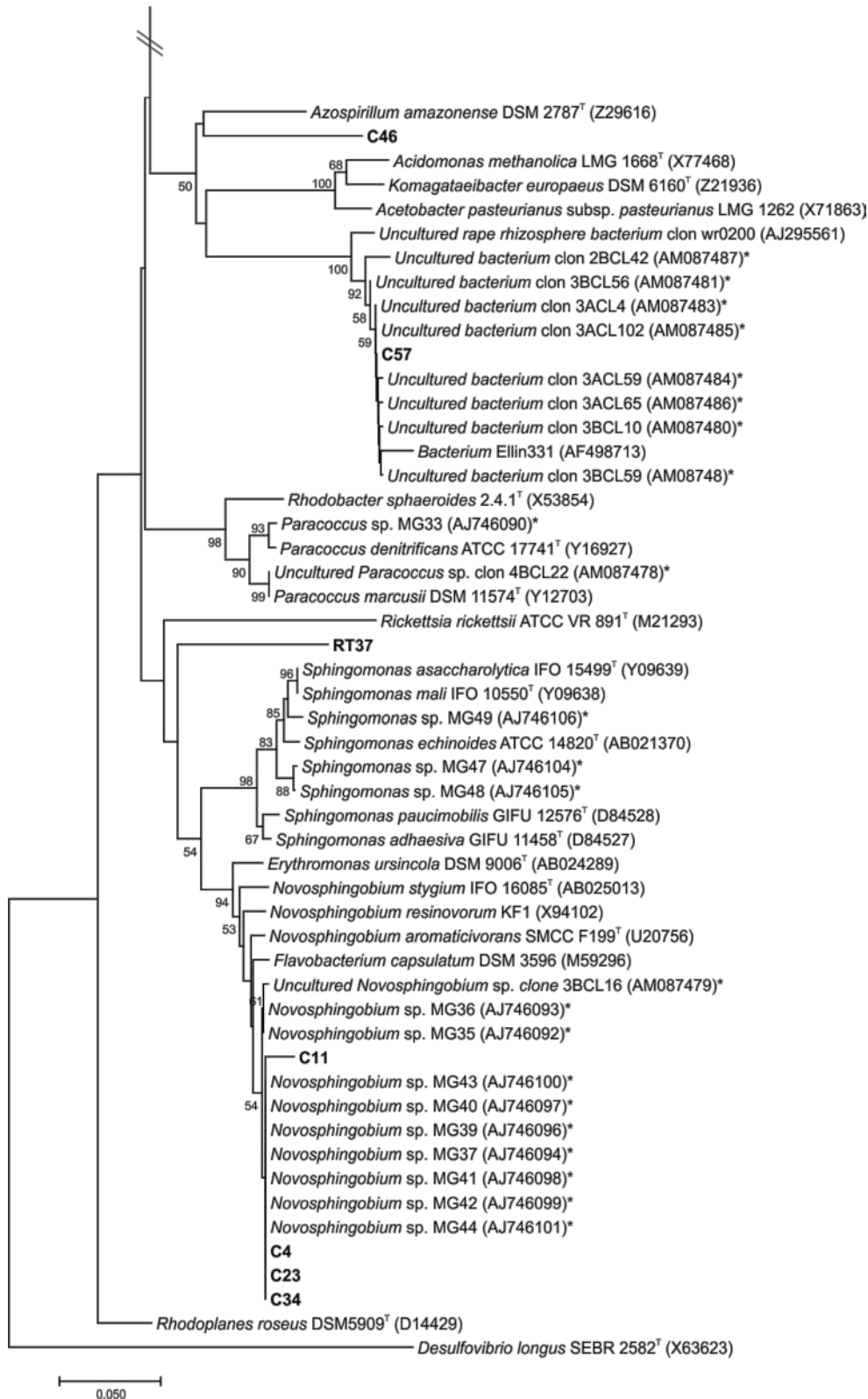
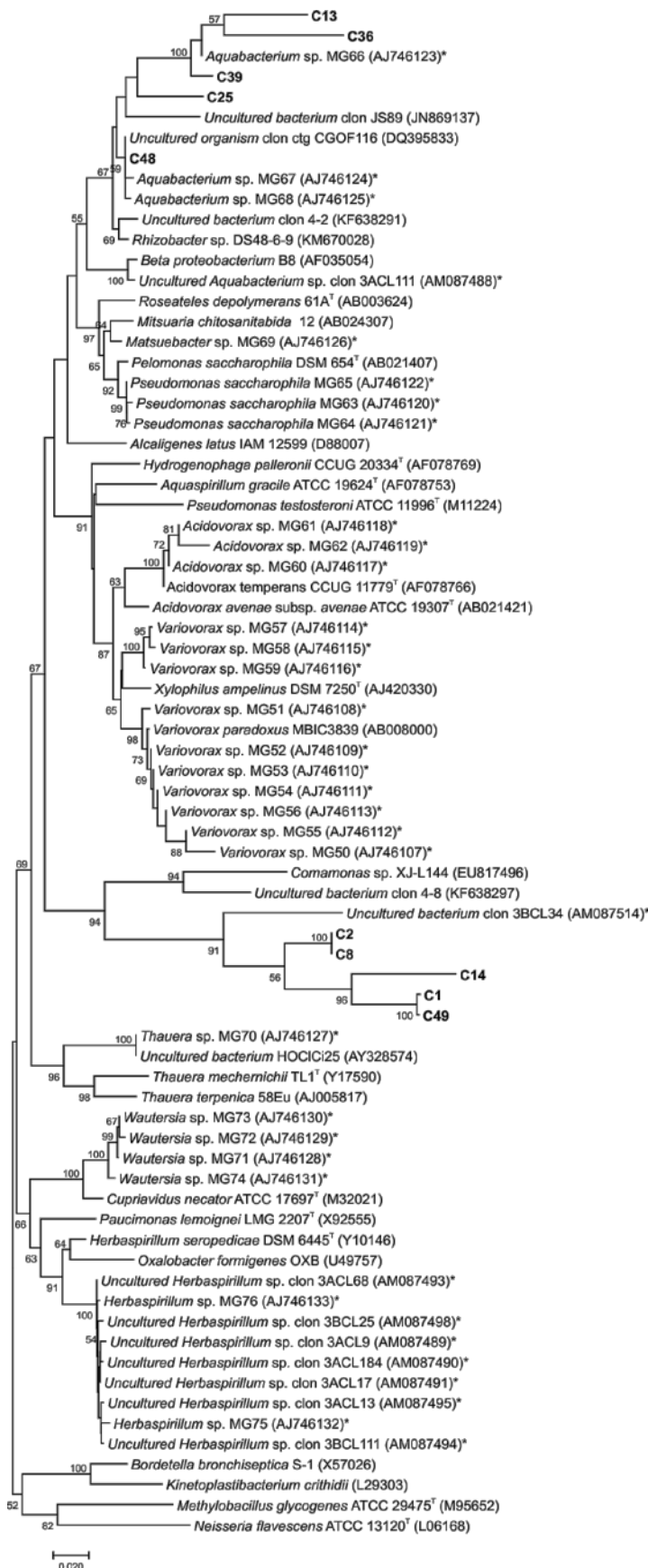
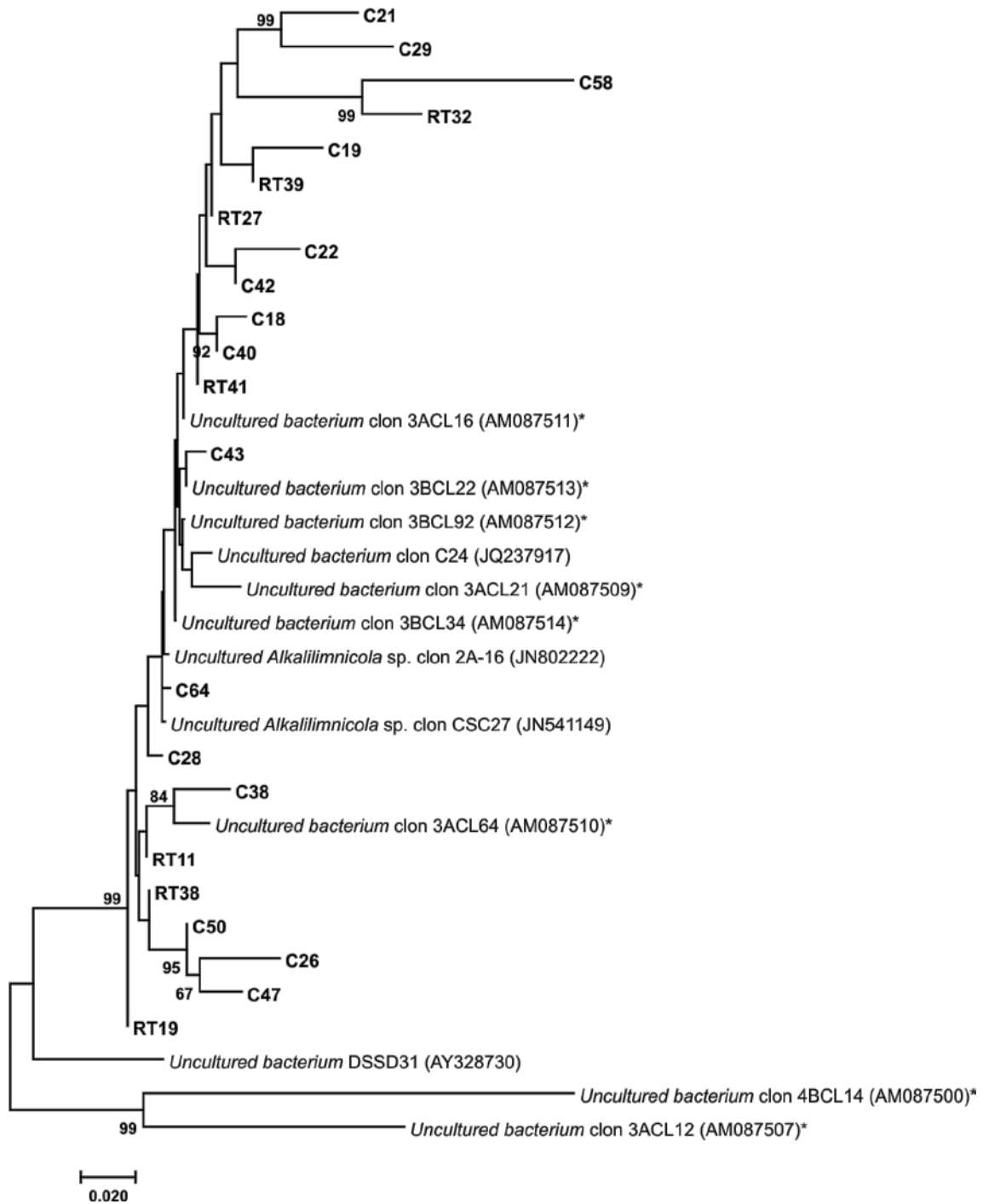


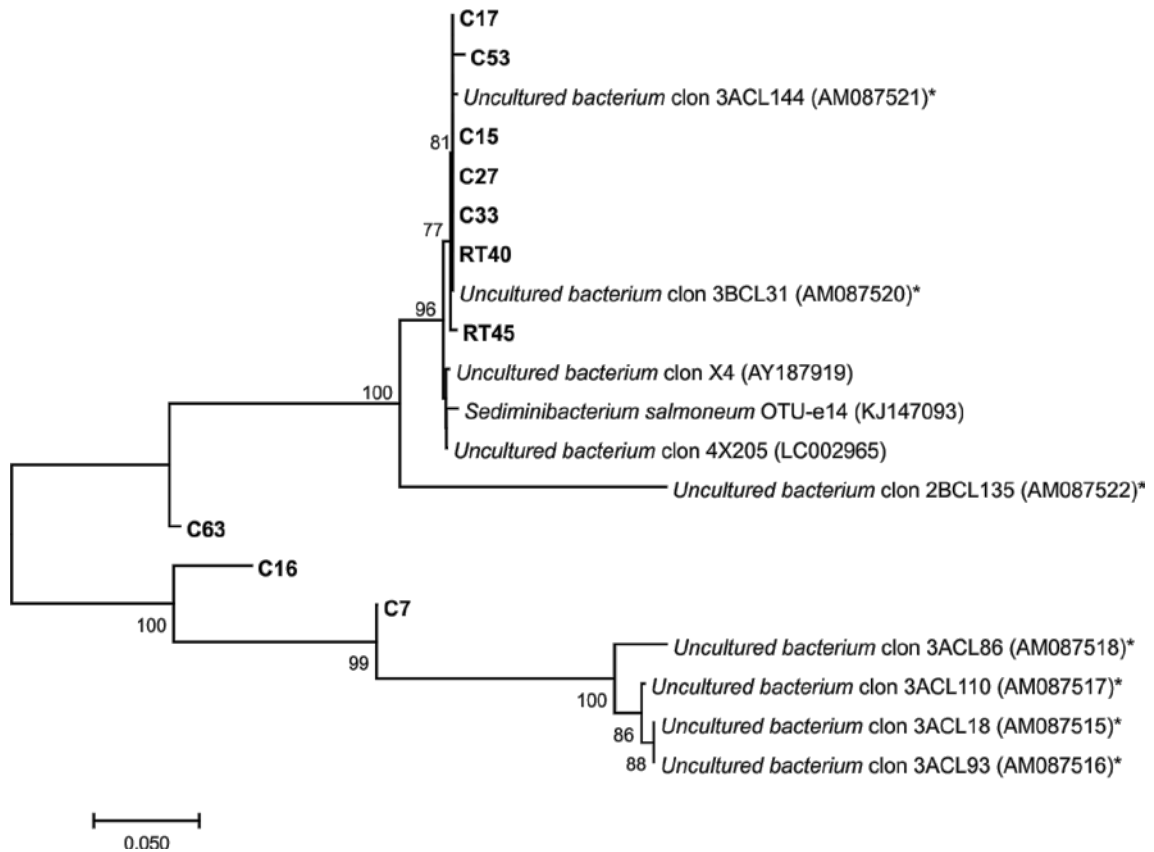
Figura 13. Continuación.



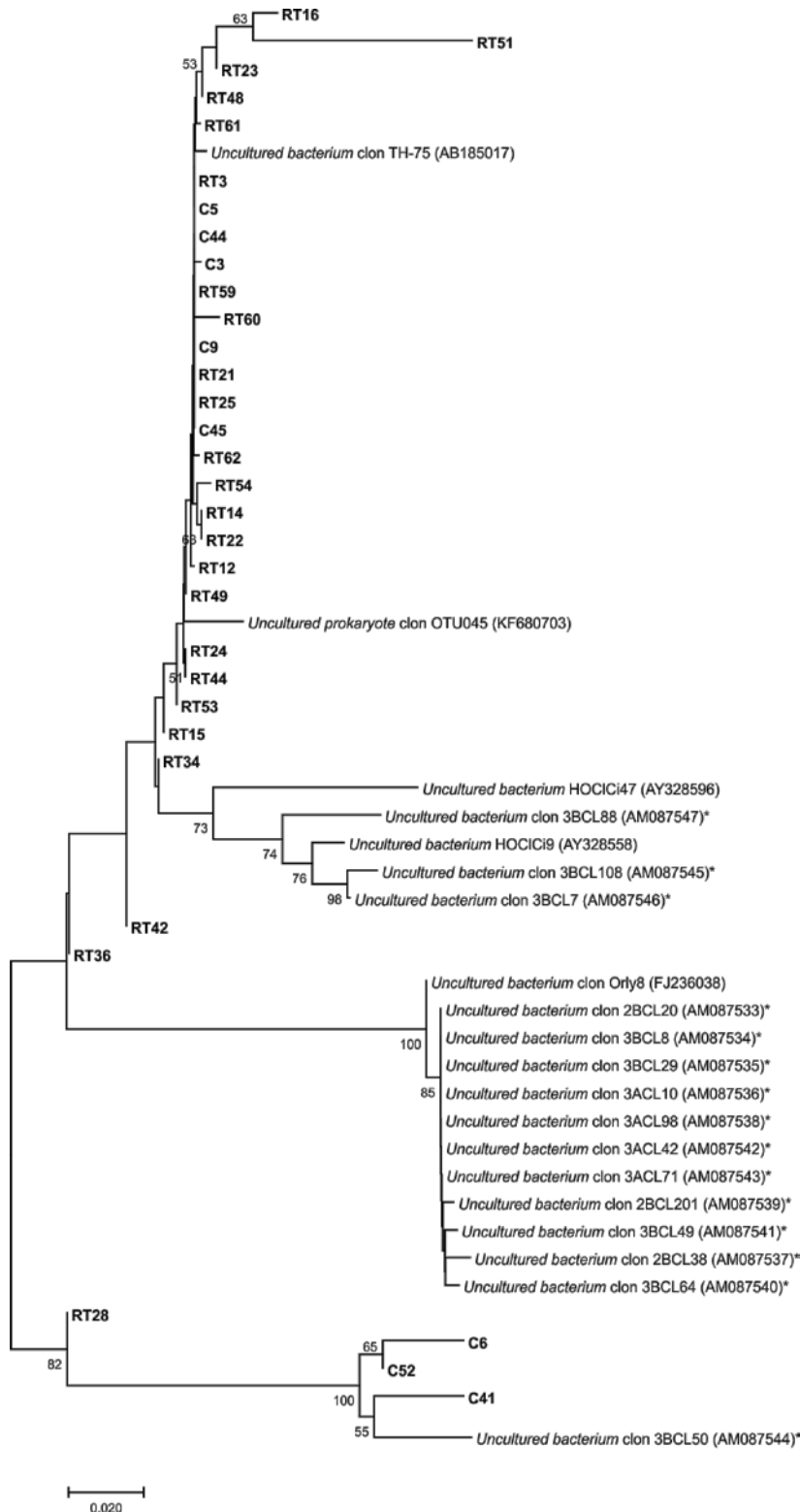
**Figura 14.** Afiliación filogenética de los clones secuenciados asignados a la clase *Betaproteobacteria*. En este árbol filogenético se han incluido las secuencias obtenidas en estudios previos por Gomila y colaboradores (2005 y 2006) a partir de muestras de aguas de hemodiálisis, marcadas con un asterisco. La construcción del árbol filogenético se hizo en base al método de Neighbor-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el algoritmo de Jukes-Cantor. En los nodos se indican los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500. La barra indica la divergencia de la secuencia. En negrita se destacan los clones obtenidos en la genoteca de DNA (C). Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis.



**Figura 15.** Afiliación filogenética de los clones secuenciados pertenecientes a la clase *Gammaproteobacterium*. En el árbol filogenético se han incluido las secuencias obtenidas en estudios previos por Gomila y colaboradores (2005 y 2006) a partir de muestras de aguas de hemodiálisis, marcadas con un asterisco. La construcción del árbol filogenético se hizo en base al método de Neighbor-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el algoritmo de Jukes-Cantor. En los nodos se indican en porcentaje los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500. La barra indica la divergencia de la secuencia. En negrita se destacan los clones obtenidos en las genotecas de DNA (C) y RNA (RT). Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis.



**Figura 16.** Afiliación filogenética de los clones secuenciados pertenecientes al filo *Bacteroidetes*. En el árbol filogenético se han incluido las secuencias obtenidas en estudios previos por Gomila y colaboradores (2005 y 2006) a partir de muestras de aguas de hemodiálisis, marcadas con un asterisco. La construcción del árbol filogenético se hizo en base al método de Neighbor-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el algoritmo de Jukes-Cantor. En los nodos se indican en porcentaje los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500. La barra indica la divergencia de la secuencia. En negrita se destacan los clones obtenidos en las genotecas de DNA (C) y RNA (RT). Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis.



**Figura 17.** Afiliación filogenética de los clones secuenciados pertenecientes al filo *Cyanobacteria*. En el árbol filogenético se han incluido las secuencias obtenidas en estudios previos por Gomila y colaboradores (2005 y 2006) a partir de muestras de aguas de hemodiálisis, marcadas con un asterisco. La construcción del árbol filogenético se hizo en base al método de Neighbor-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el algoritmo de Jukes-Cantor. En los nodos se indican en porcentaje los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500. La barra indica la divergencia de la secuencia. En negrita se destacan los clones obtenidos en las genotecas de DNA (C) y RNA (RT). Los números de acceso de las secuencias se indican entre paréntesis.

### C1-1.1 Análisis filogenético a nivel de filo, género y especie

Los grupos filogenéticos determinados a nivel de filo presentes en ambas genotecas, DNA y RNA, fueron los mismos: los filios *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* y *Proteobacteria*. En la genoteca del gen rDNA 16S, el filo predominante fue el de *Proteobacteria* con 33 clones (16 clones afiliados a la clase *Gammaproteobacteria*, 10 clones a la clase *Betaproteobacteria* y 7 a la clase *Alphaproteobacteria*), seguido de los filios *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria*, con 8 clones cada uno. Para la librería obtenida a partir de la RT-PCR, el filo predominante fue el de *Cyanobacteria* con 24 clones, seguido del filo *Proteobacteria* con 16 clones (9 clones afiliados a la clase *Alphaproteobacteria* y 7 a la clases *Gammaproteobacteria*) y por último, 2 clones asignados al filo *Bacteroidetes* (Tablas 8 y 9). Un tercio de los clones obtenidos fueron *singletons* (CS) o clones únicos (29 clones considerando ambas genotecas, 31,5 %). Se detectaron 8 clones únicos en la genoteca de RNA (19,05 %) y 21 clones en la genoteca de DNA (42,86 %), mostrando una diferencia significativa entre ambas librerías.

Los clones obtenidos a nivel de género y en los casos en los que fuese posible a nivel de especie, correspondían mayoritariamente a géneros no descritos hasta el momento, asignándose por secuencia la mayoría a especies no cultivadas (Tablas 8 y 9). Un total de 69 clones de los secuenciados (75,82 %), algunos de ellos presentes en ambas muestras, como el clon TH-75 con 20 representantes en la genoteca de RNA y 5 en la de DNA, no se afiliaron a ningún género descrito hasta el momento, siendo posiblemente representantes de nuevos grupos filogenéticos. Esta dificultad en la asignación filogenética de las secuencias obtenidas de los clones de las genotecas de RNA y DNA se ha detectado en otros estudios previos, como el realizado por Gomila *et al.*, 2006, en estas mismas aguas, o en un estudio reciente realizado con muestras de agua potable donde, alrededor del 60 % de los clones no se podían afiliar a géneros o especies conocidas (Revetta *et al.*, 2010).

Atendiendo a la afiliación filogenética, la mayoría de las secuencias de los clones de la genoteca de DNA se identificaron con clones obtenidos de ambientes acuáticos (67,3 %), relacionándose en su mayoría con los clones obtenidos en un estudio previo, realizado en las mismas aguas de hemodiálisis (Gomila *et al.*, 2005, 2006). En la genoteca de RNA el 52,4 % de los clones también se relacionaron con clones de ambientes acuáticos, como los obtenidos de muestras de biopelículas recogidas en sistemas de distribución de aguas metropolitanas (clon LIB056 A A04; Revetta *et al.*, no publicado).

El 37,5 % de los clones de la genoteca de DNA dentro del filo *Bacteroidetes*, no se pudo asignar a ningún género conocido, al mostrar menos de un 95 % de similitud con una especie conocida, mientras que en el caso de la genoteca de RNA el 100 % de los clones de este filo se pudieron asignar a un género y especie; *Sediminibacterium salmoneum* aislado OTU-e14.

Ninguno de los clones de la genoteca de DNA asignados al filo *Cyanobacteria* se afilió a un género descrito hasta el momento. El 87,5 % de los clones afiliados a este filo en la genoteca de RNA y el 100 % de los de la genoteca de DNA, no alcanzaba el 95 % de similitud con ninguna secuencia de la base de datos y el resto de clones de este filo, aunque presentaba elevada

similitud con la secuencia de un clon de la base de datos, no se asignaba a ningún género descrito. Destaca el elevado porcentaje de clones de este filo en la genoteca de RNA, junto con el elevado porcentaje de géneros no cultivados hasta el momento. En estudios basados en genotecas de RNA realizados en muestras de agua potable, tampoco aparece este filo como mayoritario aunque sí se detecta su presencia (Revetta *et al.*, 2010).

En el caso del filo *Proteobacteria*, no se pudo asignar a nivel de género/especie el 78,8 % de los clones para la genoteca de DNA y el 90,3 % para la genoteca RNA. A nivel de clase, el 100 % de los clones del grupo *Gammaproteobacteria* en ambas genotecas no se pudo asignar a ningún género. El 80 % de los clones incluidos en la clase *Betaproteobacteria* de la genoteca de DNA podrían representar géneros nuevos y en la clase *Alphaproteobacteria*, un 28,6 % en la genoteca de DNA y un 87,5 % en la de RNA.

Ninguno de los clones obtenidos de las dos librerías se relacionó con especies del género *Mycobacterium*.

Al comparar los resultados obtenidos en ambas genotecas, cabe resaltar que 43 clones estuvieron presentes en ambas, asignándose a los filos *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* y *Gammaproteobacteria*. Veinticinco clones, 5 clones en la genoteca de DNA y 20 clones en la genoteca de RNA, se afiliaron al clon TH-75, con un 99 % de similitud en el filo *Cyanobacteria*. Siete clones, 5 en la genoteca de DNA y 2 clones en la genoteca de RNA, se afiliaron al clon 4X205 con un 99 % de similitud y al aislado identificado como *Sediminibacterium salmoneum* OTU-e14 con un 98 % de similitud, así como con el clon 3BCL31 (99 %) obtenido en un estudio previo, llevado a cabo en el Hospital *Son Llätzer*. Los 15 clones restantes pertenecientes al filo *Gammaproteobacteria*, 8 en la genoteca de DNA y 7 clones para la genoteca de RNA, mostraron más de un 98 % de similitud con el grupo de clones 3ACL18/3ACL21/3ACL64, identificados en un estudio previo llevado a cabo en este mismo hospital. Los clones de cada uno de los grupos mostraron más de un 98 % de similitud entre ellos.

En general, el análisis filogenético comparativo de los resultados obtenidos en la genoteca de DNA y RNA mostró una diversidad más elevada en la genoteca de DNA que en la de RNA, donde los grupos más abundantes y presentes en la muestra no se correspondían con los grupos mayoritarios con actividad metabólica, sugiriendo que no todos los microorganismos presentes en el agua son metabólicamente activos. La menor diversidad en la genoteca de RNA es debida al elevado porcentaje de clones afiliados al filo *Cyanobacteria*. La presencia del filo *Cyanobacteria* en estos hábitats tiene importantes implicaciones clínicas y epidemiológicas por la posible producción y liberación al medio acuático de cianotoxinas que podrían producir una respuesta inflamatoria en los pacientes sometidos a hemodiálisis (Gomila *et al.*, 2006).

Los resultados se compararon con los obtenidos previamente por métodos dependientes e independientes de cultivo, en este mismo hospital y punto de muestreo (Gomila *et al.*, 2005, 2006). Los resultados obtenidos en el citado estudio fueron muy parecidos a los resultados previamente obtenidos por las técnicas independientes de cultivo (Gomila *et al.*, 2006), basados en el análisis de varias genotecas del gen del rRNA 16S realizadas en el punto M3 del



sistema de distribución de agua de hemodiálisis. Un total de 25 de los clones obtenidos en este estudio mostraron una elevada similitud de secuencia con secuencias obtenidas en el estudio previo, tal y como se detalla en las Figuras 13-17 y en las Tablas 8 y 9.

En comparación con un estudio previo, independiente de cultivo basado en la pirosecuenciación de la primera mitad del gen del rRNA 16S, realizado en muestras de aguas de hemodiálisis del Hospital Universitario *Son Espases* y tomadas en un punto equivalente al M3 objeto de estudio (Tesis doctoral de Claudia Prince, 2014), se demuestra que la diversidad analizada en la muestra 1 presenta ciertas coincidencias en la genoteca de DNA y ninguna coincidencia con la genoteca de RNA. Atendiendo a la clasificación de filo, en dicho estudio, se imponen las *Proteobacteria* como el filo más abundante, al igual que en la genoteca realizada a partir del DNA de la muestra 1, a diferencia del filo *Cyanobacteria*, mayoritario en la genoteca de RNA. Resulta interesante que el filo *Proteobacteria* también aparece como el filo mayoritario en el estudio realizado por Revetta y colaboradores (Revetta *et al.*, 2010), basados en genotecas de RNA de muestras de agua potable, al igual que en la genoteca de DNA de la muestra 1 y a diferencia de la genoteca de RNA.

El segundo grupo más abundante, obtenido en el estudio del Hospital Universitario *Son Espases*, fue el filo *Bacteroidetes*, coincidiendo con la genoteca de DNA analizada de la muestra 1 donde el filo *Bacteroidetes* presenta la misma abundancia que el filo *Cyanobacteria*, pero difiere del detectado en la genoteca RT-PCR, representado por el filo *Proteobacteria*. Los filos más abundantes que aparecen en tercer y cuarto puesto en el estudio de pirosecuenciación, *Actinobacteria* y *Firmicutes*, no aparecen representados en ninguna de las dos genotecas analizadas. A nivel de la clase más abundante, el estudio del Hospital Universitario *Son Espases* mostró una mayor abundancia de la clase *Alphaproteobacteria* frente a la clase *Gammaproteobacteria* obtenida en la genoteca de DNA y *Cyanobacteria* en la de RNA. Por último, el género más abundante obtenido en la muestra analizada por pirosecuenciación venía representado por *Bradyrhizobium*, mientras que en las genotecas analizadas de la muestra del Hospital *Son Llätzer*, los resultados revelaron como géneros mayoritarios *Sediminibacterium*, *Acidiferrobacter*/ *Thiohalomonas*/ *Thiohalophilus* y un género no descrito del filo *Cyanobacteria*, para la genoteca de DNA, y un género no descrito hasta el momento del filo *Cyanobacteria*, para la de RNA.

**Tabla 8.** Asignación filogenética a nivel de filo, clase, género y especie de los clones obtenidos en la genoteca de DNA indicándose a su vez el número de clones para cada asignación y el porcentaje de similitud.

Filo	Clase	Género <sup>a</sup>	Clon y/o especie más próxima <sup>a</sup>	N° clones <sup>b</sup>	Similitud (%)		
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sediminibacterium	Clon 4X205/3BCL31/Sediminibacterium salmonicum OTU-e14	5	99/98		
			Bacteroidetes clon Elev_16S_1334	1	92		
Cyanobacteria		Cyanobacterium *	Bacteroidetes clon QEDN2DH10/Sediminibacterium salmoneum OTU-e14	1	90/89		
			Clon FL_02_12/Sediminibacterium sp. OTC5a	1	92/91		
			Clon TH75/Cyanobacterium * TDX16	5	99/93		
			Clon 3BCL50/Cyanobacterium * TDX16	1	95/89		
			Clon OTU63/Cyanobacterium * TDX16	1	98/88		
			Clon 3BCL50/Cyanobacterium * TDX16	1	96/89		
			Clon S2P3006/Bradyrhizobium genosp. TUXTLAS-12 1648v	1	96/93		
			Novosphingobium sp. MG37, MG42, MG44	4	98/99		
			Reyranella sp. B6.10-109	1	99		
			Clon MABRDTU38/Candidatus Nucleicultrix amoebiphila	1	99/94		
Proteobacteria	Alphaproteobacteria		Comamonas sp. XJ-L144	2	90		
			Clon 3BCL34/Herbaspirillum sp. AU13533	2	95/91		
			Clon 3ACL64/Piscinibacter aquaticus NBRC 102349	1	94/90		
			Clon 4-2/Rhizobacter sp. DS48-6-9	1	93/92		
			Clon ctg CGOF116/Rhizobacter sp. DS48-6-9	1	100/99		
			Aquabacterium sp. MG67	1	96		
			Aquabacterium sp. MG67	2	91		
			Clon 3ACL18/3ACL21, 3ACL64/Thiohalomonas denitrificans HLD_14/Acidiferrobacter sp. SPII_3	8	98/91		
			Clon 3ACL34/Ectothiorhodospinus mongolicus M9	1	95/89		
			Clon 3BCL22/Acidiferrobacter sp. SPIII_3	1	97/89		
Gammaproteobacteria	Sphingobacteriia		Clon 3BCL92/Acidiferrobacter sp. SPIII_3	1	96/90		
			Clon 3BCL34/Acidiferrobacter sp. SPIII_3	1	98/90		
			Clon 3ACL64/Acidiferrobacter sp. SPII_3	1	98/91		
			Clon 3ACL18/Acidiferrobacter thiooxydans m-1 <sup>†</sup>	1	99/92		
			Clon HL-L 0-11 bac35/Thiohalobacter thiocyanaticus HRh1	1	90/89		
			Clon GFC_062/Natronocella acetitrilica ANL 1	1	89/86		
			Ectothiorhodospinus				
			Acidiferrobacter				
			Thiohalobacter				
			Natronocella				

\* Género taxonómicamente no descrito, asignado al filo Cyanobacteria; <sup>†</sup>Para cada clon se ha indicado la asignación filogenética al género y especie más próxima a pesar de que en algunos casos el porcentaje de similitud fuese inferior al 95 %. En los casos que la mejor afiliación fuese un clon se ha indicado también el género o especie más próxima con los respectivos porcentajes de similitud; <sup>b</sup>Número de clones asignados al mismo grupo o filotipo al mostrar similitudes iguales o superiores al 97 % entre ellas.

**Tabla 9.** Asignación filogenética a nivel de filo, clase, género y especie de los clones obtenidos en la genoteca de RNA indicándose a su vez el número de clones para cada asignación y el porcentaje de similitud.

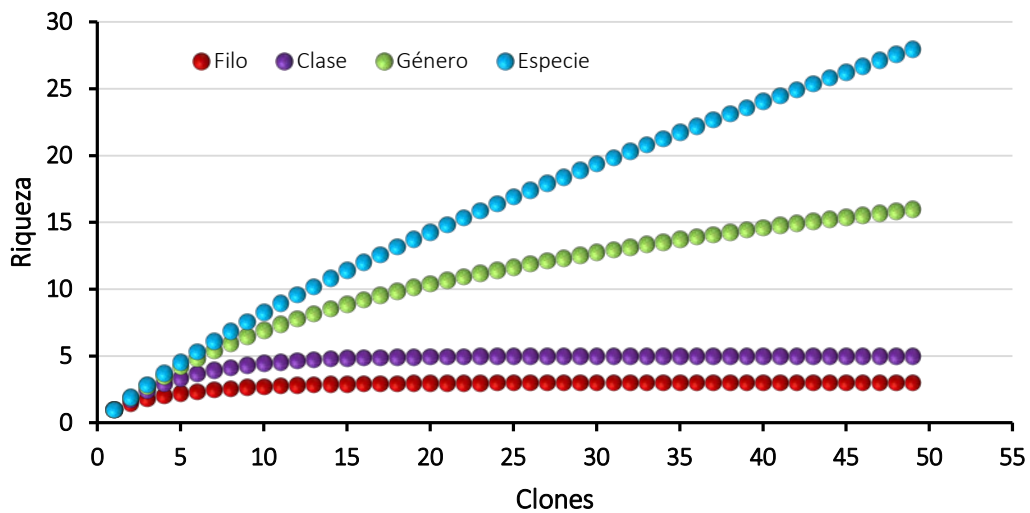
Filo	Clase	Género <sup>a</sup>	Clon y/o especie más próxima <sup>a</sup>	N° clones <sup>b</sup>	Similitud (%)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sediminibacterium</i>	Clon 4X205/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	2	99/98
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacterium</i> *	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	20	99/92
			Clon B1NR70D1/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	1	94/90
			Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	1	100/95
			Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	1	99/95
			Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	1	99/95
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	Clon LIB056 A A04/clon 3ACL18/ <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6187	5	98/99
			Clon FFCH13690/ <i>Bradyrhizobium denitrificans</i> NBRC_105663	1	97/97
			Aislado 111285545228/ <i>Bradyrhizobium ferriligni</i> CGBAU 51501	1	97
		<i>Mesorhizobium</i>	Clon S2P1085/ <i>Mesorhizobium</i> sp. PN6	1	98/98
		<i>Novosphingobium</i>	Clon LIB073_B_F07/ <i>Novosphingobium</i> sp. 2PR51-13	1	89/84
		<i>Gammaproteobacteria</i>	Clon 3ACL18/ <i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> strain m-1 <sup>1</sup> / <i>Natronocella acetinitrilica</i> ANL 1	7	99/91/92

\*Género taxonómicamente no descrito asignado al filo *Cyanobacteria*; <sup>a</sup>Para cada clon se ha indicado la asignación filogenética al género y especie más próxima a pesar de que en algunos casos el porcentaje de similitud fuese inferior al 95 %. En los casos que la mejor afiliación fuese un clon se ha indicado también el género o especie más próxima con los respectivos porcentajes de similitud; <sup>b</sup>Número de clones asignados al mismo grupo o fliotipo al mostrar similitudes iguales o superiores al 97 % entre ellas.

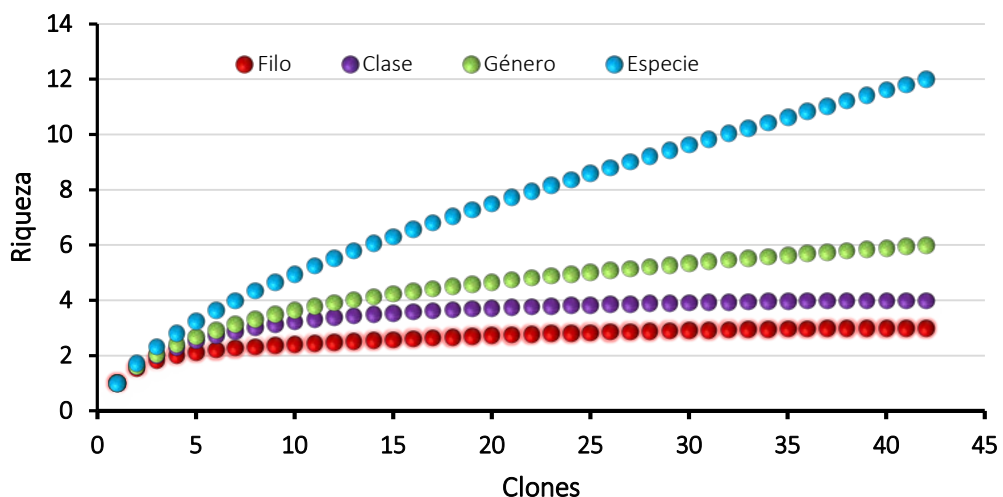
## C1-2 DIVERSIDAD BACTERIANA

La diversidad bacteriana para cada librería se estimó mediante las curvas de rarefacción y los índices de diversidad. Éstos se analizaron para cuatro sets de datos en cada genoteca, correspondientes a los distintos niveles de afiliación filogenética: filo, clase, género y especie.

En las Figuras 18 y 19 se muestran las curvas de rarefacción obtenidas para cada librería, que a nivel de género y especie no alcanzaron un perfil claro de saturación, indicando que la diversidad real es mayor que la detectada.



**Figura 18.** Curvas de rarefacción obtenidas para el análisis de los 49 clones de la genoteca de DNA, considerando los diferentes niveles de afiliación filogenética: filo, clase, género y especie.



**Figura 19.** Curvas de rarefacción obtenidas para el análisis de los 42 clones de la genoteca de RNA considerando los diferentes niveles de afiliación filogenética: filo, clase, género y especie.

A nivel de especie, considerando los *singletons* y comparando ambas genotecas (Figura 20) se observa que las curvas tienden a mantenerse en la zona de correlación lineal entre el número de clones analizados y la riqueza de especies. La genoteca de DNA evidencia una muestra más diversa, donde las especies tienen una baja probabilidad de ser halladas, y por tanto, se requieren más individuos que en la genoteca de RNA para que la curva alcance la asíntota.

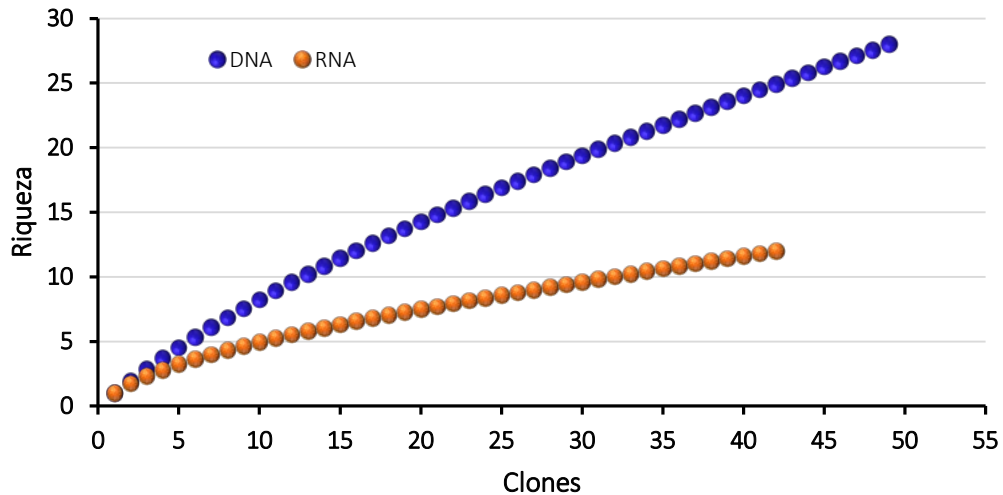


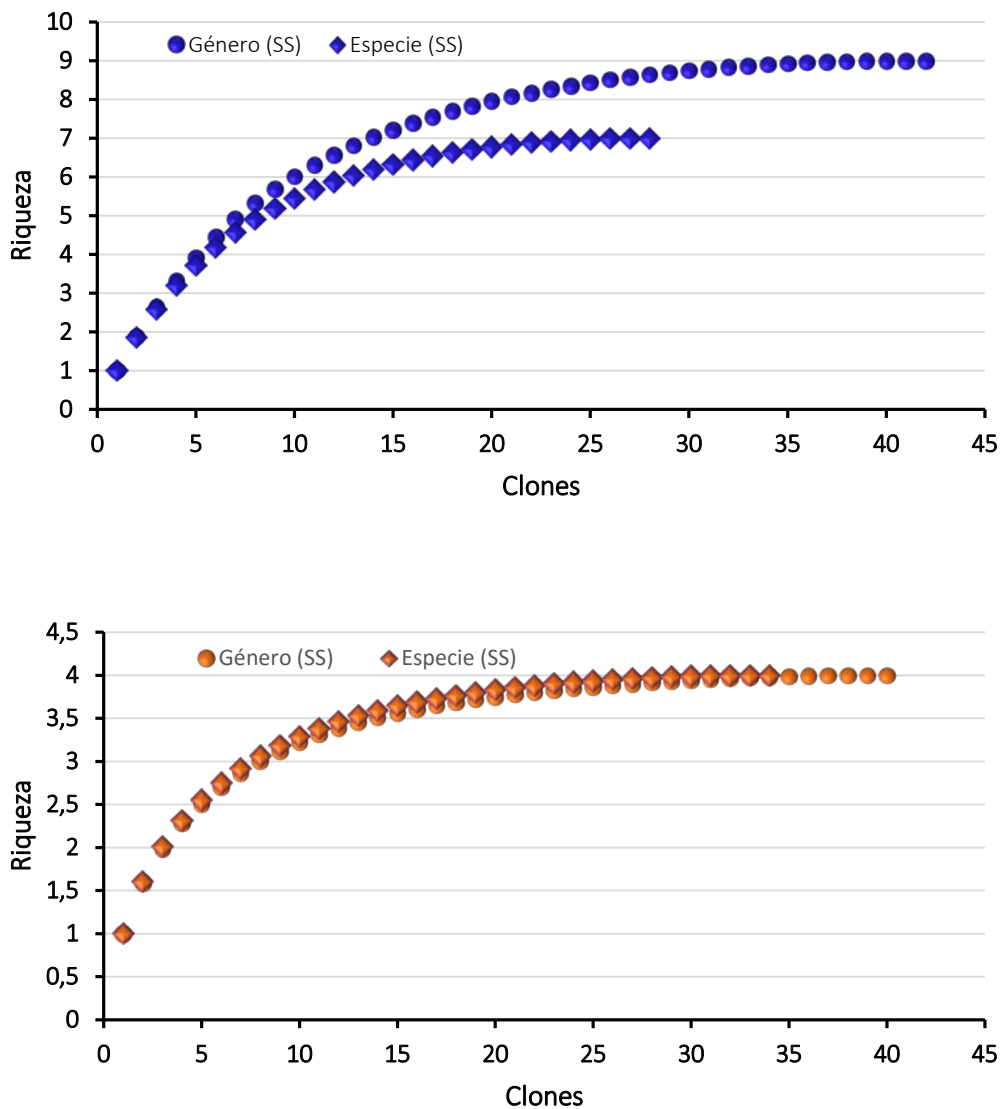
Figura 20. Curvas de rarefacción a nivel de especie de la genoteca de DNA y RNA.

Adicionalmente, se calculó una curva de rarefacción para cada genoteca (Figura 21) que no incluía los *singletons* o clones únicos a nivel de género y especie. En las citadas curvas comparativas, tal y como era de esperar, se observa que el análisis de los clones de la genoteca sin considerar los *singletons*, alcanza la asíntota o el perfil de saturación claro. La asíntota horizontal se alcanza con rapidez, en torno a 25 clones y con una riqueza de 7 especies y 35 clones con una riqueza de 9 géneros, para la genoteca de DNA y alrededor de 30 clones con una riqueza de 4 especies y géneros para el caso de la genoteca de RNA.

La diversidad total obtenida a nivel de filo, clase, género y especie en la muestra analizada se estimó mediante el cálculo de determinados índices de diversidad, como el de Shannon (H), Simpson y equitabilidad utilizando el programa PAST. En la Tabla 10 se detallan los resultados obtenidos para cada índice y para las dos consideraciones tenidas en cuenta; con *singletons* (CS) y sin *singletons* (SS), a nivel de género y especie.

Se calculó el índice de representatividad de la genoteca dentro de la comunidad mediante la estimación de la cobertura a nivel de género y especie para cada genoteca. Tal y como se muestra en la Tabla 10, se alcanzaron coberturas del 85,7 % a nivel de género y del 57,1 % a nivel de especie para la genoteca de DNA, por lo que se estima que la muestra es muy diversa y que no se ha caracterizado suficientemente, especialmente a nivel de especie. En la genoteca de RNA, la cobertura a nivel de género se estimó en el 95,2 % y a nivel de especie en el 80,9 %, por lo que consiguió una mejor representación en la genoteca de RNA que en la

de DNA, indicando que la población activa metabólicamente era menos diversa a nivel de especie que la población total.



**Figura 21.** Curvas de rarefacción a nivel de especie y género sin considerar los *singletons* para la genoteca de DNA (azul) y RNA (naranja).

El índice de Margalef, de riqueza específica de la muestra considerando simultáneamente el número de especies y el número de individuos, se calculó para cada genoteca obteniéndose un valor de 6,95 para la genoteca de DNA, que indicaba una elevada diversidad específica, y de 2,94 para la genoteca de RNA, señalando una diversidad específica por debajo de la mitad encontrada en la genoteca de DNA.

En el cálculo del índice de Berger-Parker, de abundancia relativa de la especie más numerosa, se adquirió un valor en torno a 0,48 que, expresado en porcentaje, suponía un 47,62 % de dominancia de la especie más abundante en la genoteca de RNA y del 16,33 % para la genoteca

de DNA. Estos valores obtenidos sugerían que en la población activa metabólicamente se alcanzaba una dominancia mayor de la especie más abundante que en la genoteca de DNA.

El índice de dominancia obtenido fue del orden de 0,2 en el caso de la genoteca de RNA y del 0,07 para la genoteca de DNA. Teniendo en cuenta que su valor se acota entre 0 y 1, se interpreta que las especies de la muestra analizada tienden a estar presentes, sin una especie dominante dentro de la comunidad, en ambas genotecas aunque sea más evidente en la genoteca de DNA.

En el cálculo de los índices de Simpson, cuyo valor se considera fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes, se obtuvieron valores de 0,93 en la genoteca de DNA y 0,72 para la de RNA. Por otro lado, en el índice de Shannon, de heterogeneidad de la comunidad, se mostraron valores de 1,76 para la genoteca de RNA y 3,03 para la de DNA, sugiriendo una elevada heterogeneidad en la muestra, más marcada en la genoteca de DNA.

Los índices obtenidos de *Equitability* ( $J$ ), de uniformidad de la comunidad, se consideran elevados en ambos casos con valores de 0,71 para la genoteca de RNA y 0,91 en la de DNA, indicando que las especies tienden a ser igualmente abundantes, situación más evidente en la genoteca de DNA.

El índice de *Evenness* o uniformidad de Buzas y Gibson, de uniformidad de la distribución de especies se enmarcó en un valor de 0,49 en la genoteca de RNA y de 0,74 para la de DNA indicando una distribución que tiende a ser uniforme, en menor grado para la genoteca de RNA.

En cuanto al índice de Chao 1, estimador del número de especies en una comunidad basado en el número de especies raras o poco abundantes en la muestra, se mostró que la cantidad de especies previstas en la muestra analizada de la genoteca de DNA era de 80,5 y de 26 para el caso de la genoteca de RNA, estimándose tres veces menos especies para la comunidad metabólicamente activa, e indicando que no se había analizado la diversidad total de la muestra al detectar solo 28 y 12 grupos filogenéticos diferentes.

En resumen, los índices calculados a partir de los resultados mostraron a nivel general una mayor diversidad para la genoteca de DNA que la de RNA e indicaron que no se había analizado la diversidad total de la muestra.

**Tabla 10.** Índices de diversidad y cobertura de las dos genotecas obtenidas, RNA y DNA, a nivel de filo, clase, género y especie.

	Filo		Clase			Género			Especie			
	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA (CS)	RNA (SS)	DNA (CS)	DNA (SS)	RNA (CS)	RNA (SS)	DNA (CS)	DNA (SS)
Grupos filogenéticos	3	3	4	5	6	4	16	9	12	4	28	7
Individuos	42	49	42	49	42	40	49	42	42	34	49	28
Dominancia (D)	0,47	0,51	0,40	0,22	0,39	0,42	0,11	0,14	0,28	0,41	0,07	0,18
Simpson (1-D)	0,53	0,49	0,60	0,78	0,61	0,58	0,89	0,86	0,72	0,59	0,93	0,82
Shannon (H)	0,83	0,86	1,09	1,56	1,24	1,07	2,44	2,05	1,76	1,09	3,03	1,82
Evenness (e <sup>H</sup> /S)	0,77	0,79	0,75	0,95	0,58	0,73	0,72	0,86	0,49	0,74	0,74	0,88
Brillouin (HB)	0,75	0,78	0,98	1,41	1,08	0,94	2,06	1,77	1,46	0,95	2,43	1,52
Menhinick (D <sub>Mn</sub> )	0,46	0,43	0,62	0,71	0,93	0,63	2,29	1,39	1,85	0,69	4,00	1,32
Margalef (D <sub>Mg</sub> )	0,54	0,51	0,80	1,03	1,34	0,81	3,85	2,14	2,94	0,85	6,94	1,80
Equitability (J)	0,76	0,78	0,79	0,97	0,69	0,77	0,88	0,93	0,71	0,78	0,91	0,93
Fisher_alpha (S)	0,74	0,70	1,09	1,39	1,92	1,11	8,27	3,51	5,61	1,18	27,15	3,00
Berger-Parker (d)	0,57	0,67	0,57	0,33	0,57	0,60	0,16	0,19	0,48	0,59	0,16	0,29
Chao-1	3	3	4	5	6,5	4	21,25	9	26	4	80,5	7
Cobertura (C) (%)	100	100	100	100	95,24	100	85,71	100	80,95	100	57,14	100



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## CAPÍTULO 2

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE  
MICOBACTERIAS AMBIENTALES ASOCIADAS A  
SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUAS  
PURAS, MEDIANTE MÉTODOS  
INDEPENDIENTES DE CULTIVO



En el segundo capítulo de la presente tesis doctoral se exponen los resultados obtenidos en el análisis de la diversidad de micobacterias ambientales asociadas a sistemas de distribución de aguas puras utilizando métodos independientes de cultivo.

El DNA total aislado de la muestra 1 se amplificó realizando una PCR convencional del gen del rRNA16S completo, seguida de una PCR anidada (*nested-PCR*) interna, con los cebadores específicos de micobacterias del gen del rRNA 16S descritos por Mendum *et al.* (2000). El producto de PCR resultante se clonó y posteriormente, se analizaron los clones obtenidos para estimar la diversidad específica del género *Mycobacterium* presente en la muestra.

Con el objetivo de completar el análisis de la diversidad de micobacterias, a partir del DNA total de la misma muestra 1 se amplificaron otros genes esenciales mediante cebadores de PCR específicos, tales como *gyrB*, *hsp65* y *rpoB*, sin llegar a obtenerse resultados satisfactorios en el análisis de los clones.

## C2-1 OPTIMIZACIÓN DE LA PCR ANIDADA

Previamente a la realización de la PCR anidada mediante los cebadores específicos de micobacterias, se llevó a cabo una comprobación de la especificidad de los mismos amplificando a dos temperaturas diferentes de anillamiento, 55 y 60 °C. A pesar de que Mendum *et al.* (2000) establecieron unas condiciones de PCR para la pareja de cebadores específica de micobacterias de una temperatura de anillamiento de 55 °C, se comprobó otra temperatura superior para asegurar la especificidad de la PCR y evitar la amplificación de secuencias de otros géneros distintos al esperado, el género *Mycobacterium*.

Las pruebas se realizaron con muestras de DNA de distintos géneros además del género *Mycobacterium*; concretamente, se utilizaron cepas de los géneros *Agrobacterium* sp., diferentes aislados de *Mycobacterium* sp., *Ochrobactrum* sp., dos especies del género *Pseudomonas*, *Pseudomonas stutzeri* AN10 (miembro de la genomovar 3) y *Pseudomonas anguilliseptica*, así como una cepa del género *Sinorhizobium* sp. Los resultados de la PCR convencional a una temperatura de anillamiento de 55 °C revelaron que los cebadores específicos también amplificaban para el DNA de la cepa *P. stutzeri* AN10, y por tanto, podían amplificar secuencias distintas a las del género *Mycobacterium*, objeto de estudio.

Cuando se incrementó la temperatura de anillamiento a 60 °C, se obtuvieron resultados más específicos en los que únicamente amplificaron los DNAs pertenecientes a las distintas especies del género *Mycobacterium* (Tabla 11), permitiendo aumentar la sensibilidad.

**Tabla 11.** Resultado de la PCR de prueba con los cebadores de Mendum *et al.* (2000) a 55 °C y 60 °C de temperatura de anillamiento.

Aislados/cepas	T <sup>a</sup> de anillamiento	
	55 °C	60 °C
<i>Mycobacterium</i> sp. 1-3*	+	+
<i>Mycobacterium</i> sp. HSLL5 (3-5)*	+	+
<i>Mycobacterium</i> sp. 2-2*	+	+
<i>Mycobacterium</i> sp. HSLL2 (3-2)*	+	+
<i>Agrobacterium</i> sp. 112	-	-
<i>Ochrobactrum</i> sp. 3BB2	-	-
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> 114	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10	+	-
<i>Sinorhizobium</i> sp. 4FB4	-	-

\* Aislados cuya identificación, en base al análisis multigénico, se detalla en el Capítulo 3.

## C2-2 OBTENCIÓN, *SCREENING* Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA GENOTECA DEL GEN DEL rRNA 16S ESPECÍFICA DE *MYCOBACTERIUM*

A partir de la muestra de DNA total se llevó a cabo la amplificación del gen del rRNA 16S con los cebadores universales 16F27 y 16R1492, tal y como se indica en el apartado 2.3 de los Materiales y Métodos. A continuación, a partir de 1 µl de producto de PCR se realizó una PCR anidada con los cebadores internos, 16SMyc-F y 16SMyc-R, específicos de micobacterias utilizando una temperatura de anillamiento de 60 °C, resultando un producto de PCR con un tamaño de aproximadamente 473 pb. El producto de PCR resultante se utilizó para crear una librería de clones mediante el kit de clonación TOPO® TA *cloning kit*. Los clones recombinantes se seleccionaron por siembra de placas en agar LB suplementado con ampicilina, X-gal e IPTG. Los clones blancos, que tenían el inserto, se seleccionaron y se analizaron mediante amplificación y posterior secuenciación del inserto.

En la genoteca realizada del gen del rRNA 16S específico de micobacterias se obtuvieron 111 clones, de los cuales un total de 60 clones incorporaron el inserto del tamaño esperado de 473 pb. Cada una de las secuencias de nucleótidos obtenidas de los clones, una vez corregidas, fueron analizadas por comparación con las secuencias de referencia del gen rRNA 16S de las cepas tipo de especie disponibles en el servidor EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>), para poder afiliarlas filogenéticamente a nivel de especie. El análisis por secuencia de los 473 pb del gen del rRNA 16S confirmó la pertenencia al género *Mycobacterium* en el 100 % de los clones analizados, mostrándose tras el análisis filogenético 12 grupos claros, afiliados a distintas especies del género *Mycobacterium* con porcentajes de similitud de secuencia entre el 98,8 y el 100 % (ver Tabla 12 y Tabla Suplementaria S3 del Anexo).

**Tabla 12.** Asignación filogenética de los 60 clones de la genoteca del gen del rRNA 16S específica del género *Mycobacterium* (473 pb) en la muestra de agua de hemodilísis.

Grupos	N° clones	Especie tipo más próxima	Rango similitud	Longitud pb	N° acceso
1	24	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,2-100	473	CU458896, AHS01000006
2	10	<i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup> / <i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup>	99,36-100	472-473	AJ746070, JMDW01000030
3	8	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	98,9-99,79	472-473	AY457072, AY457080, HQ153090
4	6	<i>M. boenickei</i> ATCC 49935 <sup>T</sup> / <i>M. porcinum</i> CIP 105392 <sup>T</sup> / <i>M. conceptionense</i> CIP 108544 <sup>T</sup> / <i>M. neworleansense</i> ATCC 49404 <sup>T</sup>	99,2-100	472-473	AY012573, AY457077, AY859684, AY457068
5	3	<i>M. tokaiense</i> ATCC 27282 <sup>T</sup> / <i>M. murale</i> MA-112/96 <sup>T</sup> / <i>M. pyrenivorans</i> DSM 44605 <sup>T</sup>	99,36-99,58	472-473	AF480590, Y08857, AJ431371
6	2	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup>	99,4	473	JMDW01000030
7	2	<i>M. smegmatis</i> ATCC 19420 <sup>T</sup>	99,57-99,79	472-472	AJ131761
8	1	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. tokaiense</i> ATCC 27282 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup> / <i>M. murale</i> MA-112 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup>	99,2	472	AY457072, AF480590, HQ153090, Y08857, AY457080
9	1	<i>M. chitae</i> ATCC 19627 <sup>T</sup>	98,7	473	X55603
10	1	<i>M. parafortuitum</i> DSM 43528 <sup>T</sup>	100,0	473	X93183
11	1	<i>M. iranikum</i> M05 <sup>T</sup> / <i>M. senegalense</i> CIP 104941 <sup>T</sup> / <i>M. chlorophenolicum</i> PCP-1 <sup>T</sup> / <i>M. houstonense</i> ATCC 49403 <sup>T</sup> / <i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650 <sup>T</sup>	99,2	472	HQ009482, AY457081, X79094, AY457067, AY457074
12	1	<i>M. saskatchewanense</i> ATCC BAA-544 <sup>T</sup>	99,4	473	AY208856

El 8,3 % de los 60 clones analizados estaba representado por un único clon, mientras que la distribución del resto de clones en siete grupos más, representaba el 91,7 %. En la Figura 22 se observa que el grupo más abundante (grupo 1), integrado por 24 clones, abarcó el 40 % de los clones analizados, relacionados con la especie *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977<sup>T</sup> y *M. abscessus* subsp. *bolletii* BD<sup>T</sup>, seguido del grupo 2, con 10 clones, próximos a *M. llatzerense* MG13<sup>T</sup> y *M. neoaurum* ATCC 25795<sup>T</sup>. *M. llatzerense* MG13<sup>T</sup> se aisló de este mismo punto en el año 2003, describiéndose posteriormente como una especie nueva (Gomila *et al.*, 2005, 2007, 2008).

El análisis filogenético realizado a partir de las secuencias de los 60 clones obtenidos junto con las 168 secuencias del gen del rRNA 16S correspondiente a las cepas tipo de especies del género *Mycobacterium* (descritas hasta el 20 de Junio de 2015), según aparecen en la “*List of prokaryotic names with standing in nomenclature*” (<http://www.bacterio.net/>), mostró un resultado muy similar al obtenido previamente a partir de la base de datos Ez-Taxon. En la Figura 23 se muestra el árbol filogenético obtenido y la correspondiente distribución de los clones.

Los resultados muestran una gran diversidad de especies del género *Mycobacterium*, no apreciable a través de métodos dependientes de cultivo (Gomila *et al.*, 2005, 2007 y Capítulo 3). Aunque las mínimas diferencias nucleotídicas entre las distintas secuencias del gen del rRNA 16S evidencian que los cebadores utilizados en este estudio no son lo suficientemente discriminativos para discernir entre las distintas especies de *Mycobacterium*.

En la muestra objeto de estudio se identificaron las especies: *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977<sup>T</sup>/*M. abscessus* subsp. *bolletii* BD<sup>T</sup>, *M. llatzerense* MG13<sup>T</sup>/*M. neoaurum* ATCC 25795<sup>T</sup>, *M. chelonae* CIP 104535<sup>T</sup>/*M. immunogenum* CIP 106684<sup>T</sup>/*M. franklinii* CV002<sup>T</sup>, *M. boenickei* ATCC 49935<sup>T</sup>/*M. neworleansense* ATCC 49404<sup>T</sup>/*M. porcinum* CIP 105392<sup>T</sup>, *M. conceptionense* CIP 108544<sup>T</sup>, *M. chitae* ATCC 19627<sup>T</sup>, *M. iranicum* M05<sup>T</sup>/*M. senegalense* CIP 104941<sup>T</sup>/*M. chlorophenolicum* PCP-1<sup>T</sup>/*M. houstonense* ATCC 49403<sup>T</sup>/*M. mucogenicum* ATCC 49650<sup>T</sup>, *M. parafortuitum* DSM 43528<sup>T</sup>, *M. saskatchewanense* ATCC BAA-544<sup>T</sup>, *M. tokaiense* ATCC 27282<sup>T</sup>/*M. murale* MA-112/96<sup>T</sup>/*M. pyrenivorans* DSM 44605<sup>T</sup> y *M. smegmatis* ATCC 19420<sup>T</sup>. La mayoría de ellas aisladas o identificadas en ambientes clínicos, aunque con más frecuencia de muestras de origen ambiental.

*M. abscessus* subsp. *abscessus* y *M. abscessus* subsp. *bolletii* se definieron inicialmente como dos especies distintas de origen clínico, *M. abscessus* y *M. bolletii*, respectivamente. *M. abscessus* se aisló de un absceso subcutáneo de rodilla e inicialmente fue descrita como *M. chelonae* subsp. *abscessus* (Moore y Frerichs, 1953; Kusunoki y Ezaki, 1992) y *M. bolletii*, fue aislada de muestra de esputo (Adékambi *et al.*, 2006). Ambas especies se han reclasificado recientemente como dos subespecies (Leão *et al.*, 2011) dentro de la especie *M. abscessus*, en base a una clara variabilidad interna a nivel fenotípico y genotípico de la especie que justifica la descripción de otras subespecies futuras de la especie *M. abscessus*. Ha sido aislada en pacientes con fibrosis quística (Cándido *et al.*, 2014), así como de muestras ambientales, concretamente de suelo y agua potable (Rahbar *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2008).

*M. llatzerense* se aisló por primera vez en aguas de hemodiálisis como un microorganismo aeróbico, autotrófico facultativo, oxidador de hidrógeno (Gomila *et al.*, 2008), así como en otras muestras ambientales asociado a aguas potables y su sistema de distribución (Delafont *et al.*, 2014; Dubrou *et al.*, 2013; Van Ingen *et al.*, 2010), aunque recientemente se ha encontrado también en muestras clínicas como microorganismo causante de infección de pulmón asociada a un trasplante de riñón (Teixeira *et al.*, 2013) y también de un absceso abdominal (Cárdenas *et al.*, 2014) y de un absceso cerebral (Greninger *et al.*, 2015).

*M. neoaurum* se aisló por primera vez a partir de una muestra de suelo y posteriormente a partir de otros ambientes, como polvo y agua (Tsukamura y Mizuno, 1972). A su vez, ha sido reconocido como patógeno humano asociado a meningoencefalitis (Heckman *et al.*, 2004), infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres en huéspedes inmunocomprometidos (Washer *et al.*, 2007), o una bacteriemia en paciente sometido a tratamiento de hemodiálisis (Becker *et al.*, 2003). Se ha demostrado su implicación en casos de infección pulmonar (Kim *et al.*, 2014) y casos aislados de infección del tracto urinario (Zanetti *et al.*, 2001).

*M. chelonae* se aisló por primera vez a partir de muestras de pulmón de tortugas marinas enfermas de la especie *Chelona corticata* (Friedmann, 1903), manteniéndose como *M. chelonae* subsp. *chelonae* para no confundirla con *M. chelonae* subsp. *abscessus*, elevada posteriormente a especie, como *M. abscessus* y concretamente a la subespecie *M. abscessus* subsp. *abscessus* (Kusunoky y Ezaki, 1992). Posteriormente, fue aislada en sistemas de distribución de aguas (Santos *et al.*, 2005; Thomson *et al.*, 2013), en aguas potables (Hussein *et al.*, 2009; Cafri *et al.*, 2010; Lecuona *et al.*, 2015), así como en aguas de hemodiálisis (Carson *et al.*, 1988; Gomila *et al.*, 2007). Además, se aisló de muestras de turba (Matlova *et al.*, 2012) y suelo de granjas (Moravkova *et al.*, 2011). Las enfermedades más comunes a las que se asocia esta especie son las relacionadas con la piel, generalmente en pacientes con terapia inmunosupresora. Además puede producir infección traumática localizada (celulitis, abscesos y osteomielitis), e infección de heridas quirúrgicas y catéteres intravasculares (García y García, 2012). En los últimos años, son destacables las infecciones causadas por *M. chelonae* en personas que previamente se habían sometido a sesiones de tatuaje (Kennedy *et al.*, 2012), acupuntura (Cho *et al.*, 2014) o liposucción y lipoescultura (Zosso *et al.*, 2015).

*M. immunogenum* se asoció por primera vez a una neumonitis por hipersensibilidad por contaminación de los fluidos de corte en trabajadores de la industria de mecanizado de metal (Wilson *et al.*, 2001), ambiente en el que ha sido aislado en estudios posteriores (Murat *et al.*, 2012). Es causante de infecciones relacionadas con catéteres, infecciones de la piel, artritis e infección diseminada (Shedd *et al.*, 2010; Del-Castillo *et al.*, 2009). También está implicada en casos de queratitis (Sampaio *et al.*, 2006) y ha sido aislada recientemente de un absceso cerebral (Greninger *et al.*, 2015).

*M. franklinii* fue descrita por primera vez en 2011 por Simmon y colaboradores en un grupo de aislados clínicos obtenidos en Pennsylvania y el Noreste de Estados Unidos, inicialmente confundidos con la cepa tipo *M. chelonae*, pero con un perfil de susceptibilidad antibiótica

atípico (Simmon *et al.*, 2011). En dicho estudio se propuso crear, con ese grupo de cepas, un nuevo miembro dentro del grupo *M. chelonae* / *M. abscessus* denominado, *M. franklinii*, aunque este nombre no llegó a validarse taxonómicamente como especie nueva. Recientemente, a partir de aislamientos de muestras de agua, se propuso nuevamente como nueva especie válidamente descrita (Nogueira *et al.*, 2015).

*M. boenickei* fue aislada por primera vez a partir de una lesión de extremidad inferior y es causante de infecciones de heridas quirúrgicas y traumáticas, así como de osteomielitis (Schinsky *et al.*, 2004).

*M. neworleansense* se aisló de una muestra clínica de lesión en el cuero cabelludo y, al igual que *M. boenickei*, está relacionada con infecciones de heridas quirúrgicas, traumáticas, y osteomielitis (Schinsky *et al.*, 2004).

*M. porcinum* fue aislada por primera vez de una muestra de nódulo linfático en ganado porcino (Tsukamura *et al.*, 1983). Ha sido aislada de alimentos vegetales (Cerna *et al.*, 2015) y de aguas potables, aguas de hospital y hielo (Brown-Elliott *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2013). Clínicamente, es responsable de peritonitis en pacientes sometidos a diálisis, osteomielitis y bacteriemia asociada al catéter (Schinsky *et al.*, 2004; Patil *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2007; Idigoras *et al.*, 2007) y ha sido aislada de muestras de infección pulmonar (Lima *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014).

*M. conceptionense* fue aislada inicialmente de una biopsia de tejido óseo en paciente con osteítis o infección ósea postraumática (Adékambi *et al.*, 2006); ha sido descrita también en una infección por tratamiento de rejuvenecimiento facial, infección posterior a cirugía de implantes mamarios, abscesos subcutáneos (Liao *et al.*, 2009; Thibeaut *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011) y como causante de infección pulmonar (Shojaei *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

*M. chitae* no se ha considerado hasta el momento como patógeno y se aisló por primera vez en muestras de suelo (Tsukamura, 1967). Recientemente, se ha aislado a partir de muestras de agua potable (Castillo *et al.*, 2012).

*M. iranicum* se describió como nueva especie recientemente, a partir de una muestra de lavado broncoalveolar, en un paciente inmunocomprometido con enfermedad pulmonar crónica (Shojaei *et al.*, 2013) y posteriormente, ha sido aislada en muestras de esputo (Balakrishnan *et al.*, 2013).

*M. senegalense* se aisló por primera vez a partir de una muestra de nódulo linfático de bovino (Chamoiseau, 1979) y se ha descrito como causante de bacteriemia asociada a un catéter (Oh *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007). Es causante de infección de tejido blando (Talavlikar *et al.*, 2011).

*M. chlorophenicum* se describió por primera vez a partir de muestras de sedimento de lago (Apajalahti *et al.*, 1986; Häggblom *et al.*, 1994), y posteriormente se aisló de suelos contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cheung y Kinkle, 2001) y en muestras de vertidos ilegales (Wang *et al.*, 2006).



*M. houstonense*, aislada por primera vez de una muestra de absceso facial, se ha detectado en infecciones de heridas quirúrgicas, traumáticas y osteomielitis (Schinsky *et al.*, 2004).

*M. mucogenicum* se aisló por primera vez en 1982 como responsable de un brote de peritonitis en dos unidades de diálisis y oficialmente se describió en 1995 (Springer *et al.*, 1995). Se encuentra en aguas potables, entre ellas, aguas hospitalarias (Hussein *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2012), torres de refrigeración (Torvinen *et al.*, 2014) y en aerosoles generados por la ducha en las residencias de pacientes afectados con infección pulmonar (Thomson *et al.*, 2013a). Se ha demostrado su capacidad patógena y se ha asociado con brotes de infección nosocomial en pacientes que reciben diálisis, con infecciones relacionadas con catéteres intravenosos, infecciones del sistema nervioso central, respiratorias o de piel y tejidos blandos, bacteriemia e infección diseminada (Han *et al.*, 2007; Cooksey *et al.*, 2008; Adékambi, 2009; Shachor-Meyouhas *et al.*, 2011).

*M. parafortuitum* se aisló por primera vez a partir de muestras de suelo (Tsukamura, 1966) y ha sido aislada en sistemas de distribución de aguas potables (Gaspar-Grillo *et al.*, 2012).

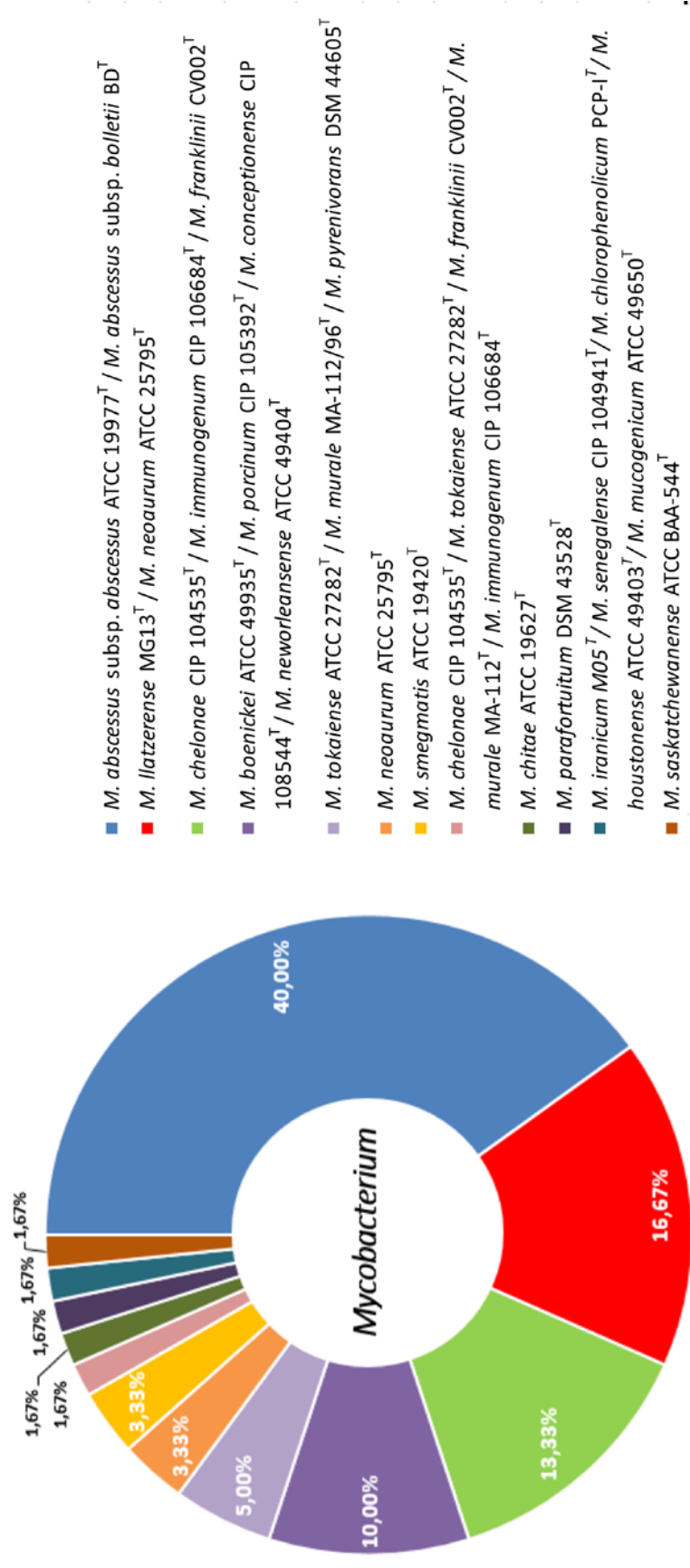
*M. saskatchewanense* se aisló por primera vez a partir de muestras de esputo (Turenne *et al.*, 2004).

*M. tokaiense* se ha detectado en muestras de suelo, de donde se aisló la primera vez (Tsukamura *et al.*, 1981; Chilima *et al.*, 2006). En muestras clínicas ha sido aislado de granuloma necrótico del tallo hipofisario (Kondo *et al.*, 2006).

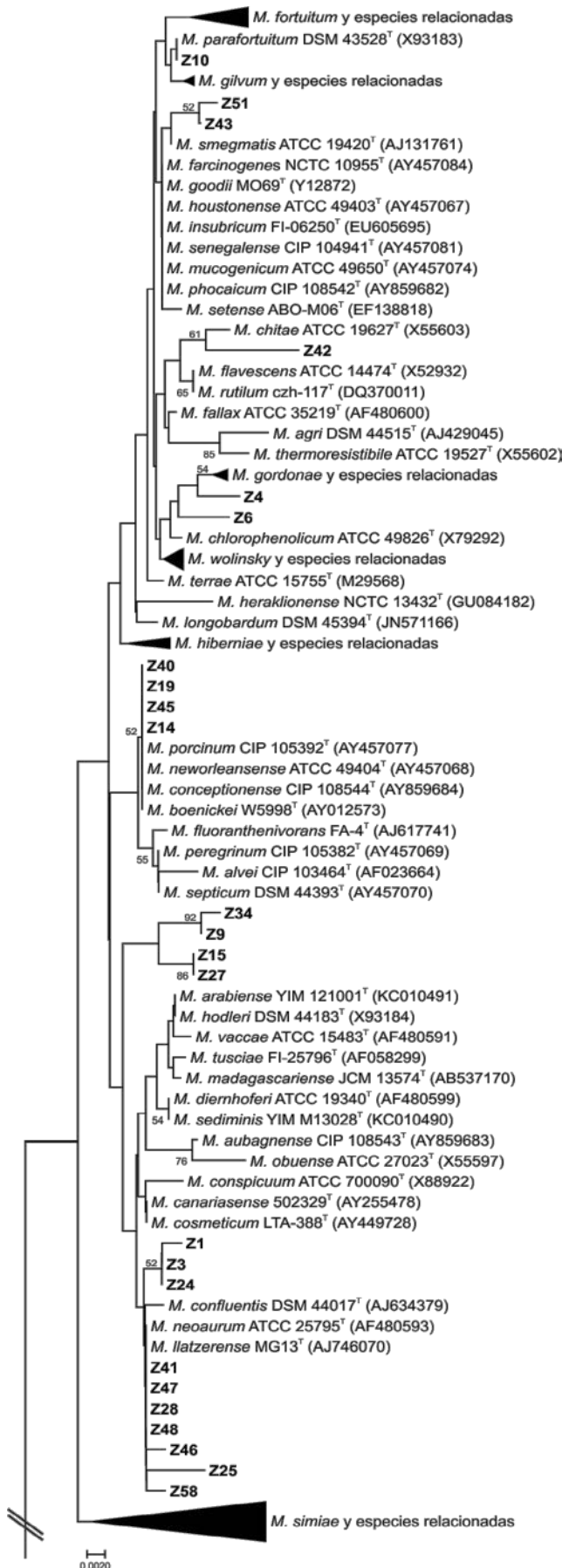
*M. murale* se aisló por primera vez a partir de materiales de construcción dañados por el agua, del interior de centros destinados al cuidado de niños (Vuorio *et al.*, 1999). Recientemente, se ha aislado de pacientes con tuberculosis pulmonar (Alkhovik *et al.*, 2013).

*M. pyrenivorans* se aisló por primera vez en suelos contaminados (Derz *et al.*, 2004).

*M. smegmatis* fue la primera especie de micobacteria reconocida después de *M. tuberculosis*. Inicialmente aislada de exudados de chancros luéticos y de secreciones vaginales (Álvarez y Tavel, 1885), fue descrita por primera vez con la nomenclatura actual por Lehmann y Neumann, 1899. Ha sido aislada de muestras ambientales de agua y suelo (Tsukamura, 1976; Parashar *et al.*, 2009; Bahram *et al.*, 2012) y también se ha visto implicada en infecciones respiratorias (Vonmoos *et al.*, 1986; Kumar *et al.*, 1995) o como agente causal de bacteriemia debida a catéteres, endocarditis, artritis, osteomielitis, linfadenitis, infecciones de piel y tejidos blandos e infección diseminada (Newton *et al.*, 1993; Skiest y Levi, 1998; Ergan *et al.*, 2004).



**Figura 22.** Distribución de las abundancias de los clones de micobacterias de la genoteca en base a la similitud de las secuencias analizadas del gen del rRNA 16S.



**Figura 23.** Afiliación filogenética de los 60 clones del género *Mycobacterium* basada en la secuencia parcial del gen del rRNA 16S. El árbol filogenético fue inferido por el método de Neighbor-joining a partir de la matriz de distancias calculada por el algoritmo de Jukes-Cantor. En el árbol filogenético se incluyeron todas las secuencias de las especies tipo del género válidamente descritas tal y como se indican en la *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. En negrita se indican los clones analizados. En los nodos se indican en porcentaje los valores de *bootstrap* superiores a 500. La barra indica la divergencia de la secuencia.

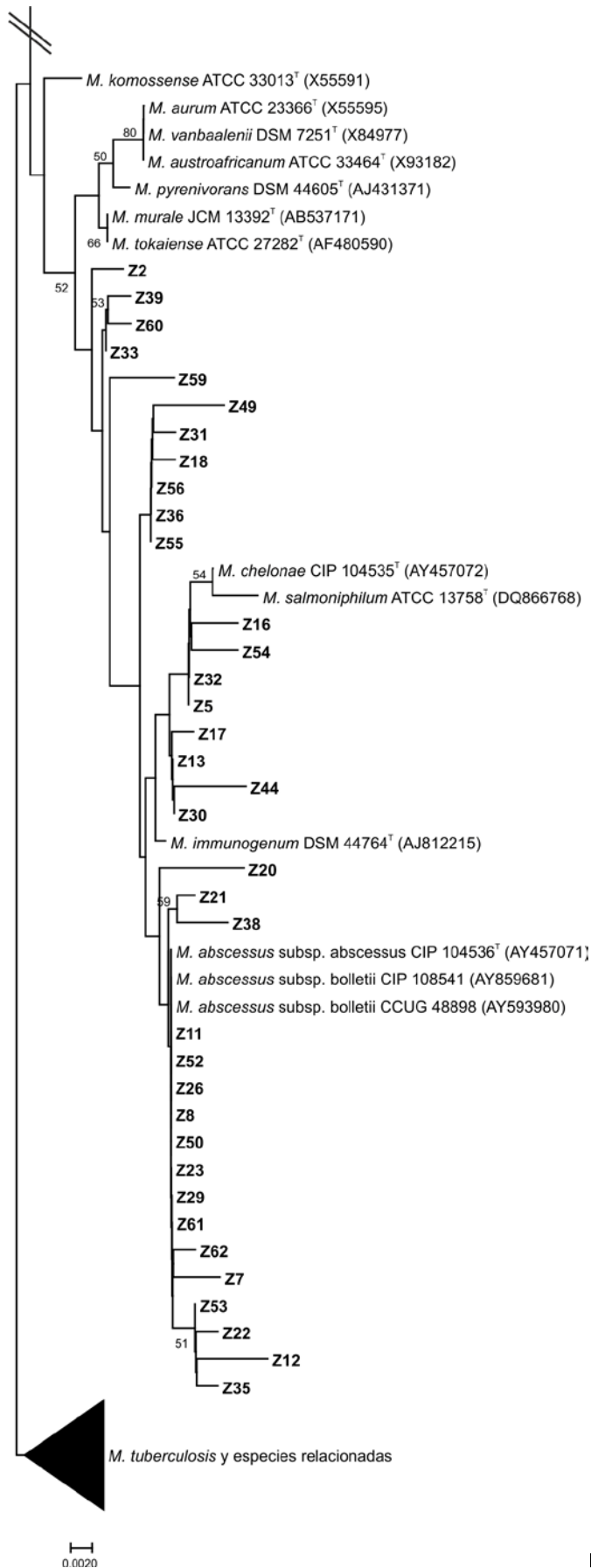


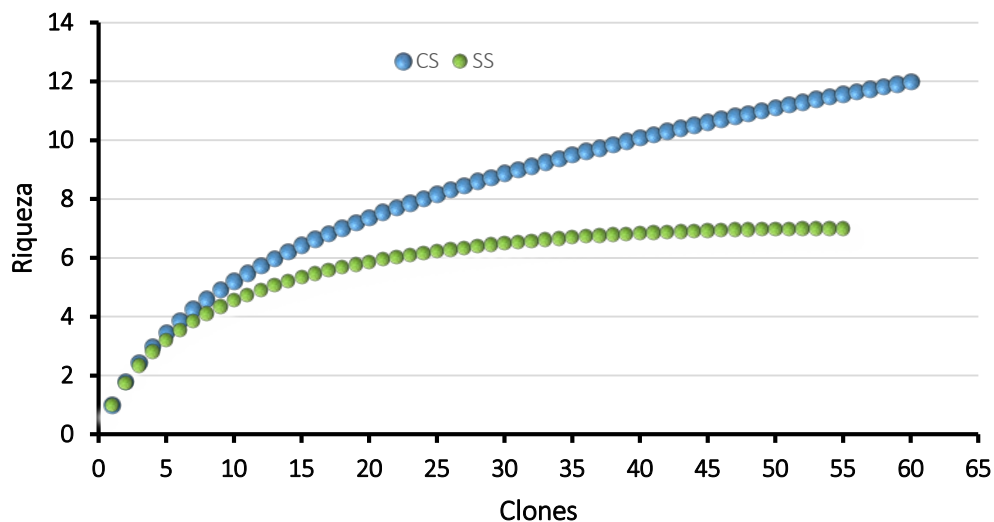
Figura 23. Continuación.

### C2-3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y CURVAS DE RAREFACCIÓN

Para analizar el “esfuerzo de muestreo” y, por tanto, averiguar si el número de secuencias de clones analizadas representan una fracción significativa o no de la muestra, se realizaron análisis estadísticos, como las curvas de rarefacción que aportan un enfoque alternativo a la estimación no paramétrica de la riqueza.

En la curva de rarefacción resultante se muestra el cambio en el valor esperado de riqueza de especies de acuerdo al tamaño de la muestra analizada. La curva tiende un valor límite a partir del cual, a pesar de aumentar el número de clones analizados de la muestra, el número de especies esperado  $E(S)$ , no aumenta.

En la genoteca obtenida del gen del rRNA 16S específico de micobacterias, se obtuvieron 60 clones agrupados en 12 grupos filogenéticos diferentes. Se calculó una curva de rarefacción que incluía todos los grupos, incluso los *singletons* o clones presentes una única vez (CS) y otra que no los tenía en cuenta (SS). Tal y como se muestra en la Figura 24, el análisis de los 60 clones de la genoteca no alcanzó la asíntota o el perfil de saturación por lo que el esfuerzo del muestreo resultó insuficiente para cubrir la totalidad de especies de *Mycobacterium* presentes en la muestra analizada. En la curva con los valores correspondientes a SS, se observa la diferencia, con un perfil esperado de saturación. Estos resultados sugieren que para encontrar nuevas especies se requiere un esfuerzo de muestreo muy superior.



**Figura 24.** Curvas de rarefacción, calculadas para los clones analizados de la genoteca del gen del rRNA 16S, específico de micobacterias, considerando *singletons* (CS) y sin considerarlos (SS).

La rapidez con la que se alcanza la asíntota horizontal y se abandona la correlación lineal entre el número de clones analizados y riqueza de especies, permite una apreciación de la diversidad entendida como diferencia de abundancias. De este modo, dado que las curvas tienden a alcanzar la asíntota con relativa rapidez cabe esperar un medio uniforme, donde todas las

especies tienen una probabilidad similar de ser halladas, y por tanto, se requieren menos individuos para que la curva alcance su asíntota. En la curva que no considera los *singletons* se alcanza la asíntota en torno al clon número 45 y con una riqueza aproximada de 7 especies diferentes. Cabe destacar que una de las premisas de la rarefacción, es la de que los individuos de la población a muestrear deben estar distribuidos al azar (Tipper, 1979).

En cuanto a la diversidad obtenida a nivel de especies de micobacterias en la muestra analizada, ésta se estimó mediante el cálculo de determinados índices de diversidad con el programa PAST. En la Tabla 13 se detallan los resultados obtenidos para cada índice y para las dos consideraciones tenidas en cuenta, con *singletons* (CS) y sin *singletons* (SS).

**Tabla 13.** Índices de diversidad y cobertura de la genoteca a nivel de especie de *Mycobacterium*, basado en el análisis del gen del rRNA 16S.

Índices de diversidad	CS	SS
Especies	12	7
Individuos	60	55
Dominancia (D)	0,22	0,26
Simpson (1-D)	0,78	0,74
Shannon (H)	1,88	1,59
Evenness ( $e^H/S$ )	0,55	0,70
Brillouin (HB)	1,64	1,42
Menhinick ( $D_{Mn}$ )	1,55	0,94
Margalef ( $D_{mg}$ )	2,69	1,50
<i>Equitability</i> (J)	0,76	0,82
Fisher_alpha (S)	4,51	2,13
Berger-Parker (d)	0,4	0,44
Chao-1	15,33	7
Cobertura (C) (%)	91,67	100

En primer lugar, se calculó el índice de representatividad de la genoteca dentro de la comunidad mediante la estimación de la cobertura basada en que las especies más abundantes tienen mayor probabilidad de ser incluidas en cualquier muestra y contienen muy poca información sobre el tamaño total de la comunidad. El cálculo de la cobertura de la genoteca, representado en tanto por ciento, se realizó con la consideración de *singletons* (CS) y sin ella (SS). Tal y como se muestra en la Tabla 13, teniendo en cuenta que la cobertura SS es del 100 % frente al 91,67 % en el caso de CS, la diferencia de cobertura es del 8,33 % y por tanto, se caracterizó la comunidad de micobacterias con una cobertura elevada.

El índice de Margalef, de riqueza específica de la muestra, teniendo en cuenta simultáneamente el número de especies y el número de individuos, adquirió valores inferiores a 2 (1,50) en el caso de SS que se corresponden con una baja diversidad y de casi el doble, 2,69 para CS.

En el índice de diversidad alpha de Fischer, con valores obtenidos de 4,51 y 2,13, CS y SS respectivamente, se demostró la gran influencia de las especies con un único representante que elevó el índice hasta casi dos puntos, dentro de una muestra con baja diversidad.

El índice de Berger-Parker, de abundancia relativa de la especie más numerosa, obtuvo un valor en torno a 0,4 y representa en porcentaje un 40 % de dominancia de la especie más abundante. El resultado obtenido de este índice se mantuvo en los dos casos, SS y CS, dado que la abundancia proporcional de las especies más abundantes es la misma en ambos casos.

El índice de Dominancia obtenido fue del orden de 0,2 en ambos casos y dado que está más próximo de 0 que de 1, es indicativo de que las especies de *Mycobacterium* en la muestra analizada tienden a estar presentes igualmente sin una única especie que domine claramente la comunidad.

El índice de Simpson, de probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie, aparece fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes. El hecho de alcanzar un valor del orden de 0,7 en CS y SS, evidenció una heterogeneidad moderada y equivalente de la muestra analizada en ambas consideraciones.

El índice de Shannon, de heterogeneidad de la comunidad, mostró una baja diversidad en la muestra, ya que se obtuvieron valores inferiores a 2: 1,88 para CS y 1,59 para SS.

Los valores de *Equitability* (J), indicadores de la uniformidad de la comunidad, en ambos casos fueron elevados (0,76 CS, 0,82 SS), indicando que las especies tienden a ser igualmente abundantes.

El índice de *Evenness* o uniformidad de Buzas y Gibson, de uniformidad de la distribución de especies, mostró valores de 0,55 CS y 0,70 SS que indican una distribución de la muestra que tiende a ser uniforme, más evidente en el caso de no considerar los *singletons*.

El índice de equidad de Brillouin, menor que el de Shannon se considera que depende, a diferencia de éste, del tamaño de la muestra y no excede de 4,5. Dado que cuanto más elevado es el valor de este índice, mayor diversidad hay en la muestra, los valores obtenidos en la muestra analizada de 1,64 en CS y 1,42 en SS, mostraron que la diversidad no era elevada.

El índice de riqueza de especies de Menhinick, de relación entre el número de especies y el número total de individuos observados, mostró valores de 1,55 CS y 0,94 SS, indicando que la diversidad de micobacterias en la muestra analizada es moderada considerando los *singletons* y más baja si no se consideran.

De acuerdo al índice Chao 1 calculado para estimar el número de especies en una comunidad basándose en el número de especies raras o poco abundantes en la muestra, la cantidad de especies previstas en la muestra analizada resultaron en 15,33 (CS) y 7 (SS), por lo tanto, el análisis de la muestra detectó 12 grupos filogenéticos diferentes frente a los 15,3 que cabría esperar con un esfuerzo de muestreo mayor.

Los índices calculados mostraron una diversidad relativamente alta, si tenemos en cuenta el total de especies detectadas y los valores de diversidad obtenidos en el estudio de caracterización de la comunidad bacteriana global, mediante el uso de cebadores universales

del gen del rRNA 16S. Estos resultados contrastan con lo que se esperaría de un ambiente extremo como son las aguas oligotróficas. El significado biológico, ecológico y clínico de la diversidad encontrada requiere de un estudio futuro más exhaustivo.

#### **C2-4 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES MEDIANTE PCR DE GENES ESPECÍFICOS (*hsp65*, *gyrB* y *rpoB*)**

Con la finalidad de intentar alcanzar una mayor resolución y obtener así una mejor fiabilidad al describir la diversidad de la muestra 1 a partir del DNA total, se realizaron amplificaciones de los genes específicos de micobacterias *hsp65*, *gyrB* y *rpoB*, en distintas condiciones de PCR. Para estos genes, se probaron diferentes condiciones de amplificación, distintas temperaturas de anillamiento (55 °C y 60 °C), así como incrementando el número de ciclos de la PCR. Sin embargo, sólo se obtuvo producto de PCR para el amplicón correspondiente al gen *hsp65* a 60 °C con 40 ciclos. A partir de este amplicón se obtuvieron 22 clones, pero ninguno de ellos mostró el tamaño de inserto esperado.

No se obtuvieron resultados satisfactorios en ninguno de los casos analizados, probablemente debido a la baja cantidad de micobacterias en la muestra y/o la poca cantidad de DNA de partida.

Los resultados obtenidos sugieren además la necesidad de realizar una PCR anidada para el análisis de estos genes, mediante el uso inicialmente de unos cebadores universales, seguido de unos cebadores internos específicos del género, para estos genes.



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## CAPÍTULO 3

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS MULTIGÉNICO DE MICOBACTERIAS AMBIENTALES, ASOCIADAS A SISTEMAS DE DISTRIBUCIÓN DE AGUAS POTABLES Y PURAS, Y DE MICOBACTERIAS DE ORIGEN CLÍNICO



En el último capítulo de la presente tesis doctoral, se recogen los resultados obtenidos del procesamiento de las muestras de aguas potables y puras, a través de métodos dependientes de cultivo, para el aislamiento y caracterización de micobacterias de origen ambiental. Para tal fin, se utilizaron distintos métodos de selección, aislamiento e identificación. Todas las micobacterias de origen ambiental aisladas de las diferentes muestras se sometieron a un análisis multigénico junto con aislamientos de origen clínico identificados rutinariamente en el hospital como micobacterias atípicas, cedidas por el Hospital *Son Llätzer* y por el antiguo Hospital Universitario *Son Dureta*.

### C3-1 AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS DE ORIGEN AMBIENTAL

Con el objetivo de obtener el máximo número de aislamientos correspondientes a micobacterias ambientales a lo largo de esta tesis doctoral (2004-2010), se llevaron a cabo diferentes muestreos tanto en aguas potables como puras (Tabla 14). Los muestreos se realizaron usando diferentes condiciones de procesamiento de muestra y distintos criterios de selección de aislamientos identificados presuntamente como micobacterias, a lo largo de la tesis doctoral, con el objetivo de mejorar el número de aislamientos de micobacterias obtenidos en cada uno de ellos. Se procesaron las muestras aplicando métodos de descontaminación previos al aislamiento y sin descontaminarlas, además de distintos métodos para llevar a cabo la identificación presuntiva de micobacterias, como la tinción Ziehl-Neelsen de todos los aislamientos obtenidos, para seleccionar aquellos que mostrasen una tinción positiva (correspondientes presuntamente a micobacterias), o el análisis por secuenciación parcial del gen del rRNA 16S, de dos representantes de todas las morfologías coloniales presentes en los medios de cultivo. El proceso de descontaminación se llevó a cabo con hidróxido sódico 2 %, tal y como se detalla en la sección 3.2 del apartado de Materiales y Métodos.

En la Tabla 14 se detallan, en orden cronológico, las muestras obtenidas, así como el proceso de selección realizado para la obtención de éstas (descontaminación o no) e identificación. En todos los casos, la muestra de agua, tanto el filtro como diluciones seriadas, se sembraron en agar R2A incubándose a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) durante 10 días. Las muestras 19, 20 y 21 se sembraron adicionalmente en placas con medio agar Middlebrook 7H11. En la Tabla 15, se muestran los recuentos en ufc/ml de los distintos muestreos realizados. Los recuentos para las aguas puras oscilaron entre las 5 y  $8,8 \times 10^4$  ufc/ml. Mientras que en las aguas potables los valores oscilaron entre  $< 1$  y  $8,8 \times 10^3$  ufc/ml. En todos los casos, los valores se encontraban en los aceptados por las normativas vigentes, y en el mismo orden de magnitud que los obtenidos en estudios previos (Gomila *et al.*, 2005). Las oscilaciones observadas en ambos tipos de aguas pueden ser debidas al desprendimiento de células de la biopelícula en el momento de la toma de muestras. En el caso de las aguas puras, las muestras se tomaban a petición del Servicio de la Unidad de Hemodiálisis, independientemente de cuándo se había llevado a cabo el proceso de desinfección. En estudios previos, se observó que la carga bacteriana era superior justo después de llevar a cabo los procesos de desinfección (Gomila *et al.*, 2005).

**Tabla 14.** Muestras obtenidas para la detección de micobacterias ambientales a lo largo de esta tesis doctoral.

Muestras	Fecha	Tipo de aguas	Origen	Volumen (L)	Descontaminación	Identificación
2	09/03/05	Puras	HSLLa	0,1	NO	Tinción ZN <sup>d</sup>
3	27/10/05	Potables	UIB <sup>b</sup>	1	SI	rDNA 16S
4	06/02/06	Potables	UIB	1	SI	rDNA 16S
5	29/03/06	Potables	UIB	1	SI	rDNA 16S
6	11/04/06	Potables	UIB	2	SI	rDNA 16S
7	12/04/06	Potables	UIB	2	SI	rDNA 16S
8	18/04/06	Potables	UIB	2	SI	rDNA 16S
9	19/04/06	Potables	UIB	2	SI	rDNA 16S
10	22/05/06	Puras	HSLLa	2	SI	rDNA 16S
11	23/11/07	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
12	24/11/07	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
13	21/12/07	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
14	22/12/07	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
15	16/01/08	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
16	17/01/08	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
17	20/02/08	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
18	21/02/08	Puras	HSLLa	0,1	NO	rDNA 16S
19	26/02/10	Potables	HSLLa	2	SI	rDNA 16S
20	26/02/10	Potables	UCI <sup>c</sup>	2	SI	rDNA 16S
21	26/02/10	Potables	UIB	2	SI	rDNA 16S

<sup>a</sup>Hospital *Son Llätzer* (Unidad de Diálisis); <sup>b</sup>Universidad de las Islas Baleares; <sup>c</sup>Unidad de Cuidados Intensivos (Hospital *Son Llätzer*); <sup>d</sup>Tinción Ziehl-Neelsen.

### C3-1.1 Micobacterias ambientales seleccionadas por análisis de la alcohol ácido resistencia (tinción Ziehl-Neelsen)

La selección de micobacterias a partir de muestras de agua se planteó inicialmente utilizando el método clásico de la tinción de alcohol ácido resistencia (Ziehl-Neelsen - ZN).

La muestra 2, recogida en la Unidad de diálisis del Hospital *Son Llätzer* en el punto M3, correspondiente a la salida del anillo de distribución, justo antes de entrar en las máquinas de diálisis (con un tratamiento de desinfección del sistema de hipercloración, con hipoclorito sódico), se sometió a diluciones seriadas en solución Ringer hasta la dilución  $10^{-2}$  en condiciones asépticas. Posteriormente, se sembraron en superficie 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones en 10 placas de agar R2A por el método de extensión en placa, incubándose a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) durante 12 días. Transcurrido el tiempo de incubación, las diez placas con siembra directa presentaban incontables colonias, por lo que los recuentos de bacterias cultivables se hicieron a partir de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .

Los recuentos realizados mostraron valores que oscilaban entre  $3,2 \times 10^4$  y  $1,4 \times 10^5$  ufc/ml ( $\bar{X}=8,88 \times 10^4$  ufc/ml) (Tabla 15). La mayoría de las colonias presentaban una pigmentación amarilla, no característica de micobacterias ambientales, en general blancas.

La selección de los aislamientos, para el posterior análisis, se hizo en base al planteamiento siguiente. En primer lugar, se aislaron todas las colonias presentes en cinco de las placas de dilución  $10^{-2}$ . En segundo lugar, se aislaron todas las colonias sin pigmentación amarilla de las cinco placas restantes de la dilución  $10^{-2}$ . Por último, se aislaron las colonias sin pigmentación amarilla de las diez placas de dilución  $10^{-1}$ .

**Tabla 15.** Recuentos obtenidos (ufc/ml) en los medios agar R2A y agar Middlebrock 7H11 para las muestras de aguas puras y potables tanto para las muestras control (C), como para las sometidas al proceso de descontaminación (D)

Muestra	Fecha	Tipo de aguas	Origen	R2A		Middlebrock	
				C	D	C	D
2	09/03/05	Puras	HSLLa	$8,88 \times 10^4$	-	-	-
3	27/10/05	Potables	UIB <sup>b</sup>	< 1	< 1	-	-
4	06/02/06	Potables	UIB	<1	0	-	-
5	29/03/06	Potables	UIB	<1	0	-	-
6	11/04/06	Potables	UIB	8,1	< 1	-	-
7	12/04/06	Potables	UIB	16,8	0	-	-
8	18/04/06	Potables	UIB	$4,2 \times 10^2$	0	-	-
9	19/04/06	Potables	UIB	11,7	0	-	-
10	22/05/06	Puras	HSLLa	18,72	0	-	-
11	23/11/07	Puras	HSLLa; M3/M4 <sup>d</sup>	$1,7 \times 10^2/0$	-	-	-
12	24/11/07	Puras	HSLLa; M3/M4	54,3/0,2	-	-	-
13	21/12/07	Puras	HSLLa; M3/M4	9,6/0	-	-	-
14	22/12/07	Puras	HSLLa; M3/M4	5/0	-	-	-
15	16/01/08	Puras	HSLLa; M3/M4	5,2/52	-	-	-
16	17/01/08	Puras	HSLLa; M3/M4	$1 \times 10^3/5$	-	-	-
17	20/02/08	Puras	HSLLa; M3/M4	13,35/0	-	-	-
18	21/02/08	Puras	HSLLa; M3/M4	28,7/0	-	-	-
19	26/02/10	Potables	HSLLa; SM <sup>e</sup>	$4 \times 10^2$	24,5	735	12,5
20	26/02/10	Potables	UCI <sup>c</sup>	0	36	0	25,5
21	26/02/10	Potables	UIB	$8,8 \times 10^3$	18,5	0	4

<sup>a</sup>Hospital Son Llàtzer (Unidad de Diálisis); <sup>b</sup>Universidad de las Islas Baleares; <sup>c</sup>Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Son Llàtzer; <sup>d</sup>Puntos de muestreos M3 (puerto de conexión del equipo de hemodiálisis al anillo de distribución, previo a la entrada de agua en el monitor de diálisis) y M4 (equipo de hemodiafiltración, una vez reconstituido el líquido de diálisis); <sup>e</sup>Control; <sup>f</sup>Descontaminación; <sup>g</sup>Servicio de Microbiología del Hospital Son Llàtzer.

A partir de la muestra 2, se aislaron un total de 512 colonias en cultivo puro. Todos los aislamientos fueron sometidos a tinción diferencial de Ziehl-Neelsen mediante el procedimiento especificado en la sección 3.5 del apartado de Materiales y Métodos. Esta técnica de identificación presuntiva se planteó inicialmente en base a que representaba una opción rápida, fácil y de bajo costo (Selvakumar *et al.*, 2002). La sensibilidad de esta tinción en la identificación de bacilos alcohol ácido resistentes es del 74 % y la especificidad del 98 % (Selvakumar *et al.*, 2005). El género *Mycobacterium* es el único miembro en la familia *Mycobacteriaceae* y está relacionado con otros géneros que contienen ácidos micólicos (*Gordonia*, *Tsukamurella* y *Rhodococcus*), los cuales también pueden ser teñidos con esta tinción. Los portaobjetos con las muestras de los 512 aislamientos sometidos a tinción Ziehl-Neelsen fueron analizados por microscopía óptica usando el objetivo 100x. El resultado del

análisis de las muestras fue de un total de 11 muestras presuntamente positivas, designadas en orden ascendente como 1-1 a 1-11 (1 para indicar el primer muestreo con aislamientos positivos seguido del número de aislamiento). De estas 11 muestras se recuperó el cultivo, realizándose una extracción de DNA, así como la amplificación por PCR y secuenciación del gen del rRNA 16S, para confirmar la afiliación filogenética al género *Mycobacterium*.

La tasa de positividad previa al análisis filogenético de las secuencias del gen del rRNA 16S, de los aislados presuntamente positivos, fue del 2,15 y finalmente, una vez confirmada la identificación de los aislados por secuencia, del 0,98 %. Cuatro aislados fueron asignados al género *Mycobacterium* sp., concretamente los aislados 1-1, 1-3, 1-4 y 1-5. El resto de aislados que presuntamente habían resultado positivos en la tinción, 7 en total, se confirmaron, posteriormente, todos ellos como especies del género *Novosphingobium* (próximos a las cepas tipo *N. aromaticivorans* y *N. stygium*) con valores de similitud cercanos al 97 % y con porcentajes de similitud del 99 % con aislamientos obtenidos en un estudio previo realizados en este sistema de distribución de aguas (Gomila *et al.*, 2005). En la Tabla 16 se muestra la asignación filogenética obtenida para estos 11 aislados, en base a la secuenciación parcial del gen del rRNA 16S.

Evaluated el esfuerzo del total de aislados analizados y la tasa de positividad mínima, por debajo del 1 %, se replanteó adoptar una estrategia diferente en la selección de micobacterias a partir de las sucesivas muestras de aguas potables y puras analizadas.

### **C3-1.2 Recuperación de micobacterias ambientales mediante estrategia de descontaminación**

En base al elevado número de colonias totales aisladas en la muestra 2, y la baja tasa de positividad en la tinción clásica de Ziehl-Neelsen, se optó alternativamente por filtrar la muestra y someterla a un proceso de descontaminación estándar con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 2 % como agente descontaminante (Kubica *et al.*, 1963), con el fin de eliminar todas aquellas colonias que no tuvieran la propiedad de la alcohol ácido resistencia, característica distintiva de las micobacterias. Las muestras, de la 3 a la 10 y de la 19 a la 21 pertenecientes a aguas potables y puras, mayoritariamente del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares, fueron sometidas al proceso de descontaminación previa (Tabla 14). El protocolo seguido se desarrolla en la sección 3.2 del apartado de Materiales y Métodos.

**Tabla 16.** Asignación filogenética de los 11 aislados de la muestra 2 en base a la secuenciación parcial del gen del rRNA 16S.

Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo de especie más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
1-1	796	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>*</sup>	99,7	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH834	99	KR995258
1-2	902	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 <sup>†</sup>	97,6	CP000248	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094
1-3	869	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>*</sup>	99,9	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH339	99	KR995266
1-4	907	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>*</sup>	99,7	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH572	99	KR995262
1-5	875	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>*</sup>	98,3	CU458896	<i>Mycobacterium</i> sp. NIB0901	99	AB971866
1-6	936	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>†</sup>	97,3	AB025013	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094
1-7	833	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 <sup>†</sup>	97,5	CP000248	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094
1-8	910	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>†</sup>	97,4	AB025013	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094
1-9	913	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 <sup>†</sup>	97,0	CP000248	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094
1-10	905	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 <sup>†</sup>	97,4	CP000248	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094
1-11	899	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 <sup>†</sup>	97,0	CP000248	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094

<sup>\*</sup>Estos aislados mostraron el mismo porcentaje de similitud con la secuencias de la cepa tipo *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977<sup>\*</sup>, *M. abscessus* subsp. *bolletii* BD4<sup>†</sup>, *M. chelonae* CIP 104535<sup>†</sup> y *M. franklinii* CV002<sup>†</sup>.

En todas las muestras se procesó un control del tratamiento, con una muestra que contenía únicamente solución Ringer con el inóculo de la cepa tipo *M. abscessus* subsp. *abscessus* CCUG 20993<sup>T</sup>, así como un control de la muestra en la que no se había efectuado tratamiento. De las placas control sembradas con muestra de agua a la que no se había efectuado tratamiento, a excepción de la muestra 3 donde no se aislaron colonias, se seleccionaron dos aislamientos representativos de las diferentes morfologías coloniales presentes, para un posterior análisis por secuenciación parcial del gen del rRNA 16S. Todos los aislamientos obtenidos en las placas de descontaminación se analizaron por secuenciación parcial del gen del rRNA 16S para su correspondiente identificación, presuntamente como micobacterias.

En la Tabla 17 se listan las muestras de agua potable y pura sometidas a un proceso de descontaminación previa analizadas donde se indican la fecha de recogida de éstas, el tipo y el origen de muestra, así como el volumen de agua analizado, detallándose el número total de aislamientos analizados para cada muestreo, asignados o no al género *Mycobacterium*. En todos los muestreos realizados, el control del tratamiento con el inóculo de la cepa tipo *M. abscessus* subsp. *abscessus* CCUG 20993<sup>T</sup> resultó en el crecimiento ésta, confirmándose, en consecuencia, la validez del tratamiento en todos los experimentos para un cultivo puro del género *Mycobacterium* sp.

Con el fin de facilitar la exposición de los resultados de las diferentes muestras, se analizaron por grupos de muestras, según el volumen analizado (1 o 2 L) y cronología. De acuerdo a este criterio, se exponen a continuación los resultados de las muestras sometidas a descontaminación, organizadas en tres grupos; el primero de la muestra 3 a 5, el segundo de la muestra 6 a 10 y el tercero de la muestra 19 a 21.

#### Muestras 3 a 5

En las muestras 3 a 5 se filtró 1 L de agua potable del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares y ninguno de los filtros se llegó a colmatar. A partir del filtrado resuspendido en solución Ringer se subdividieron las muestras en un control y un tratamiento de descontaminación. Como resultado, se obtuvieron recuentos con valores inferiores a 1 ufc/ml en ambas muestras y de 0 en el tratamiento de descontaminación de las muestras 4 y 5. A pesar de que se esperaban obtener recuentos inferiores en el tratamiento de descontaminación, sorprendieron los recuentos similares al tratamiento de descontaminación en la muestra control, debidos probablemente a la adherencia al filtro de los microorganismos presentes, hecho que debió dificultar la resuspensión posterior de estos en solución Ringer, provocando en consecuencia, una disminución de los recuentos finales.



**Tabla 17.** Listado de las muestras de agua potable y pura sometidas a un proceso de descontaminación previa. En la tabla se indican la fecha de recogida, el tipo de muestra y el origen de las mismas. Se indica también el volumen de agua analizado en cada caso y el número de aislamientos obtenidos tras los 7-10 días de incubación; se indican los aislamientos identificados como micobacterias.

Muestra	Fecha	Tipo de aguas	Origen	Volumen (L)	Micobacterias		Otros		Total
					D <sup>e</sup>	C <sup>f</sup>	D	C	
3	27/10/05	Potables	UIB <sup>a</sup>	1	4	-	1	-	5
4	06/02/06	Potables	UIB	1	0	0	0	4	4
5	29/03/06	Potables	UIB	1	0	3	0	7	10
6	11/04/06	Potables	UIB	2	0	1	1	9	11
7	12/04/06	Potables	UIB	2	0	0	0	3	3
8	18/04/06	Potables	UIB	2	0	0	0	3	3
9	19/04/06	Potables	UIB	2	0	1	0	7	8
10	22/05/06	Puras	HSL <sup>b</sup>	2	0	0	0	5	5
19	26/02/10	Potables	HSL <sup>b</sup> ; SM <sup>c</sup>	1	0	2	0	2	4
20	26/02/10	Potables	UCI <sup>d</sup>	1	0	0	0	3	3
21	26/02/10	Potables	UIB	1	0	0	0	2	2

<sup>a</sup>Universidad de las Islas Baleares; <sup>b</sup>Hospital Son Llàtzer; <sup>c</sup>Servicio de Microbiología del Hospital Son Llàtzer; <sup>d</sup>Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Son Llàtzer; <sup>e</sup>Descontaminación; <sup>f</sup>Control.

Las placas de tratamiento de descontaminación de la muestra 3 presentaron el crecimiento de 5 colonias en total a los ocho días de incubación a temperatura ambiente. Dado que era la primera muestra en aplicar la estrategia de descontaminación, y el control del inóculo de la cepa tipo *M. abscessus* subsp. *abscessus* CCUG 20993<sup>T</sup> había resultado positivo, no se aislaron colonias del control. Directamente se analizaron todas las colonias que crecieron en la muestra con tratamiento y que se presuponían micobacterias. El análisis mediante secuenciación parcial del gen rDNA 16S (ver Tabla 18) reveló que de los 5 aislamientos, 4 pertenecían al género *Mycobacterium* (2-1, 2-2, 2-3 y 2-5), identificadas con las cepas tipo *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977<sup>T</sup>, *M. abscessus* subsp. *bolletii* BD4<sup>T</sup>, *M. chelonae* CIP 104535<sup>T</sup> y *M. franklinii* CV002<sup>T</sup> con un 100 % de similitud. Todas estas cepas tipo muestran más de un 99 % de similitud de secuencia entre ellas al analizar su gen rDNA 16S completo. Cabe destacar que *M. franklinii* CV002<sup>T</sup> se consideraba un nombre taxonómicamente inválido hasta este mes de Julio de 2015 donde ha sido descrita como una especie nueva por Nogueira *et al.* (2015) en el grupo filogenético *M. chelonae*/*M. abscessus*. Aunque éste de momento, no se encuentra publicado en la *List of Prokaryotic names with standing in nomenclature* (Parte, 2014). Estos aislados de micobacterias se analizaron más detalladamente junto con otros genes específicos de micobacterias para la confirmación de la especie en la sección C3-3 del presente capítulo. El aislamiento que creció en placas con tratamiento de descontaminación y no se identificó con el género *Mycobacterium*, se afilió dentro del mismo filo *Actinobacteria*, con el género *Brevibacterium* y concretamente con la cepa tipo *Brevibacterium casei* NCDO 2048<sup>T</sup> con un 96,2 % de similitud. Estos resultados, proporcionaron una tasa de positividad del 80 % para esta muestra. Esta tasa resultante tan elevada fue la que condicionó que se aplicase la estrategia de descontaminación en las muestras sucesivas de la 4 a la 10. Sin embargo, los resultados no se volvieron a repetir igual que en la primera muestra en la que se aplicó el tratamiento.

En las muestras 4 y 5 no se obtuvo crecimiento en las placas del tratamiento de descontaminación y se analizaron las diferentes morfologías que habían crecido en las muestras control a los 10 y 7 días, respectivamente, para la posterior identificación por secuenciación parcial del gen del rRNA 16S. Se analizaron 4 aislamientos de la muestra 4 y 7 aislamientos de la muestra 5. A los 20 días de incubación, del control de la muestra 5 se obtuvieron 3 aislamientos nuevos. Del resultado del análisis por secuenciación se obtuvieron 3 aislamientos de micobacterias de la muestra 5 y ninguno en la muestra 4. La tasa de positividad en la muestra 5 fue del 42,86 %, pero solo considerando el control, y del 0 % en la muestra 4. En base a los resultados, la muestra 4 no mostró presencia de micobacterias, bien por la ausencia de éstas, o bien porque el volumen de agua recogido para su análisis no fue suficiente para su detección, ya que ni el control ni el tratamiento mostraron el crecimiento de micobacterias. Por el contrario, en la muestra 5, se detectaron micobacterias únicamente en el control, sugiriendo que el tratamiento de descontaminación habría eliminado las micobacterias presentes.

El análisis por secuenciación parcial del gen del rRNA 16S de los 11 aislamientos del control (muestras 4 y 5) mostró que los 4 aislamientos de la muestra 4 (designados como 5-1, 5-2, 5-3 y 5-4) se identificaron con 2 especies del género *Bosea* (clase *Alphaproteobacteria*), *Bosea lupini* LMG 26383<sup>T</sup> (2 aislamientos) y *Bosea lathyri* LMG 26379<sup>T</sup> (2 aislamientos) con porcentajes de similitud entre el 98,9 % y 99,4 %. En los 7 aislamientos de la muestra 5, tan solo uno de ellos se identificó con el género *Bosea* (*B. lathyri*), junto con *Bradyrhizobium erythropohlei* (1 aislamiento) como pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria* y el resto de aislados se afiliaron al filo *Firmicutes* (*Bacillus licheniformis*), *Actinobacteria* (*Nocardioides pyridinolyticus*, 1 aislamiento y *Mycobacterium*, 3 aislamientos) y a la clase *Betaproteobacterium* (*Dechloromonas agitata*, 3 aislamientos), con porcentajes de similitud del 99 %. Los tres aislamientos de la muestra 5 que habían crecido en la muestra control a los 20 días de incubación fueron los identificados como *B. lathyri*, *B. erythropohlei* y *N. pyridinolyticus*. Los 3 aislamientos del género *Mycobacterium* obtenidos en la muestra control (6-4, 6-6 y 6-7) se identificaron con la cepa tipo *Mycobacterium phocaicum* CIP 108542<sup>T</sup> y se analizaron más detalladamente junto con otros genes específicos de micobacterias para la confirmación de la especie en la sección 3 del presente capítulo. Los resultados obtenidos de la afiliación filogenética de estos 11 aislados pertenecientes a la muestra 4 y 5 se muestran en la Tabla 18.

#### Muestras 6 a 10

Para las muestras 6 a 10 se filtraron 2 L de agua potable del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares (muestras 6 a 9) y de aguas puras de la Unidad de Diálisis del Hospital *Son Llätzer* cuando ya habían implantado el sistema de desinfección con tratamiento por ácido peracético (muestra 10). En la muestra 10, adicionalmente se filtró 1 L y el filtro de membrana resultante se colocó directamente sobre una placa con medio sólido agar R2A modificado (ver sección 3.3 de Materiales y Métodos). Tras el proceso de filtrado, ninguno de los filtros se llegó a colmatar. De la muestra directa de agua, sin filtrar, se realizó

el banco de diluciones con solución Ringer como muestra control y a partir del filtrado resuspendido en solución Ringer y sometida a la descontaminación, se obtuvo el banco de diluciones de la muestra del tratamiento.

Transcurrido el tiempo de incubación de siete días para las muestras 6 y 9 y de diez días para las muestras 7, 8 y 10, los recuentos obtenidos en el tratamiento de descontaminación presentaron valores inferiores a 1 ufc/ml en la muestra 6 y ausencia de crecimiento en las muestras 7 a 10 (Tabla 15). En las placas control los recuentos para las diferentes muestras oscilaron entre 8,1 ufc/ml (muestra 6) y 422 ufc/ml (muestra 8) con valores intermedios de 11,7 ufc/ml, 16,8 ufc/ml y 18,72 ufc/ml para la muestras 9, 7 y 10 respectivamente. En la Figura 25 se muestran ejemplos de los crecimientos en placas con medio agar R2A.

El control del inóculo de la cepa tipo *M. abscessus* subsp. *abscessus* CCUG 20993<sup>T</sup> resultó positivo en todas las muestras. Las placas de tratamiento de descontaminación proveniente del filtrado de 2 L presentaron, a los siete días de incubación a temperatura ambiente, el crecimiento de 1 única colonia en la muestra 6, que se aisló para el posterior análisis por secuenciación parcial del gen del rRNA 16S. En el resto de muestras de tratamiento de descontaminación (7 a 10) no se obtuvo ninguna colonia. A partir de las placas control se analizaron mediante secuenciación parcial del gen del rRNA 16S, 10, 3, 3, 8 y 5 colonias de las muestras 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente. Los aislados obtenidos en la muestra 6 se designaron con el número 7, seguido del número de aislamiento, los aislados de la muestra 7 con el número 8, los de la muestra 8 con el número 9, los de la muestra 9 con el número 10 y por último los de la muestra 10 con el número 11.

El análisis de las secuencias parciales del gen del rRNA 16S reveló que la única colonia aislada en el tratamiento de descontaminación que provenía de la muestra 6 se identificaba con un 99,5 % de similitud con la especie del filo *Firmicutes*, *Bacillus circulans* ATCC 4513<sup>T</sup>, especie que es alcohol ácido resistente. Por tanto, en el tratamiento de descontaminación la tasa de positividad de micobacterias fue nula.

En el análisis de los aislamientos obtenidos a partir del control, se identificó un aislado como miembro perteneciente al género *Mycobacterium* en la muestra 6 (7-4), identificándose con un 99,4 % de similitud con la especie tipo *Mycobacterium phocaicum* CIP 108542<sup>T</sup>. Un aislado de la muestra 9 (10-11) también se afilió al género *Mycobacterium*, aunque con una secuencia de mala calidad, que no permitió asignarlo a nivel de especie. Ambos aislados se analizaron posteriormente junto con otros genes específicos de micobacterias para la confirmación de la especie en la sección 3 del presente capítulo. En la Tabla 18 se detalla la afiliación filogenética obtenida para los aislados obtenidos en la muestras 6 a 10.

La tasa de positividad de los aislamientos analizados en la muestra 6 fue del 9,1 % y del 12,5 % en la muestra 9, mientras que se consideró nula para las muestras 7, 8 y 10. La ausencia de micobacterias tanto en la muestra control como en la muestra descontaminada de las muestras 7, 8 y 10, sugirió bien la ausencia de micobacterias, o bien que éstas se encontraban por debajo del límite de detección del método. Por el contrario, en las muestras 6 y 9, se

detectaron micobacterias en la muestra control y no en el tratamiento, sugiriendo que el proceso de descontaminación habría afectado a las micobacterias presentes, eliminándolas.

Los 9 aislamientos restantes del control de la muestra 6 se afiliaron a la clase *Alphaproteobacteria*: *Bosea lupini* (2 aislados) y *Bosea lathyri* (2 aislados), *Blastomonas natatoria* (2 aislados), *Brevundimonas nasdae* (1 aislado) y *Bradyrhizobium diazoefficiens* (2 aislados). Todos ellos con porcentajes de similitud entre el 98 y 99 %. Los tres aislamientos de la muestra 7 del control también se asignaron a la clase *Alphaproteobacteria*: *Blastomonas natatoria* (2 aislados) y *Nordella oligomobilis* (1 aislado). En el control de la muestra 8 se aislaron 3 especies de la clase *Betaproteobacteria*, pertenecientes al género *Acidovorax*: *Acidovorax defluvi* BSB411<sup>T</sup> (2 aislados) y *Acidovorax facilis* CCUG 2113<sup>T</sup> (1 aislado). El resto de aislamientos del control de la muestra 9 (7 en total), se identificaron con especies del filo *Firmicutes*: *Bacillus licheniformis* (2 aislamientos) y la clases *Alphaproteobacteria*: *Methylobacterium rhodesianum* (1 aislamiento), *Bosea lupini* (2 aislamientos) y *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* (1 aislamiento), y *Betaproteobacteria*: *Methyloversatilis universalis* (1 aislamiento), con porcentajes de similitud entre el 98 y 99 %. La presencia de especies del género *Methylobacterium* sp. se ha asociado a la ausencia de miembros del género *Mycobacterium* (Feazel *et al.*, 2009), aunque en nuestro caso, en la muestra 9 ambos géneros aparecen representados. Los 5 aislamientos de la muestra 10 se relacionaron igualmente con el filo *Firmicutes*, *Bacillus licheniformis* (2 aislamientos) y la clases *Alphaproteobacteria*, *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* (2 aislamientos) y *Betaproteobacteria*, *Aquabacterium commune* (1 aislamiento), todas ellas con porcentajes de similitud entre el 99 y 100 %.

Únicamente se observaron 2 colonias en el filtro adicional de la muestra 10 al incubarlo en medio agar R2A modificado. Éstas, posteriormente, en el análisis del gen del rRNA 16S, se identificaron con un 99 % de similitud con las especies *Variovorax paradoxus* y *Caulobacter leidyi*. Curiosamente, estos géneros no se detectaron en la misma muestra control sembrada en R2A convencional, a pesar de ser especies normalmente presentes en muestras de agua y capaces de crecer en R2A (Gomila *et al.*, 2005).

### Muestras 19 a 21

En las muestras 19 a 21 se filtró 1 L de agua potable del Servicio de Microbiología y de la Unidad de Cuidados intensivos del Hospital *Son Llätzer*, así como del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares, respectivamente. Ninguna de las muestras se llegó a colmar. La muestra directa de agua, sin filtrar, se analizó directamente. A partir del filtrado resuspendido en solución Ringer y sometida a la descontaminación, se analizó la muestra tratada. Cada muestra se sembró en placas de agar R2A y de Middlebrook 7H11.

Los recuentos obtenidos (Tabla 15) en las muestras 19, 20 y 21 para el tratamiento de descontaminación presentaron valores de 18, 24,5 y 36 ufc/ml en las placas de R2A y de 4, 12,5 y 25,5 ufc/ml en las de agar Middlebrook 7H11, respectivamente. Los recuentos en las

placas control fueron de 400, 0 y 8800 ufc/ml en placas agar y de 735, 0 y 0 ufc/ml para las placas de agar Middlebroock 7H11. Los datos revelaron recuentos equivalentes en ambos tipos de agar, sin diferencias destacables, en las muestras 19 y 20. Sin embargo, en la muestra 21, los recuentos en placas de agar R2A fueron significativamente más elevados que en las placas de agar Middlebroock 7H11. Respecto a los datos obtenidos de los recuentos en el tratamiento de descontaminación, se evidencian valores más elevados que en muestreos anteriores que se acompañan también de valores superiores en los recuentos control. En la muestra 19, los recuentos del tratamiento de descontaminación representaron el 6,12 % de los recuentos en el control en placas de R2A y el 1,70 % de los recuentos en el control en Middlebroock 7H11. Cabe destacar, que en la muestra 20 se obtuvieron recuentos superiores en la muestra sometida al tratamiento de descontaminación que el control, para ambos medios de cultivo. Lo mismo ocurrió en la muestra 21 en las placas de agar Middlebroock 7H11. Esto probablemente se debió a que, en ocasiones, al desprenderse las células de la biopelícula, éstas lo hacen formando agregados (microcolonias) pudiendo afectar ligeramente a los recuentos obtenidos.

El control del inóculo de la cepa tipo *M. abscessus* subsp. *abscessus* CCUG 20993<sup>T</sup> resultó positivo en todas las muestras. A partir de las placas en las que hubo crecimiento, tanto del control como del tratamiento de descontaminación, se aislaron dos ejemplares de cada una de las diferentes morfologías encontradas para analizarlas mediante secuenciación parcial del gen rDNA 16S.

Los datos obtenidos a través del análisis por comparación de secuencias en bases de datos revelaron que tras el tratamiento de descontaminación no se detectaron micobacterias en las muestras 19 a 21. En las muestras 20 y 21 tampoco se detectaron micobacterias en las placas control, sugiriendo la ausencia de micobacterias en dichas muestras. Por último, en el control de la muestra 19 se detectaron 2 aislamientos de micobacterias (N1 y N2) en agar Middlebroock 7H11, indicando, al igual que en muestreos anteriores, que el tratamiento de descontaminación podría eliminar las micobacterias presentes en la muestra y que el medio de cultivo Middlebroock 7H11 podría ser más eficiente que el agar R2A. Ambos aislamientos se identificaron con la cepa tipo *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977<sup>T</sup>, *M. abscessus* subsp. *bolletii* BD4<sup>T</sup>, *M. chelonae* CIP 104535<sup>T</sup> y *M. franklinii* CV002<sup>T</sup>, con un 99 % de similitud y analizándose más exhaustivamente mediante la amplificación de genes específicos de micobacterias, tal y como se especifica en la sección C3-3 del presente capítulo.

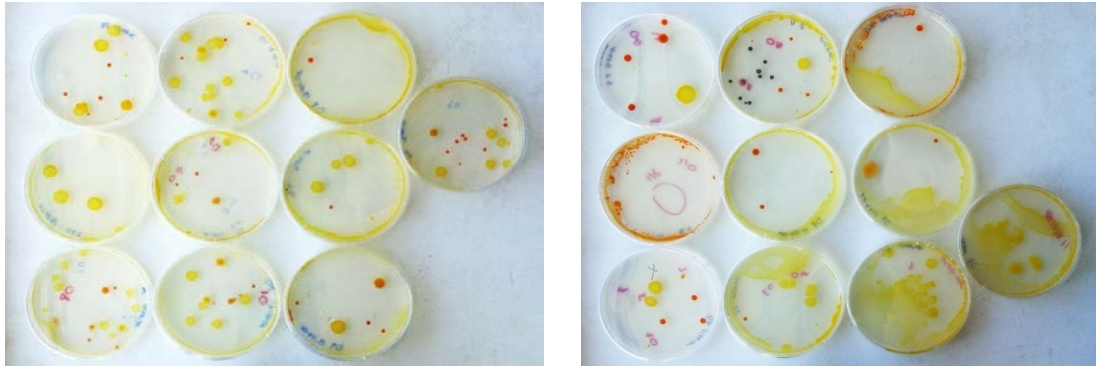
El número de aislamientos, indicado entre paréntesis, seleccionados de las morfologías diferentes restantes se identificaron con especies de la clase *Alphaproteobacteria* (*Bosea lupini* (1), *Bosea lathyri* (1), *Blastomonas natatoria* (1), *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* (1) y *Methylobacterium populi* (1)), *Betaproteobacteria* (*Achromobacter spanius* (1)), y *Gammaproteobacteria* (*Serratia marcescens* subsp. *marcescens* (1)). Todos ellos con porcentajes de similitud entre el 98 y 99 %. En la Tabla 18 se muestra la afiliación filogenética de cada uno de ellos y su correspondiente nomenclatura.

En resumen, la estrategia basada en el tratamiento de descontaminación, permitió seleccionar 60 aislamientos que se analizaron por secuenciación parcial del gen rDNA 16S para confirmar su afiliación filogenética al género *Mycobacterium*. De estos 60 aislamientos, 6 que representaban la totalidad de los aislamientos obtenidos, se obtuvieron en las placas sembradas a partir de la muestra descontaminada, y los 54 restantes se seleccionaron por morfología colonial de las placas control del agua sin descontaminar.

La afiliación filogenética de los 60 aislados identificó once de ellos como especies del género *Mycobacterium* (18,33 %), y todos ellos se analizaron más exhaustivamente mediante un análisis multigénico (2-1, 2-2, 2-3 y 2-5 aislados de la muestra 3 descontaminada, los aislados 6-4, 6-6 y 6-7 obtenidos del control de la muestra 5, el aislado 7-4 obtenido en el control de la muestra 6, el aislado 10-11 obtenido en el control de la muestra 9, y los aislados N1 y N2 obtenidos en el control de la muestra 19).

De los 49 aislamientos no afiliados al género *Mycobacterium*, 48 de ellos se asignaron filogenéticamente a especies conocidas mostrando más de un 99 % de similitud de secuencia con las cepas tipo correspondientes, concretamente a las especies *Acidovorax defluvii*/*Acidovorax facilis*, *Achromobacter spanius*, *Aquabacterium commune*, *Bacillus circulans*/*Bacillus licheniformis*, *Blastomonas natatoria*, *Bradyrhizobium erythrophle*/*Bradyrhizobium huanghuaihaiense*, *Bosea lupini*/*Bosea lathyri*, *Methylobacterium populi*/*Methylobacterium rhodesianum*, *Methyloversatilis universalis*, *Nocardioides pyridinolyticus*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Sphingomonas leidy* y *Variovorax guangxiensis*. Uno de ellos se afilió próximo a la cepa tipo de la especie *Dechloromonas agitata* con un 97 % de similitud, sugiriendo que probablemente representaría una nueva especie aún no descrita, para la cual se necesitará un estudio más detallado. Cabe destacar que muchos de estos aislados son comunes en muestras ambientales de sistemas acuáticos, así como de sedimentos y suelo.

De las muestras sometidas al tratamiento de descontaminación se aisló un total de seis colonias (10 %) de las cuales 4 fueron identificados como especies del género *Mycobacterium* (66,66 %) y los otros dos se afiliaron a las especies *Brevibacterium casei* y *Bacillus circulans*, mientras que de los 54 aislados obtenidos en las placas control sólo 7 (12,96 %) fueron identificadas como miembros del género *Mycobacterium*. Curiosamente, en ninguna muestra aparecieron aislamientos asignados al género *Mycobacterium*, ni en las placas sembradas a partir de la muestra descontaminada ni en la muestra sembrada directamente sin ser sometida a ningún tratamiento.



**Figura 25.** Ejemplo de crecimiento obtenido en placas de agar R2A de una muestra control incubadas a temperatura ambiente.

El resultado de la descontaminación previa resultó positiva únicamente en la muestra 3 que fue la primera de las muestras sometidas al tratamiento donde se obtuvieron 3 aislamientos de micobacterias. En las diez muestras restantes donde se llevó a cabo el tratamiento de descontaminación no hubo crecimiento de micobacterias en las placas con tratamiento, a pesar de optimizar y reproducir las condiciones exactas del primer experimento, pero sí en las muestras control. Así pues, el resto de micobacterias aisladas se obtuvieron de las muestras control de las 10 muestras restantes en las placas que no se había aplicado tratamiento de descontaminación previa. Un total de 4 muestras dieron positivas en el aislamiento de micobacterias, dando un porcentaje de positividad en la muestra control del 40 %. Considerando el total de muestras analizadas (11) y el total de muestras en las que se detectaron micobacterias, tanto en las placas control (4) como en las placas con tratamiento (1), se obtuvo un 45,45 % (5/11) de muestras positivas (Tabla 17).

Teniendo en cuenta la totalidad de las muestras (11) en las que se realizó una descontaminación previa, el éxito de la estrategia se situó en el 9,09 % (1), muy por debajo de lo esperado tras las expectativas creadas al analizar la muestra 3.

Se comprobó la resistencia a la descontaminación con hidróxido de sodio de distintas micobacterias de la colección de cultivos de la Universidad de las Islas Baleares. Los resultados mostraron que *M. abscessus* subsp. *abscessus* es resistente a la descontaminación, mientras que *M. llatzerense* es sensible (resultados no mostrados).

A la vista de estos resultados se planteó la realización de una serie de muestreos sin aplicar un tratamiento previo de descontaminación.

**Tabla 18.** Asignación filogenética de los aislados obtenidos en las muestras incluidas en la estrategia de descontaminación.

Muestra	Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
3	2-1	876	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> *	100	CU458896	<i>Mycobacterium chelonae</i> T5-2	100	AM884323
3	2-2	926	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> *	100	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH572	100	KR995262
3	2-3	892	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> *	100	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH931	100	KR995267
3	2-4	1268	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 <sup>T</sup>	96,2	X76564	<i>Brevibacterium</i> sp. K01-11	97	EU333879
3	2-5	880	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> *	100	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH572	100	KR995262
4	5-1	783	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 <sup>T</sup>	99,0	FR774992	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	99	EU256464
4	5-2	938	<i>Bosea lathyri</i> LMG 26379 <sup>T</sup>	99,0	FR774993	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	99	EU256464
4	5-3	932	<i>Bosea lathyri</i> LMG 26379 <sup>T</sup>	99,4	FR774993	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	99	EU256464
4	5-4	863	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 <sup>T</sup>	99,3	FR774992	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	99	EU256464
5	6-1	943	<i>Dechloromonas agitata</i> CKB <sup>T</sup>	97,2	AF047462	<i>Dechloromonas agitata</i> OTU-b31	99	KJ47072
5	6-2	1146	<i>Dechloromonas agitata</i> CKB <sup>T</sup>	96,2	AF047462	<i>Dechloromonas agitata</i> OTU-b31	98	KJ47072
5	6-3	946	<i>Dechloromonas agitata</i> CKB <sup>T</sup>	97,5	AF047462	<i>Dechloromonas agitata</i> OTU-b31	98	KJ47072
5	6-4	834	<i>Mycobacterium phocaicum</i> CIP 108542 <sup>T**</sup>	98,6	AY859682	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> CCUG 47451	99	AM902750
5	6-5	926	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup>	99,6	AE017333	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-02	99	CP012110
5	6-6	913	<i>Mycobacterium phocaicum</i> CIP 108542 <sup>T**</sup>	98,2	AY859682	<i>Mycobacterium chelonae</i> B14	97	JX010972
5	6-7	887	<i>Mycobacterium phocaicum</i> CIP 108542 <sup>T**</sup>	99,9	AY859682	<i>Mycobacterium phocaicum</i> MBWY-1	99	HQ845985
5	6-8	880	<i>Nocardioides pyridinolyticus</i> OS4 <sup>T</sup>	99,2	U61298	<i>Nocardioides pyridinolyticus</i> OS4	99	NR_036863
5	6-9	946	<i>Bosea lathyri</i> LMG 26379 <sup>T</sup>	99,0	FR774993	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	99	EU256464
5	6-10	906	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,9	KF114645	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> 53325	99	KF114645



Tabla 18. Continuación

Muestra	Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
6	7-3	989	<i>Blastomonas natatoria</i> DSM 3183 <sup>T</sup>	99,2	AB024288	<i>Blastomonas natatoria</i> T6AR1	99	JF459978
6	7-4	855	<i>Mycobacterium phocaicum</i> CIP 108542 <sup>T**</sup>	99,4	AY859682	<i>Mycobacterium phocaicum</i> MBWY-1	99	HQ845985
6	7-6	943	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513 <sup>T</sup>	99,5	AY724690	<i>Bacillus circulans</i> HT-200	99	KJ526907
6	7-7	845	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 <sup>T</sup>	98,9	FR774992	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCB AU 85058	99	EU256464
6	7-8	1018	<i>Bosea lathyri</i> LMG 26379 <sup>T</sup>	99,3	FR774993	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCB AU 85058	99	EU256464
6	7-9	831	<i>Bosea lathyri</i> LMG 26379 <sup>T</sup>	98,9	FR774993	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCB AU 85058	99	EU256464
6	7-10	998	<i>Brevundimonas nasdae</i> GTC 1043 <sup>T</sup>	99,4	AB071954	<i>Brevundimonas vesiculari</i> G2-1-80	99	KC494336
6	7-12	962	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 <sup>T</sup>	99,7	BA000040	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> z82b	99	AB698736
6	7-13	853	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 <sup>T</sup>	98,9	FR774992	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCB AU 85058	99	EU256464
6	7-14	918	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 <sup>T</sup>	99,8	BA000040	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> z82b	100	AB698736
6	7-15	1099	<i>Blastomonas natatoria</i> DSM 3183 <sup>T</sup>	99,3	AB024288	<i>Blastomonas natatoria</i> T6AR1	99	JF459978
7	8-1	877	<i>Methylocystis bryophila</i> H2s <sup>T</sup>	91,9	FN422003	<i>Nordella oligomobilis</i> N21	99	NR_114615
7	8-4	870	<i>Blastomonas natatoria</i> DSM 3183 <sup>T</sup>	99,8	AB024288	<i>Sphingomonas ursincola</i> MGH111	99	KM248743
7	8-5	955	<i>Blastomonas natatoria</i> DSM 3183 <sup>T</sup>	99,2	AB024288	<i>Blastomonas natatoria</i> P3AG4-Bn1	100	HF930745
8	9-3	959	<i>Acidovorax defluvii</i> BSB411 <sup>T</sup>	99,2	Y18616	<i>Acidovorax facilis</i> 228	99	EU730927
8	9-4	887	<i>Acidovorax defluvii</i> BSB411 <sup>T</sup>	99,3	Y18616	<i>Acidovorax facilis</i> 228	99	EU730927
8	9-6	1129	<i>Acidovorax facilis</i> CCUG 2113 <sup>T</sup>	98,7	AF078765	<i>Acidovorax facilis</i> 228	98	EU730927
9	10-1	871	<i>Methyloversatilis universalis</i> FAM5 <sup>T</sup>	98,2	AFHG01000027	<i>Methyloversatilis</i> sp. DMSF-7	99	KC860260
9	10-2	960	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> DSM 5687 <sup>T</sup>	99,2	AB175642	<i>Methylobacterium lusitanum</i> NCIMB 13779	99	NR_112233

Tabla 18. Continuación.

Muestra	Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
9	10-4	852	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 <sup>T</sup>	99,3	FR774992	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	99	EU256464
9	10-8	911	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup>	98,2	AE017333	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-02	98	CP012110
9	10-9	836	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 <sup>T</sup>	98,9	FR774992	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	99	EU256464
9	10-10	861	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 <sup>T</sup>	99,8	HQ231463	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> z82b	99	AB698736
9	10-11	-	-	-	-	-	-	-
10	11-1	900	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 <sup>T</sup>	100	HQ231463	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> XBU4	99	JX424777
10	11-3	999	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup>	99	AE017333	<i>Bacillus licheniformis</i> MX5	99	JX027378
10	11-4	863	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup>	99,1	AE017333	<i>Bacillus licheniformis</i> WX-02	98	CP012110
10	11-5	931	<i>Aquabacterium commune</i> B8 <sup>T</sup>	99,5	AF035054	<i>Aquabacterium commune</i> B8	99	NR_024875
10	11-11	884	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 <sup>T</sup>	99,8	HQ231463	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> XBU4	99	JX424777
10	JA	919	<i>Variovorax guangxiensis</i> GXGD002 <sup>T</sup>	99,7	JF495126	<i>Variovorax paradoxus</i> QE5	99	KP686135
10	JB	786	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260 <sup>T</sup>	99,2	AJ227812	<i>Caulobacter leidyi</i>	99	AF331660
20	A2	1089	<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 <sup>T</sup>	99,5	AY170848	<i>Achromobacter spanius</i> JN52	99	KF150361
19	C1	933	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880 <sup>T</sup>	99,7	JMPQ01000005	<i>Serratia marcescens</i> IS148	99	KR856282
19	N1	877	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T*</sup>	99,9	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH339	99	KR995266
19	N2	894	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T*</sup>	99,2	CU458896	<i>Mycobacterium abscessus</i> WH339	99	KR995266
19	R1	1163	<i>Bosea lupini</i> LMG 26383 <sup>T</sup>	98,5	FR774992	<i>Bosea vestrisii</i> B1PC9	98	JQ689184
20	G2	1104	<i>Blastomonas natatoria</i> DSM 3183 <sup>T</sup>	98,6	AB024288	<i>Blastomonas natatoria</i> T6AR1	99	JF459978
20	Q2	1042	<i>Methylobacterium populi</i> BJ001 <sup>T</sup>	99,8	CP001029	<i>Methylobacterium aminovorans</i> CRR1-57	99	JNS92474
21	K3	1043	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 <sup>T</sup>	99,5	HQ231463	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> z82b	99	AB698736
21	P3	1118	<i>Bosea lathyri</i> LMG 26379 <sup>T</sup>	98,3	FR774993	<i>Bradyrhizobium</i> sp. CCBAU 85058	98	EU256464

\*Estos aislados mostraron la misma similitud con las secuencias de la cepa tipo *M. abscessus* subsp. *abscessus* ATCC 19977<sup>T</sup>, *M. abscessus* subsp. *bolletii* BD4<sup>T</sup>, *M. chelonae* CIP 104535<sup>T</sup> y *M. franklinii* CV002<sup>T</sup>.

\*\* Estos aislados mostraron la misma similitud con las secuencias de la cepa tipo *M. phocaicum* CIP 108542<sup>T</sup> y *M. mucogenicum* ATCC 49650<sup>T</sup>

-, No se obtuvo una secuencia de calidad pero por el análisis filogenético se asignó filogenéticamente a la cepa tipo de la especie *M. porcinum*/*M. neworleansense*

### C3-1.3 Recuperación de micobacterias ambientales sin tratamiento de descontaminación previa

Con el objetivo de aislar más cepas del género *Mycobacterium* se diseñó un experimento para recoger muestras mensuales de agua de la unidad de diálisis del Hospital *Son Llätzer*, donde en estudios previos realizados en el año 2003 se habían obtenido numerosos aislados identificados como cepas del género *Mycobacterium* (Gomila *et al.*, 2005, 2007).

Se tomaron muestras de agua del punto M3, antes y después del tratamiento de desinfección con ácido peracético, así como del líquido de diálisis tras la reconstitución (muestra M4). Se recogieron muestras antes y después del tratamiento de desinfección para asegurar que no se desprendiesen las micobacterias de la biopelícula formada a lo largo del sistema de distribución consecuencia del tratamiento de desinfección.

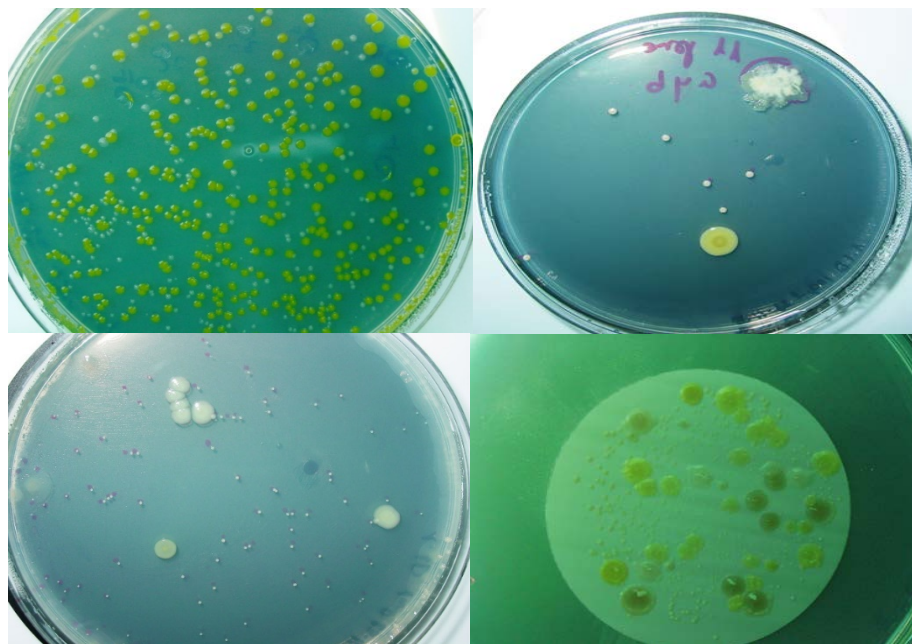
En total se realizaron cuatro muestreos, el muestreo I, realizado el 23 y el 24 de noviembre del 2007 (antes y después del tratamiento de desinfección), equivalente a la muestra 11 y 12, el muestreo II (equivalente a la muestra 13 y 14) realizado el 21 y el 22 de Diciembre de 2007, el muestreo III (equivalente a la muestra 15 y 16) realizado el 16 y 17 de Enero de 2008 y el muestreo IV (equivalente a la muestra 17 y 18) se realizó el 20 y el 21 de Febrero. Se recogieron las muestras siempre del Box 11.

Diluciones seriadas de la muestra, así como el filtro tras filtrar 10 ml, por duplicado, se sembraron en agar R2A, incubándose las placas durante 10 días a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a los recuentos de las células cultivables para determinar los valores de ufc/ml. En la muestra M3 se obtuvieron, antes del tratamiento de desinfección, valores que oscilaron entre 5,2 y 170,5 ufc/ml, mientras que después del tratamiento oscilaron entre 5 y 1005 ufc/ml. Por otro lado, en la muestra 4 se obtuvieron recuentos por debajo de 1 ufc/ml en todos los casos, antes y después del tratamiento de desinfección, a excepción del muestreo III donde antes del tratamiento se obtuvieron 52 ufc/ml y después del tratamiento 5 ufc/ml. Los recuentos obtenidos desglosados se muestran en la Tabla 15.

De cada uno de los muestreos se seleccionaron dos o tres representantes de cada morfología colonial independientemente de la coloración que mostrasen. En la Figura 26 se muestra un ejemplo de las morfologías obtenidas en las placas de agar R2A. Una vez obtenido el cultivo puro se procedió a guardarlos en sales crioprotectoras en el congelador REVCO -80 °C y se llevó a cabo la extracción de DNA seguido de la PCR y secuenciación del gen del rRNA 16S.

En total se seleccionaron 85 aislamientos para su posterior análisis filogenético, 15 para la muestra I, 24 para la muestra II, 23 para la muestra III y 23 para la muestra IV. Las secuencias parciales obtenidas se compararon con las secuencias de referencia del gen del rRNA 16S de las especies tipo disponibles en el servidor EzTaxon-e y con las secuencias correspondientes

más cercanas obtenidas de la bases de datos de secuencias nucleotídicas del NCBI. En la Tabla 19 se muestra la afiliación filogenética obtenida para estos 85 aislados.



**Figura 26.** Ejemplo de morfologías coloniales obtenidas en placas de agar R2A del muestreo realizado en la unidad de diálisis del Hospital *Son Llàtzer*.

El 92,94 % de los aislamientos (79) se asignaron filogenéticamente a especies conocidas mostrando más de un 97 % de similitud de secuencia con las cepas tipo correspondientes y el 7,05 % de los aislamientos (6) mostraron un 96 % de similitud de secuencia con especies tipo conocidas, representando probablemente especies nuevas no descritas hasta el momento y filogenéticamente relacionadas con *Brevundimonas vancouverii*, *Jiella aquimaris* y *Paracoccus panacisoli*, todas ellas pertenecientes a la clase *Alphaproteobacteria*.

Por tanto, se encontraron representantes de 4 filos: *Proteobacteria* (60), *Actinobacteria* (16), *Bacteroidetes* (5) y *Firmicutes* (4). La clase más representada dentro del filo *Proteobacteria* fue *Alphaproteobacteria* (41), seguida de *Betaproteobacteria* (15) y finalmente, *Gammaproteobacteria* (4).

Las especies representadas, y el número de aislamientos indicado entre paréntesis, dentro de la clase *Alphaproteobacteria* fueron: *Agrobacterium tumefaciens* (1), *Acinetobacter schindleri* (1), *Bradyrhizobium erythrophlei* (11), *Brevundimonas vancouverii* (1), dos especies del género *Caulobacter*, *C. segnis* (3) y *C. vibrioides* (2), *Jiella aquimaris* (4), *Ochrobactrum anthropi* (2), *Paracoccus panacisoli* (3), *Skermanella stibiirensistens* (1) y por último 3 especies del género *Sphingomonas*, *S. leidyi* (6), *S. paucimobilis* (3) y *S. sanguinis* (3). De los 10 géneros representados, únicamente 4 coincidieron con los aislamientos obtenidos en la muestra de 2003 cuando se aplicaba el tratamiento de desinfección con hipercloración puntual, *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Paracoccus* y *Sphingomonas*. Curiosamente estos géneros presentes en ambas muestras del Hospital *Son Llàtzer*, excepto el género *Paracoccus*, también fueron los únicos compartidos para la clase *Alphaproteobacteria* con los aislamientos

obtenidos en muestras equivalentes obtenidas de la unidad de diálisis del Hospital Universitario *Son Espases* (Tesis doctoral Claudia Prince, 2015)

La clase *Betaproteobacteria* se afilió a las especies *Cupriavidus metallidurans* (2), *Ralstonia insidiosa* (11) y *Variovorax guangxiensis* (2). En comparación con la muestra obtenida de 2003 del Hospital de *Son Llätzer*, solo aparece representado el género *Variovorax* en ambas muestras. Por el contrario, en el caso de la muestra del Hospital Universitario *Son Espases* (Tesis doctoral Claudia Prince, 2015), los géneros coincidentes son los géneros *Cupriavidus* y *Ralstonia*.

Finalmente, para el filo *Proteobacteria*, la clase *Gammaproteobacteria* estuvo representada por las especies *Halomonas hamiltonii* (2) cuyas secuencias destacan por ser similares a las de aislamientos obtenidos de muestras de la unidad de hemodiálisis (Kim *et al.*, 2010), *Prolinoborus fasciculus* (1) y *Pseudomonas oryzihabitans* (1). Los géneros de *Halomonas* y *Pseudomonas* aparecen también representados en aislamientos de muestras obtenidas en 2003 recogidas del mismo punto de la unidad de diálisis del Hospital *Son Llätzer* pero no aparece ningún género coincidente dentro de esta clase con la muestra del Hospital Universitario *Son Espases*.

Las cepas del filo *Actinobacteria* se afiliaron a las especies *Aeromicrobium alkaliterrae* (1), *Brachy bacterium paraconglomeratum* (5), dos especies del género *Kocuria*, *K. palustris* (1), *K. rhizophila* (1), *Leifsonia lichenia* (1), tres especies del género *Microbacterium*, *M. aerolatum* (3), *M. oleivorans* (1), y *M. yannicii* (1), y dos especies del género *Micrococcus*, *M. aloeverae* (1) y *M. luteus* (1). En este filo no aparece ningún género coincidente con la muestra obtenida del mismo punto en 2003 y que podría deberse principalmente al tratamiento implantado de desinfección con ácido peracético a pesar de que el género *Leifsonia* aparece representado en la muestra analizada del Hospital *Son Espases*, donde también se aplica el tratamiento con ácido peracético.

Finalmente, las 3 especies del género *Bacillus*, *B. circulans*, *B. pumilus* y *B. safensis* integraron la representación del filo *Firmicutes*.

De un total de 85 aislamientos no se detectó ningún aislamiento afiliado a especies del género *Mycobacterium* sp., hecho que difiere de los resultados obtenidos en una muestra equivalente del año 2003 (Gomila *et al.*, 2005). Dado que el muestreo se realizó una vez implantado el tratamiento de desinfección con ácido peracético en base a los resultados que se habían obtenido con anterioridad, este resultado viene a confirmar la efectividad del tratamiento que se implantó en la eliminación de la biopelícula estable que permanecía en los sistemas de distribución de aguas puras de hemodiálisis. Respecto a los últimos estudios que apuntan al género *Methylobacterium* sp. como un sólido indicador de la ausencia de micobacterias ambientales (Falkinham, 2015), no sería válido para este caso, debido a que en ninguna muestra de 11 a 18 se detectaron especies afiliadas al género *Mycobacterium* sp., ni *Methylobacterium* sp., aunque hay que tener en cuenta que son métodos dependientes de cultivo.

**Tabla 19.** Asignación filogenética de los 85 aislados de las muestras 11 a 18, en base a la secuenciación parcial del gen del rRNA 16S.

Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo de la especie más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
I1a	814	<i>Acinetobacter schindleri</i> CIP 107287 <sup>T</sup>	99,3	APPO01000011	<i>Acinetobacter</i> sp. CIP 101934	99	JQ638573
I1b	1013	<i>Prolinoborus fasciculus</i> CIP 103579 <sup>T</sup>	100	JN175353	<i>Prolinoborus fasciculus</i> IHBB 9208	99	HR085813
I2b	713	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513 <sup>T</sup>	99,9	AY724690	<i>Bacillus circulans</i> KAR81	99	KR055041
I3a	975	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,8	KF114645	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6154	100	FJ025100
I3b	964	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,8	KF114645	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6154	100	FJ025100
I4b	723	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	100	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
I5a	1009	<i>Pseudomonas oryzae</i> NBRC 102199 <sup>T</sup>	100	BBIT01000012	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> S6-247	99	JQ660202
I8b	952	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	100	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
I9a	985	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260 <sup>T</sup>	99,8	AJ227812	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260	99	NR_025324
I9b	931	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260 <sup>T</sup>	100	AJ227812	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260	100	NR_025324
I10a	866	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	98,7	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944	99	NR_025242
I11a	928	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b <sup>T</sup>	100	ASID01000027	<i>Bacillus safensis</i> CAIM 677	100	HM584003
I11b1	897	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b <sup>T</sup>	98,0	ASID01000027	<i>Bacillus pumilus</i> YXY-10	96	KP400534
I11b2	937	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b <sup>T</sup>	100	ASID01000027	<i>Bacillus safensis</i> IHBB 11005	99	KR085891
I12a3	884	<i>Kocuria rhizophila</i> DSM 11926 <sup>T</sup>	100	Y16264	<i>Kocuria rhizophila</i> KP135f	99	KT200507
II1a	805	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99	KF114645	<i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA 6056	99	FJ390902
II1a3	874	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,6	KF114645	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6154	99	FJ025100
II1a3	863	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> NBRC 13935 <sup>T</sup>	99,1	BBJS01000072	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> L6-303	99	JQ659376
II1b	862	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> NBRC 13935 <sup>T</sup>	99,4	BBJS01000072	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> L6-303	99	JQ659376
II2a3	893	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260 <sup>T</sup>	99,9	AJ227812	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260	99	NR_025324
II2b	956	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260 <sup>T</sup>	99,8	AJ227812	<i>Sphingomonas leidyi</i> ATCC 15260	99	NR_025324
II3	948	<i>Variovorax guangxiensis</i> GXGD002 <sup>T</sup>	99,7	JF495126	<i>Variovorax paradoxus</i> QE5	99	KP686135

Tabla 19. Continuación.

Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo de la especie más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
II'4a	727	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	100	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
II'4b1	784	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	99,5	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
II'4b2	802	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	99,6	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
II'4a	951	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 <sup>T</sup>	98,8	D13726	<i>Sphingomonas sanguinis</i> L4-730	99	JQ659366
II'4b	897	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 <sup>T</sup>	99,2	D13726	<i>Sphingomonas sanguinis</i> L4-730	99	JQ659366
II'5a	914	<i>Caulobacter vibrioides</i> CB51 <sup>T</sup>	98,9	AJ009957	<i>Caulobacter vibrioides</i> JCT-7	99	JQ675297
II'5b	898	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188 <sup>T</sup>	100	CP000758	<i>Ochrobactrum anthropi</i> R058	100	KC252888
II'6	749	<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 <sup>T</sup>	98,6	CP002008	<i>Caulobacter vibrioides</i> 212	99	EU730915
II'6a	834	<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 <sup>T</sup>	98,6	CP002008	<i>Caulobacter vibrioides</i> 212	99	EU730915
II'7	717	<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i> KSL-107 <sup>T</sup>	97,3	AY822044	<i>Aeromicrobium</i> sp. 1_C7_65	99	EF540459
II'7a	695	<i>Paracoccus panacisoli</i> DCY94 <sup>T</sup>	96,7	KI653224	<i>Paracoccus sanguinis</i> 05503	97	KJ960184.2
II'8	928	<i>Vibrionomonas magnilacihabitanis</i> MU-2 <sup>T</sup>	100	FJ816610	<i>Sediminibacterium</i> sp. I-32	99	AM990455
II'8	914	<i>Skermanella stibiresistens</i> SB22 <sup>T</sup>	98,0	HQ315828	<i>Skermanella aerolata</i> PL45	99	HQ234263
II'9	985	<i>Microbacterium oleivorans</i> DSM 16091 <sup>T</sup>	99,4	AJ698725	<i>Microbacterium paraoxydans</i> A9sp3-12	99	KF938675
II'9	955	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	100	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
II'10	835	<i>Microbacterium yannicii</i> G72 <sup>T</sup>	98,2	FN547412	<i>Microbacterium</i> sp. 5_46	99	HF954420
II'11a	974	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,8	KF114645	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6154	99	F1025100.2
III'1b	944	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	99,4	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944	99	NR_025242
III'2b	899	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,7	KF114645	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> LN8	99	GQ181044
III'1a	1050	<i>Halomonas stevensii</i> S18214 <sup>T</sup>	99,6	AJTS01000047	<i>Halomonas stevensii</i> H35115	99	AM941393
III'1b	864	<i>Halomonas hamiltonii</i> W1025 <sup>T</sup>	99,4	AM941396	<i>Halomonas stevensii</i> H35115	99	AM941393
III'2a	918	<i>Jeila aquimaris</i> LZB041 <sup>T</sup>	96,6	KI620984	<i>Aureimonas</i> sp. PAMC27157	99	KM273177
III'2b	924	<i>Jeila aquimaris</i> LZB041 <sup>T</sup>	96,3	KI620984	<i>Aureimonas</i> sp. PAMC27157	99	KM273177

Tabla 19. Continuación.

Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo de la especie más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
III3	902	<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937 <sup>T</sup>	99,1	D13726	<i>Sphingomonas sanguinis</i> L4-730	99	JQ659366
III3_4	743	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> NBRC 13935 <sup>T</sup>	97,8	BBJS01000072	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> L6-303	98	JQ659376
III'3a	919	<i>Microbacterium aerolatum</i> V-73 <sup>T</sup>	99,7	AJ309929	<i>Microbacterium aerolatum</i> PDLF3	99	JN934389
III'3b	1032	<i>Microbacterium aerolatum</i> V-73 <sup>T</sup>	99,7	AJ309929	<i>Microbacterium</i> sp. DmB 4/JM. <i>aerolatum</i> KNUC9057 <i>Microbacterium aerolatum</i>	100/99	KF720917, JF505991
III'3c	835	<i>Microbacterium aerolatum</i> V-73 <sup>T</sup>	99,6	AJ309929	0911TES22V5 <i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	99	LN774360
III'4	886	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861 <sup>T</sup>	99,9	AJ415377	DN73_5E10	99	KP769418
III4a	735	<i>Jiella aquimaris</i> LZB041 <sup>T</sup>	96,3	KI620984	<i>Aureimonas</i> sp. PAMC27157	99	KM273177
III4b	927	<i>Jiella aquimaris</i> LZB041 <sup>T</sup>	96,7	KI620984	<i>Aureimonas</i> sp. PAMC27157	99	KM273177
III5a	932	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 <sup>T</sup>	100	Y16263	<i>Kocuria palustris</i> IHBB 11063	100	KR085940
III5b	935	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861 <sup>T</sup>	99,0	AJ415377	<i>Brachybacterium</i> sp. FXJ8.235	99	KM507604
III'5a	934	_*	-	-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ALEB 5A <i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	100	KF460525
III'5b	692	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861 <sup>T</sup>	97,9	AJ415377	DN73_5E10	96	KP769418
III6a	946	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861 <sup>T</sup>	99,3	AJ415377	<i>Brachybacterium</i> sp. FXJ8.235	99	KM507604
III8a	851	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 <sup>T</sup>	99,9	CP000353	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	99	NR_074704
III8b	784	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	99,6	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
III9	946	<i>Variovorax guangxiensis</i> GXGD002 <sup>T</sup>	99,5	JF495126	<i>Variovorax paradoxus</i> QE5	99	KP686135
III10	866	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188 <sup>T</sup>	99,8	CP000758	<i>Ochrobactrum anthropi</i> Jcm1	99	KJ009244
IV'1	905	<i>Caulobacter vibrioides</i> CB51 <sup>T</sup>	99,6	AJ009957	<i>Caulobacter vibrioides</i> 212	99	EU730915
IV2a	651	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	98,6	KF114645	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> DN55_6A7 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 6154	99	KP769443
IV'2b	927	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,8	KF114645	6154	99	FJ025100.2



Tabla 19. Continuación.

Aislado	Longitud (pb)	Cepa tipo de la especie más próxima	Similitud (%)	N° acceso	Cepa más próxima	Similitud (%)	N° acceso
IV3a	1008	<i>Vibriomonas magnilacihabitans</i> MU-2 <sup>T</sup>	99,8	FJ816610	<i>Sediminibacterium</i> sp. I-32	99	AM990455
IV'3a	975	<i>Vibriomonas magnilacihabitans</i> MU-2 <sup>T</sup>	100	FJ816610	<i>Sediminibacterium</i> sp. I-32	99	AM990455
IV4a	943	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 <sup>T</sup>	100	CP000353	<i>Cupriavidus</i> sp. B42/ <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34	100/99	KF788058, NR_074704
IV4b	923	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	99,9	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
IV'4a	888	<i>Ralstonia insidiosa</i> AU2944 <sup>T</sup>	100	AF488779	<i>Ralstonia insidiosa</i> AF7	99	LC015529
IV5a	978	<i>Sphingomonas leidy</i> ATCC 15260 <sup>T</sup>	100	AJ227812	<i>Sphingomonas leidy</i> ATCC 15260	99	NR_025324
IV6a	677	<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 <sup>T</sup>	98,4	CP002008	<i>Caulobacter vibrioides</i> JCT-7	99	IQ675297
IV6b	481	<i>Brevundimonas vancouverii</i> LMG 2337 <sup>T</sup>	96,9	AJ227779	<i>Caulobacter vibrioides</i> JCT-7	97	IQ675297
IV'6	444	<i>Leifsonia lichenia</i> 2Sb <sup>T</sup>	98,4	AB278552	<i>Leifsonia shinshuensis</i> EGE-B-2A	99	KP050789
IV7a	968	<i>Vibriomonas magnilacihabitans</i> MU-2 <sup>T</sup>	100	FJ816610	<i>Bacteroidetes bacterium</i>	100/99	FJ816610, AM990455
IV7b	691	<i>Vibriomonas magnilacihabitans</i> MU-2 <sup>T</sup>	99,4	FJ816610	<i>Bacteroidetes bacterium</i>	99	FJ816610, AM990455
IV8	961	<i>Sphingomonas leidy</i> ATCC 15260 <sup>T</sup>	100	AJ227812	<i>Sphingomonas leidy</i> ATCC 15260	99	NR_025324
IV'8	658	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,1	KF114645	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> DN55_6A7	99	KP769443
IV'10a	969	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,8	KF114645	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> JNFb3	100	GQ181042
IV'10b	969	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> CCBAU 53325 <sup>T</sup>	99,8	KF114645	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> JNFb3	99	GQ181042
IV'13a	636	<i>Paracoccus sanguinis</i> 5503 <sup>T</sup>	98,6	JRQ01000154	<i>Paracoccus sanguinis</i> 05503	98	KJ960184.2
IV'14	818	<i>Paracoccus panacisoli</i> DCY94 <sup>T</sup>	99,0	KJ653224	<i>Paracoccus sanguinis</i> 05503	99	KJ960184.2
IV'15b	639	<i>Micrococcus aloeverae</i> AE-6 <sup>T</sup>	99,0	KF524364	<i>Micrococcus yunnanensis</i> BYDU01-MB-RSA-009-CON9	99	KC130878
IV'16a	816	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861 <sup>T</sup>	99,4	AJ415377	<i>Brachybacterium conglomeratum</i> I1	99	KP895571
IV'18	573	<i>Micrococcus luteus</i> NCTC 2665 <sup>T</sup>	98,9	CP001628	<i>Micrococcus luteus</i> IC C3.2	99	KR047779

-, Secuencia no afiliada por el programa Ez-Taxon.

### C3-2 AISLAMIENTO DE MICOBACTERIAS DE ORIGEN CLÍNICO

Simultáneamente al aislamiento de micobacterias de origen ambiental a lo largo de la elaboración de esta tesis doctoral, se han ido recogiendo micobacterias de origen clínico del laboratorio de microbiología del antiguo Hospital Universitario *Son Dureta*, cedidas por el facultativo Dr. Antonio Ramírez, y del Hospital *Son Llätzer*, cedidas por la Dra. María del Carmen Gallegos, identificadas rutinariamente en el laboratorio como micobacterias atípicas o de crecimiento rápido. En total, se ha trabajado con 30 aislados de micobacterias. Del Hospital *Son Llätzer*, se obtuvieron seis aislados en el año 2005 (HSL1 a HSL6) y quince en el año 2009 (M1 a M15). Del Hospital Universitario *Son Dureta* se obtuvieron nueve, denominados M1SD a M9SD, en el año 2010. Todos ellos se sembraron en agar R2A incubándose 3-4 días a 30 °C.

Una vez comprobado el cultivo puro, se guardó el cultivo con sales -70 y se procedió a la extracción de DNA de cada uno de ellos, así como a la PCR y secuenciación del gen del rRNA 16S para confirmar su afiliación filogenética al género *Mycobacterium*. A excepción de los aislamientos M6, M7, M15, que se descartaron porque mostraron más de una morfología colonial en placa, y el HSL3 que no se pudo recuperar en cultivo, el resto de aislamientos se afiliaron a especies del género *Mycobacterium* y se analizaron más exhaustivamente mediante el análisis multigénico. En la Tabla 20 se listan los aislados de micobacterias de origen clínico en los que se ha trabajado a lo largo de esta tesis doctoral.

### C3-3 ANÁLISIS MULTIGÉNICO DE LAS MICOBACTERIAS AMBIENTALES Y CLÍNICAS OBTENIDAS

A partir de los 15 aislamientos de origen ambiental y los 26 de origen clínico identificados mediante la secuenciación parcial del gen del rRNA 16S como cepas pertenecientes al género *Mycobacterium*, se procedió a un análisis multigénico de éstos. En total, se ha trabajado con 41 aislamientos. Para ello, se amplificaron y secuenciaron los genes del rRNA 16S, ITS1, *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB* y *sodA*. Se obtuvo producto amplificado y secuencia para la mayoría de cepas estudiadas. Para el gen del rRNA 16S se obtuvieron secuencias entre 655 y 1200 pb, para el espaciador intergénico ITS1, entre 140 a 209 pb, para el gen *gyrB*, entre 220-285 pb, para el gen *hsp65*, entre 307-395 pb, para el gen *recA* entre 664-842 pb, para el gen *rpoB* entre 634-703 pb y para el gen *sodA* entre 320-460 pb. En la Tabla 21 se muestran los genes amplificados y secuenciados para cada una de las cepas.

Para los aislados ambientales, los cebadores y las condiciones de PCR o de secuenciación no permitieron obtener una secuencia para el gen *sodA* en los aislados, 1-1,1-3, 1-4, 1-5, 2-1, 2-2, 2-3 y 2-5; el gen *rpoB* en los aislados 2-1 y 6-6; el gen *gyrB* en los aislados 2-1, 6-7, 7-4, N1 y N2; el gen *hsp65* en los aislados 1-4, 1-5, 2-2, 2-3, 2-5, 6-4 y 10-11; el ITS1 en los aislados 6-6, 6-7, 7-4 y 10-11; y el gen *recA* en los aislados 1-5, N1 y N2.

**Tabla 20.** Listado de aislamientos de micobacterias atípicas de origen clínico que han sido objeto de estudio en la tesis.

Aislamiento	Fecha	Origen	Identificación inicial
HSLL1 (3-1)	20-10-05	HSLL <sup>a</sup>	<i>M. goodii</i>
HSLL2 (3-2)	05-10-05	HSLL	Escotocromógena, crecimiento rápido
HSLL3 (3-3)	20-10-05	HSLL	Escotocromógena, crecimiento rápido
HSLL4 (3-4)	27-07-05	HSLL	Escotocromógena, crecimiento rápido
HSLL5 (3-5)	27-06-05	HSLL	No tipado
HSLL6 (3-6)	25-07-05	HSLL	No tipado
M1	2010	HSLL	Micobacterias atípicas
M2	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M3	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M4	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M5	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M6	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M7	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M8	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M9	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M10	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M11	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M12	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M13	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M14	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M15	2009	HSLL	Micobacterias atípicas
M1SD	2010	HUSD <sup>b</sup>	No tipado
M2SD	2010	HUSD	No tipado
M3SD	2010	HUSD	No tipado
M4SD	2010	HUSD	No tipado
M5SD	2010	HUSD	No tipado
M6SD	2010	HUSD	No tipado
M7SD	2010	HUSD	No tipado
M8SD	2010	HUSD	No tipado
M9SD	2010	HUSD	No tipado

<sup>a</sup>Hospital Son Llätzer; <sup>b</sup>Hospital Universitario Son Dureta.

Para los aislados clínicos, no se pudieron obtener secuencias válidas, del gen *sodA* para los aislados HSLL1, HSLL4, M2, M9, M10, M11 y M14; del gen *hsp65* para el aislado M14; del gen *recA* en los aislados HSLL1, M1, M4, M9, M14 y M4SD; del gen *gyrB*, en el aislado HSLL1; y del gen del rRNA 16S, el M1SD.

En 2 aislados de origen clínico (M2 y M9) y 3 de origen ambiental (2-1, 2-2 y 6-4) se detectaron dos bandas en el ITS1, no pudiéndose obtener secuencia. Tres aislados (10-11, HSLL2 (3-2) y M1SD) presentaron una mezcla en la secuencia obtenida para el gen del rRNA 16S sugiriendo la existencia de más de un operón.

**Tabla 21.** Genes amplificados y secuenciados para los 41 aislados de micobacterias de origen ambiental y clínico.

Cepa	rDNA 16S	ITS	<i>gyrB</i>	<i>hsp65</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>sodA</i>
1-1	+	+	+	+	+	+	-
1-3	+	+	+	+	+	+	-
1-4	+	+	+	-	+	+	-
1-5	+	+	+	-	-	+	-
2-1	+	-	-	+	+	-	-
2-2	+	-	+	-	+	+	-
2-3	+	+	+	-	+	+	-
2-5	+	+	+	-	+	+	-
6-4	+	-	+	-	+	+	+
6-6	+	-	+	+	+	-	+
6-7	+	-	-	+	+	+	+
7-4	+	-	-	+	+	+	+
10-11	-	-	+	-	+	+	+
N1	+	+	-	+	-	+	+
N2	+	+	-	+	-	+	+
HSL1 (3-1)	+	-	-	+	-	+	-
HSL2 (3-2)	-	+	+	+	+	+	+
HSL4 (3-4)	+	+	+	+	+	+	-
HSL5 (3-5)	+	+	+	+	+	+	+
HSL6 (3-6)	+	+	+	+	+	+	+
M1	+	+	+	+	-	+	+
M2	+	-	+	+	+	+	-
M3	+	+	+	+	+	+	+
M4	+	+	+	+	-	+	+
M5	+	+	+	+	+	+	+
M8	+	+	+	+	+	+	+
M9	+	-	+	+	-	+	-
M10	+	+	+	+	+	+	-
M11	+	+	+	+	+	+	-
M12	+	+	+	+	+	+	+
M13	+	+	+	+	+	+	+
M14	+	+	+	-	-	+	-
M1SD	-	+	+	+	+	+	+
M2SD	+	+	+	+	+	+	+
M3SD	+	+	+	+	+	+	+
M4SD	+	+	+	+	-	+	+
M5SD	+	+	+	+	+	+	+
M6SD	+	+	+	+	+	+	+
M7SD	+	+	+	+	+	+	+
M8SD	+	+	+	+	+	+	+
M9SD	+	+	+	+	+	+	+

Para cada uno de los genes analizados se realizó el árbol filogenético individual (Figura 27 A-G) y se elaboraron sus correspondientes matrices de similitud (Tablas S4-S11 del Anexo). En los árboles filogenéticos individuales se incluyeron las especies tipo más próximas, así como los aislados de origen ambiental, obtenidos en un estudio previo llevado a cabo en la unidad de diálisis del Hospital *Son Llätzer* por Gomila y colaboradores, y aislados clínicos, cedidos por el antiguo Hospital Universitario *Son Dureta* (Gomila *et al.*, 2005, 2007).

Al considerar las secuencias del gen del rRNA 16S, todas las cepas de origen ambiental se asignaron a micobacterias de crecimiento rápido (MCR) ya que cayeron en la rama filogenética MCR definida por Devulder y colaboradores (Devulder *et al.*, 2005), próximos a los aislados de origen ambiental obtenidos en un estudio previo llevado a cabo en la unidad de diálisis del Hospital *Son Llätzer* por Gomila y colaboradores (Gomila *et al.*, 2005, 2007). En cuanto a los aislados de origen clínico, algunos se asignaron filogenéticamente a micobacterias de crecimiento rápido, como *M. abscessus* subsp. *abscessus* / *M. abscessus* subsp. *bolletii* (M10 y M14), *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (M11), *M. peregrinum* (HSL5), *M. chlorophenicum* (HSL4), mientras que otros, la mayoría, se asignaron filogenéticamente a micobacterias de crecimiento lento, como el aislado M1 asignado filogenéticamente a la cepa de la especie tipo *M. intracellulare*, los aislados M8SD y M9 próximos a la cepa de la especie tipo *M. avium* subsp. *avium*, el aislado M3SD próximo a *M. parascrofulaceum*, el M4SD próximo a *M. celatum* y 13 aislados, estrechamente relacionados con *M. gordonae*. En el árbol filogenético se delimitaron 11 grupos diferenciados apoyados por elevados valores de *bootstrap*. Dentro de cada grupo las distancias filogenéticas mostraron valores muy bajos, no permitiendo una identificación a nivel de especie.

El árbol filogenético de la región ITS1 (Figura 27 B) se dividió claramente en tres grupos o *clusters*, manteniéndose a grandes rasgos el mismo agrupamiento observado en el árbol del gen del rRNA 16S. Los aislados de origen ambiental se relacionaron únicamente con micobacterias de crecimiento rápido, mientras que los de origen clínico se afiliaron mayoritariamente con micobacterias de crecimiento lento. Estas mismas agrupaciones, con en general, valores de *bootstrap* elevados, se encontraron al analizar el árbol filogenético correspondiente al gen *gyrB*, *hsp65*, *recA*, *rpoB* y *sodA* (Figura 27 C-G). Los distintos grupos mostraron para estos genes distancias filogenéticas entre ellas mayores (ver Tabla S5 a Tabla S9 del Anexo).

Dado que el análisis de un único gen resulta insuficiente para asignar definitivamente una cepa a una especie determinada, se realizó un análisis del concatenado de las secuencias obtenidas para cada gen. Este nuevo análisis se realizó concatenando tres genes, rDNA 16S, *hsp65* y *rpoB* (aproximadamente 1605 nucleótidos), y 4 genes, rDNA 16S, *hsp65*, *recA* y *rpoB* (aproximadamente 2226 nucleótidos). El espaciador intergénico, ITS1 y los genes *gyrB* y *sodA* se excluyeron de este análisis. El espaciador ITS1 se excluyó al mostrar mucha distancia filogenética entre las distintas parejas de valores, mientras que los genes *gyrB* y *sodA* se excluyeron porque no se obtuvieron secuencias de muchos de los aislados para estos genes. Las matrices de similitud correspondientes a cada análisis concatenado se muestran en la Tabla S10 y S11 del Anexo.

## A) rDNA 16S

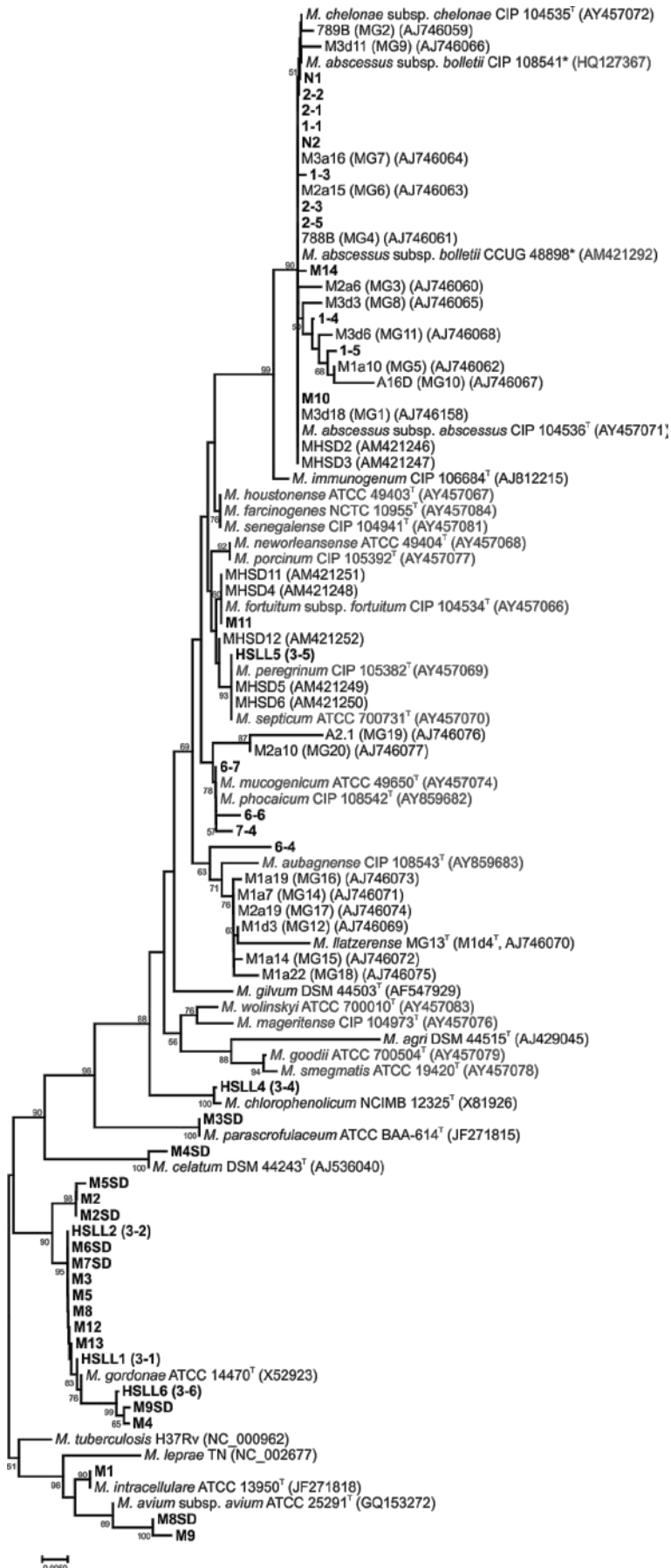


Figura 27. Árboles filogenéticos de las cepas de *Mycobacterium* sp. de origen ambiental y clínico estudiadas basados en las secuencias de los genes A) rDNA 16S, B) ITS1, C) *gyrB*, D) *hsp65*, E) *recA*, F) *rpoB* y G) *sodA*. En negrita se muestran los aislados analizados en esta tesis doctoral. La barra indica la divergencia de secuencia. En los nodos se indican los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500 (de 1000 réplicas). Los números de acceso a la secuencia se indican entre paréntesis. \*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* CIP 108541 y *M. abscessus* subsp. *bolletii* CCUG 48898, corresponden a las antiguas cepas tipo *M. bolletii* y *M. massiliense*, respectivamente.

B) ITS

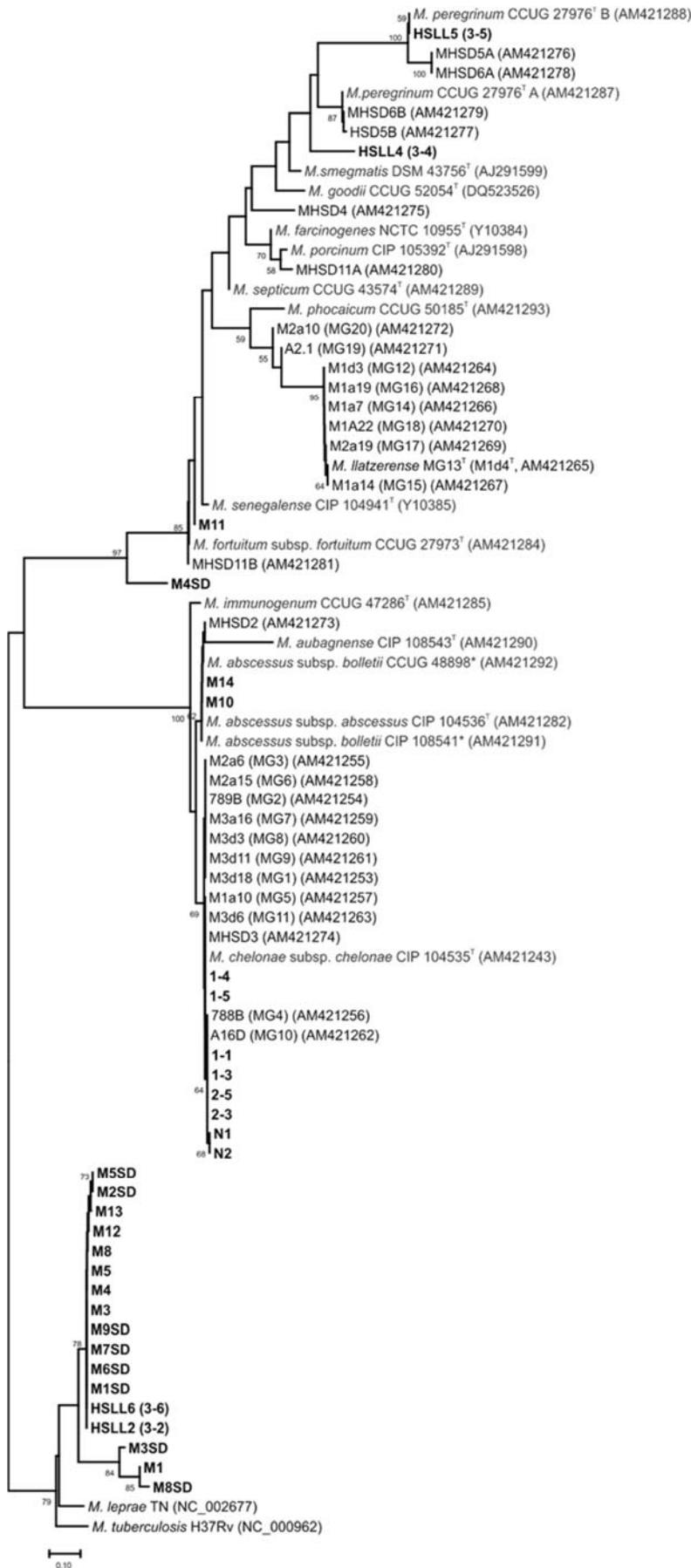


Figura 27. Continuación.

C) *gyrB*

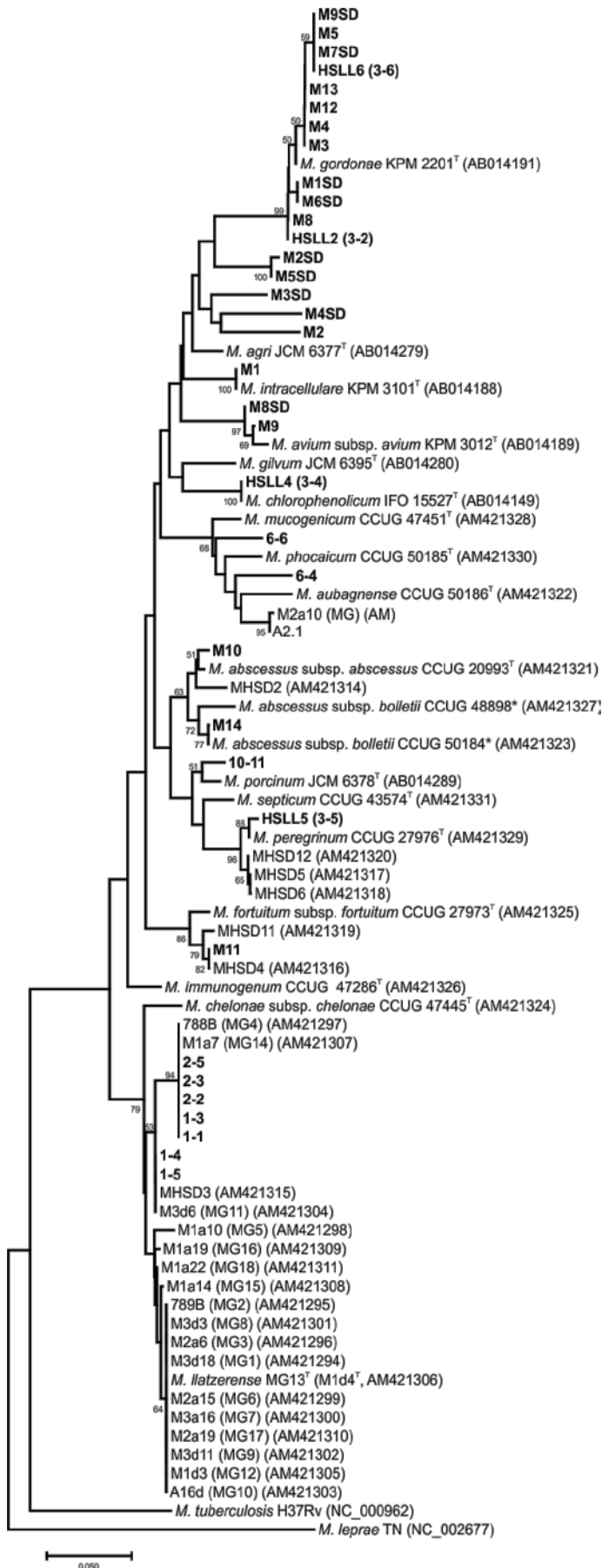


Figura 27. Continuación.



D) *hsp65*

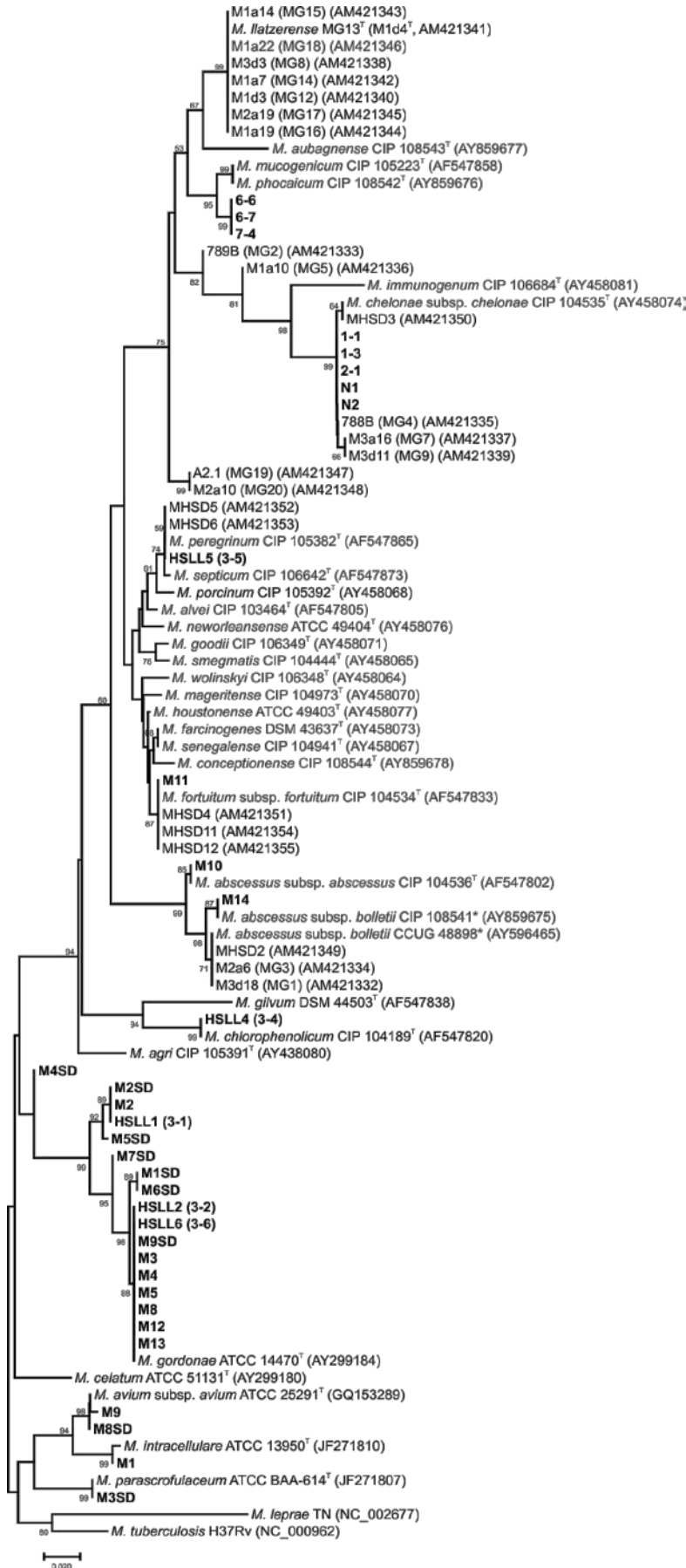


Figura 27. Continuación

E) *recA*

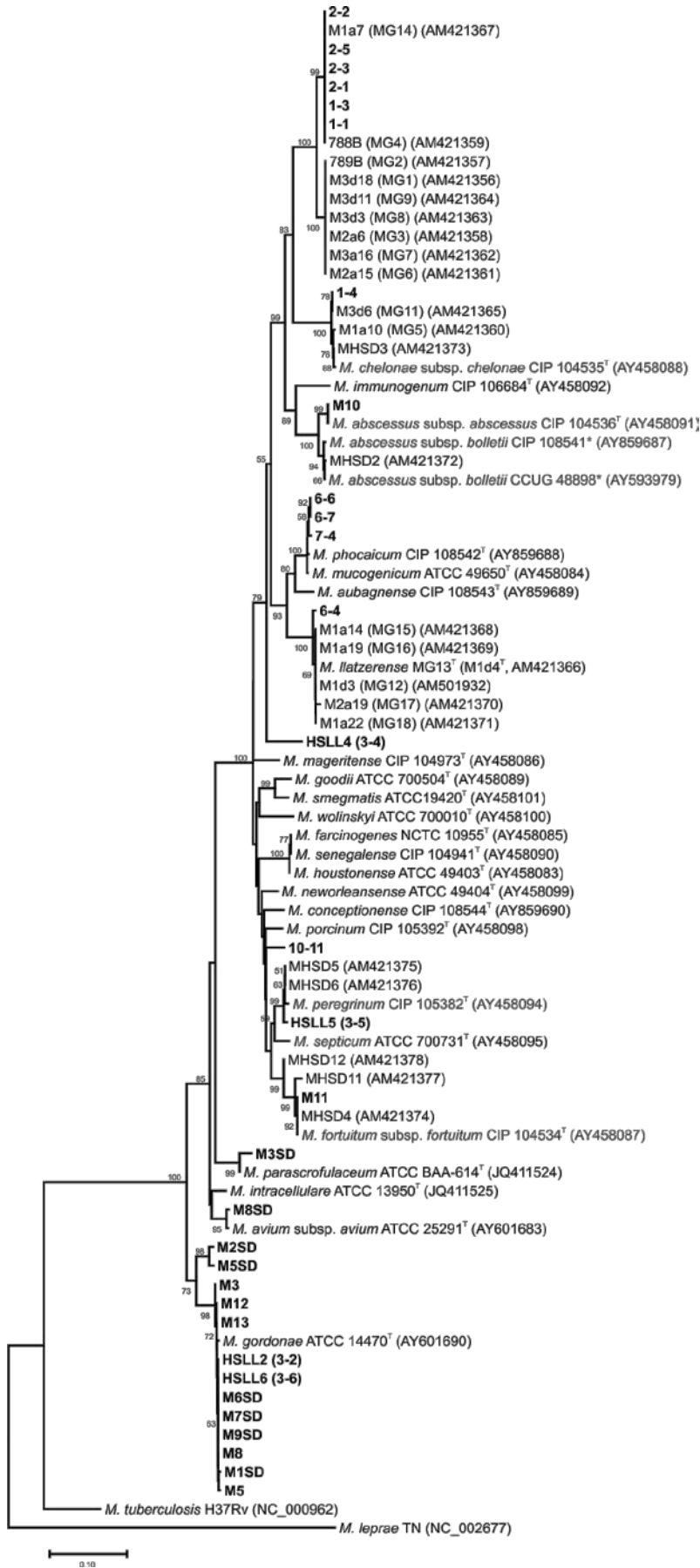


Figura 27. Continuación

F) *rpoB*

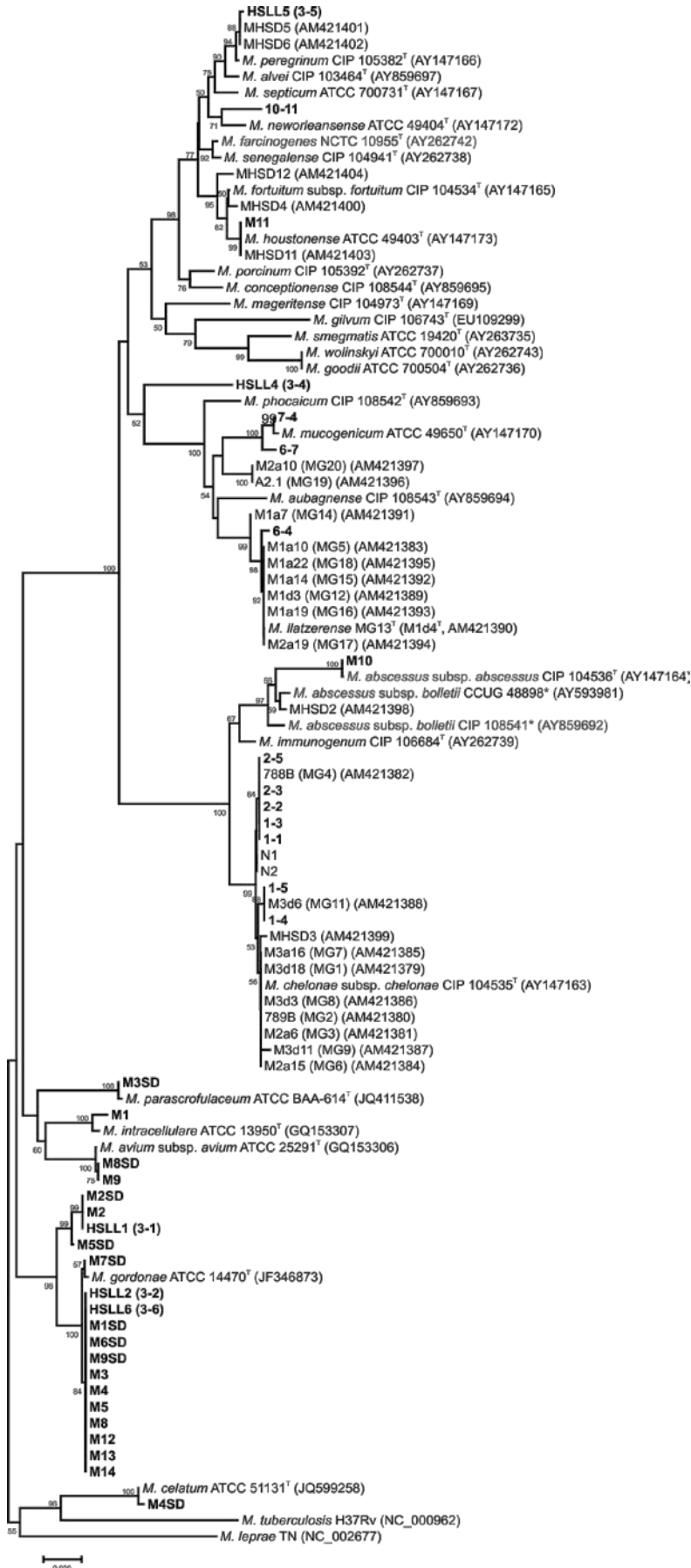


Figura 27. Continuación

G) *sodA*

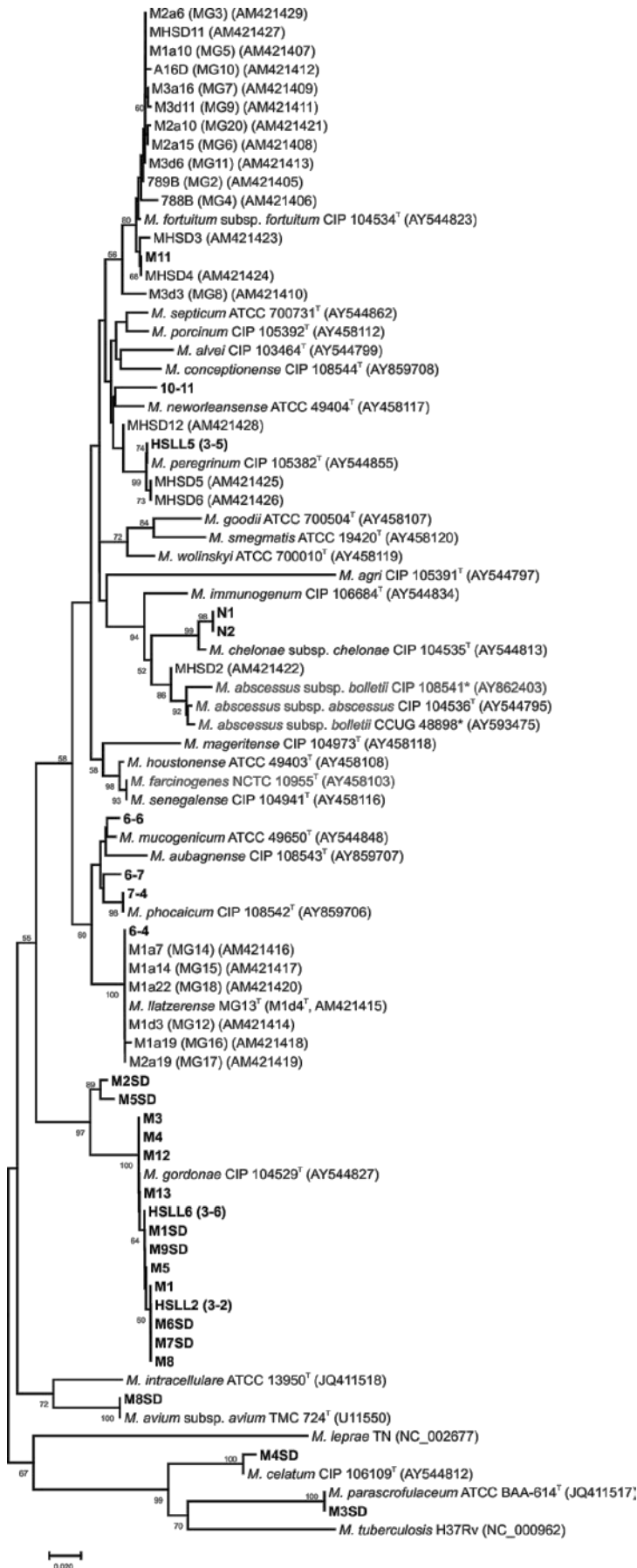


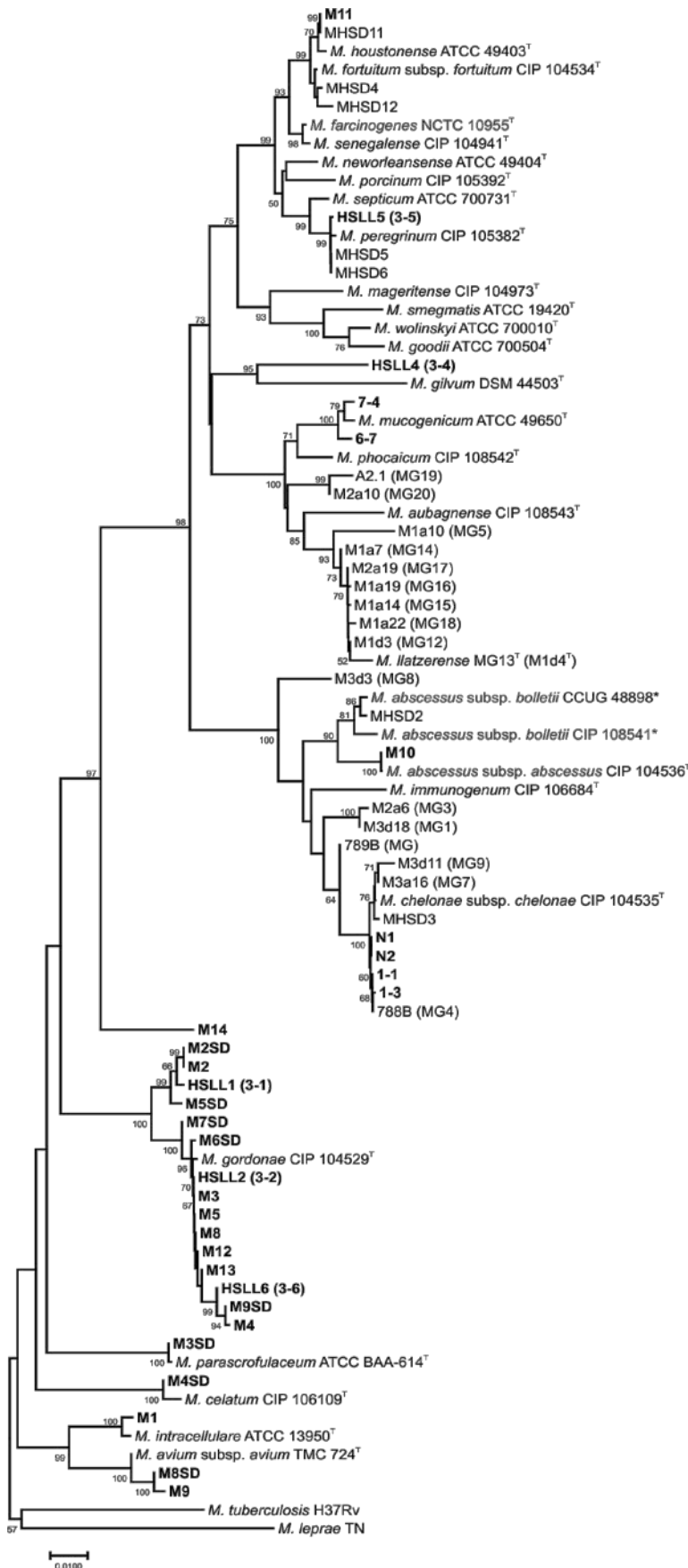
Figura 27. Continuación

Los dos árboles filogenéticos concatenados de 3 y 4 genes mostraron la misma topología, con valores de *bootstrap* elevados. Los árboles filogenéticos para el análisis concatenado de los tres y cuatro genes, se muestran en la Figura 28 A-B. En base a los dos árboles filogenéticos concatenados, los distintos aislamientos de origen ambiental se afiliaron a la especie *M. chelonae* subsp. *chelonae* (aislados 1-1, 1-3, N1 y N2), con valores en la matriz de similitud del 99,7 % para el concatenado de tres genes y del 97,5 % en el concatenado de cuatro genes y a la especie *M. mucogenicum* (aislados 6-7 y 7-4) con valores entre el 99,1 y 99,5 % para ambos árboles concatenados.

En cuanto a los aislamientos de origen clínico en los árboles filogenéticos concatenados, 4 aislados se afiliaron a cepas tipo de especies clasificadas como micobacterias de crecimiento rápido y 20 como micobacterias de crecimiento lento. Se asignaron a las especies de micobacterias de crecimiento rápido, *M. peregrinum* (HSLL5), *M. abscessus* subsp. *abscessus* (M10) y *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (M11). Este último aislado, el M11, en el análisis concatenado de tres genes se afilió con un 99,7 % de similitud con las cepas tipo *M. houstonense* y *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, pero al introducir el cuarto gen en el análisis concatenado mostró un 99,8 % de similitud con la cepa tipo *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, afiliándose a esta especie. El resto de aislamientos de origen clínico afiliados a micobacterias de crecimiento lento se asignaron las especies: *M. intracellulare* en el aislado M1, con el 99,5 % de similitud, *M. avium* subsp. *avium* para los aislados M8SD y M9, afiliándose a la cepa tipo de la especie con un 99,8 y 99,9 % de similitud, respectivamente; y 15 aislamientos (HSLL1, HSLL2, HSLL6, M2, M3, M4, M5, M8, M12, M13, M2SD, M5SD, M6SD, M7SD, M9SD) se afiliaron a la cepa tipo de la especie *M. gordonae*, con valores de similitud intraespecíficos que oscilaron entre 97,7 y 100 %. Los aislados M3SD y M4SD se afiliaron a las micobacterias atípicas de crecimiento lento, *M. parascrofulaceum* y *M. celatum*, respectivamente, con un porcentaje de similitud superior al 99 %.

Los aislados de origen clínico HSLL4 (3-4) y M14 no se afiliaron a ninguna especie conocida en el análisis concatenado. El aislado HSLL4 (3-4) no se afilió a ninguna especie ya que el máximo porcentaje de similitud con una cepa tipo en el concatenado de 3 y 4 genes alcanzó el valor de 93,1 % con *M. gilvum* (concatenado de 3 genes) y 92,1 % con *M. senegalense* (concatenado de 4 genes). Cabe decir que, en los árboles individuales correspondientes a los genes del rRNA 16S, *gyrB* y *hsp65*, este aislamiento mostró coherencia y se afilió en todos los casos con la cepa tipo de la especie *M. chlorophenicum* con porcentajes de similitud superiores al 99 %, aunque se carecía de las secuencias de los otros genes para esta cepa tipo para poder realizar el análisis filogenético exhaustivo y asegurar su afiliación a esta especie. En cuanto al aislado M14, éste se afilió a una rama filogenética completamente independiente en el árbol concatenado de tres genes. Al analizar los árboles individuales, se observó que éste se afiliaba a la especie *M. abscessus* subsp. *bolletii* basándose en los genes *hsp65* (100 %), *gyrB* (100 %) y rDNA 16S (99,8 %), mientras que para el gen *rpoB* mostró un 99,7 % de similitud con la cepa tipo de crecimiento lento, *M. gordonae*. Pendiente de realizar un análisis filogenético más exhaustivo y de confirmar un posible error en la secuencia del gen *rpoB*, este aislado se afilió a la especie *M. abscessus* subsp. *bolletii*.

A) rDNA 16S, *hsp65* y *rpoB*



**Figura 28.** Árboles filogenéticos concatenados de las secuencias de genes de cepas *Mycobacterium* sp. de origen ambiental y clínico, concatenando 3 genes, rDNA 16S, *hsp65* y *rpoB* (A) y 4 genes, rDNA 16S, *hsp65*, *recA* y *rpoB* (B). En negrita se muestran los aislados analizados en esta tesis doctoral. La barra indica la divergencia de secuencia. En los nodos se indican los valores de *bootstrap* iguales o superiores a 500 (de 1000 réplicas). \*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* CIP 108541 y *M. abscessus* subsp. *bolletii* CCUG 48898, corresponden a las antiguas cepas tipo *M. bolletii* y *M. massiliense*, respectivamente.

B) rDNA 16S, *hsp65*, *recA* y *rpoB*

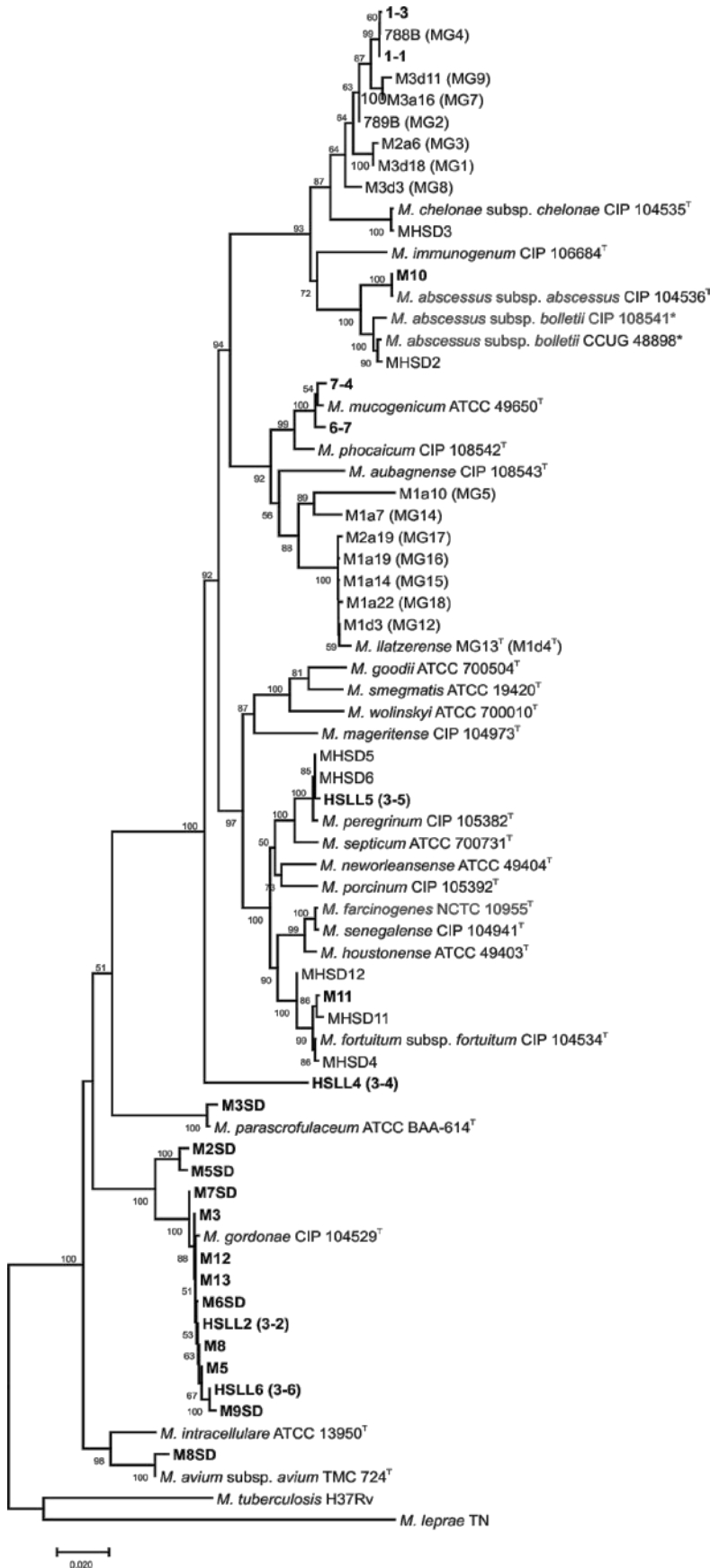


Figura 28. Continuación

Los aislados ambientales, 1-4, 1-5, 2-1, 2-2, 2-3, 2-5, 6-4, 6-6, 10-11 y el clínico M1SD, no se incluyeron en el análisis de concatenado de genes por carecer de secuencia para alguno de los genes considerados en el análisis concatenado de 3 y 4 genes. Sin embargo, algunos de ellos se pudieron asignar a especies en base a la estabilidad que presentaban los árboles filogenéticos individuales de los distintos genes analizados. El aislado clínico M1SD, se afilió a la especie *M. gordonae* por los genes *hsp65*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, y *sodA* con similitudes que oscilan entre el 99,1 y 99,7 %. Los aislados ambientales 1-4 y 1-5, mostraron un patrón idéntico a los aislados 1-1 y 1-3 que se asignaron en el análisis concatenado a *M. chelonae* subsp. *chelonae*, asignándose de igual modo a esta especie. En cuanto al aislado 6-4, este se asignó a *M. llatzerense* en base a los genes *rpoB*, *recA* y *sodA*, con porcentajes del 99,5, 99,4 y 100 %, respectivamente, aunque para los genes *gyrB* y rDNA 16S se afilió a la cepa tipo *M. aubagnense* con valores de similitud del 93,5 % y 97,9 %, respectivamente. Estos resultados, sugerirían la afiliación filogenética de este aislado a la especie *M. llatzerense*, aunque para la total seguridad se necesitaría un estudio más detallado.

En cuanto a los aislados de origen ambiental, 10-11, 6-6, 2-1, 2-2, 2-3 y 2-5, estos no pudieron asignarse filogenéticamente a una especie claramente, siendo necesario un análisis polifásico mucho más exhaustivo para su correcta afiliación y asignación a una especie conocida o bien, a una especie nueva. El aislado 10-11 mostró valores de similitud alrededor del 97 % con las cepas *M. porcinum* y *M. neworleansense* para los genes *recA*, *rpoB*, y *sodA*, y del 97,6 % para el gen *gyrB* únicamente con *M. porcinum*, aunque en este caso en las bases de datos no se dispone de la secuencia de *gyrB* para *M. neworleansense*. El aislado 6-6 por el contrario, se afilió a las cepas tipo de *M. mucogenicum* y *M. phocaicum* con porcentajes idénticos de similitud del para el gen *recA* (99,4 %), el gen *hsp65* (98,3 %), y el gen rDNA 16S (99,5 %), mostrando ligeras oscilaciones para los genes *gyrB* y *sodA*. Para el gen *gyrB* mostró un 95,3 % de similitud con la cepa tipo de *M. mucogenicum* y del 93,9 % con la cepa tipo *M. phocaicum*, y para el gen *sodA* de 98,7 % con *M. mucogenicum* frente al 97,7 % de *M. phocaicum*. En cuanto a los aislados 2-1, 2-2, 2-3 y 2-5, se asignaron filogenéticamente a las especies *M. chelonae* subsp. *chelonae* basándose en los genes *rpoB*, *recA* y *gyrB* con valores de similitud del 99,5 %, 90,9 % y 96,2 %, respectivamente, aunque para este último gen mostraron una similitud ligeramente superior, del 96,7 %, con la cepa tipo de la especie *M. llatzerense*, sugiriendo que posiblemente se trataría de nuevas especies.

En resumen, se incrementó el número de cepas de la colección de micobacterias del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares y se asignó a nivel de especie el 85,37 % (35/41) de los aislados totales. Aunque cabe mencionar que, la asignación filogenética de los aislados de origen ambiental a nivel de especie presentó una mayor dificultad con un 40 % (6/15), que en los aislados clínicos, donde se identificaron todos los aislados, sugiriendo que las especies de crecimiento rápido son más difíciles de clasificar que las de crecimiento lento.

Además a nivel global, los resultados muestran cómo los aislados de origen ambiental se relacionan con las cepas tipo correspondientes a micobacterias de crecimiento rápido,



mientras que las de origen clínico, mayoritariamente, se relacionan con micobacterias de crecimiento lento.

Las micobacterias de crecimiento rápido principalmente detectadas tanto para aislados de origen ambiental como aislados clínicos son *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. chelonae* subsp. *chelonae*, *M. chlorophenicum*, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. llatzerense*, *M. mucogenicum*/*M. phocaicum*, *M. peregrinum*, y *M. porcinum*/*M. neworleansense*. Todas estas cepas son tanto de origen clínico, actuando como patógenos, como ambiental, a excepción de *M. neworleansense* que sólo se ha descrito en aislados clínicos.

Las especies *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. chelonae*, *M. chlorophenicum*, *M. llatzerense*, *M. mucogenicum*, *M. neworleansense* y *M. porcinum*, se describen en el Capítulo 2 (sección C2-2).

*M. fortuitum* subsp. *fortuitum* se aisló originalmente de un absceso y se ha aislado con posterioridad de endocarditis, fibrosis quística (Cándido *et al.*, 2014), meningitis (Fujikawa *et al.*, 2006), osteomielitis, enfermedad pulmonar, bacteriemia en pacientes inmunocomprometidos (Unni *et al.*, 2005) y, rara vez, provoca enfermedad generalizada en seres humanos. Se ha aislado de glándulas linfáticas de ganado y de infecciones sistémicas, nodulares de ranas; lesiones renales localizadas en terneros, cobayas, ratones, simios y conejos; y lesiones del oído medio en ratones (Penso *et al.*, 1952; Wells *et al.*, 1955). También se encuentra en el suelo (Goodfellow *et al.*, 2012), presas de agua (Alqumber, 2014), aguas potables (Thomson *et al.*, 2013b) y suministros de agua potable, donde son mayoritarios y en aguas hospitalarias (Lecuona *et al.*, 2015).

La cepa tipo *M. peregrinum* se aisló de aspirados bronquiales (Goodfellow *et al.*, 2012) y se ha detectado en infección pulmonar, esternal, cutánea, e infección de herida quirúrgica, por catéter (García y García, 2012), así como en pacientes inmunocomprometidos (Mwikuma *et al.*, 2015). Ha sido aislada de torres de refrigeración (Torvinen *et al.*, 2014), aguas hospitalarias (Genc *et al.*, 2013) y lodos lácteos de efluentes lecheras (Matthews *et al.*, 1976).

*M. phocaicum* se aisló originalmente a partir de un aspirado bronquial y posteriormente fue aislada de pacientes con neumonía crónica. En los últimos años, se ha aislado de muestras ambientales en piscinas terapéuticas (Salah *et al.*, 2009).

En cuanto a las especies de crecimiento lento, relacionadas con los aislados clínicos de este estudio, destacan; *M. avium* subsp. *avium*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare* y *M. parascrofulaceum*, todas ellas de origen mayoritariamente clínico.

*M. avium* subsp. *avium* fue aislado por primera vez a partir de lesiones en aves, aunque recientemente se ha aislado también de sistemas de abastecimiento de agua (Klanicova *et al.*, 2013) y en aguas potables (Thomson *et al.*, 2013b).

Respecto a *M. celatum*, la mayor parte de las 24 cepas originales fueron aisladas de muestras clínicas, bien de esputo, incluyendo la cepa tipo, o lavados bronquiales. Clínicamente, las infecciones más importantes se dan con frecuencia en individuos inmunocomprometidos, como pacientes con SIDA (Piersimoni *et al.*, 1997) donde se han aislado a partir de sangre, columna vertebral y muestras de heces (Butler *et al.*, 1993). También se ha relacionado con enfermedad pulmonar (Jun *et al.*, 2010), espondilitis anquilosante (Tan *et al.*, 2009) e infección diseminada (Emler *et al.*, 1996).

*M. gordonae* se aisló por primera vez de una muestra de lavado gástrico y se ha aislado en pacientes con infección pulmonar (Morimoto *et al.*, 2015), lesiones cutáneas, peritonitis, endocarditis, bacteriemia, ileítis (Valdés y Cid, 2004), infección diseminada (Weinberger *et al.*, 1992) e infección genitourinaria (Jarikre, 1992). También se ha aislado de aerosoles generados en la ducha en una residencia con pacientes que sufrían una infección pulmonar (Thomson *et al.*, 2013b), de sistemas de abastecimiento de agua (Klanicova *et al.*, 2013), de aguas potables (Thomson *et al.*, 2013b), de aguas minerales (Caroli *et al.*, 1985), de aguas hospitalarias (Genc *et al.*, 2013; Zlojtro *et al.*, 2015) y de aguas de hemodiálisis (Sartori *et al.*, 2013).

*M. intracellulare*, aislada a partir de secreciones humanas, representa a menudo el agente etiológico de una enfermedad pulmonar (Wolinsky, 1979). También presente en roedores e insectívoros (Durnez *et al.*, 2008) y en muestras ambientales de suelo y agua (Wendt *et al.*, 1980; Wolinsky y Rynearson, 1968), torres de refrigeración (Torvinen *et al.*, 2014), presas de agua (Alqumber, 2014) y aguas potables (Thomson *et al.*, 2013b).

*M. parascrofulaceum*, aislada por primera vez de biopsia de cérvix, se ha aislado también de pacientes con neumonía (Liu *et al.*, 2014), infección cutánea (Zong *et al.*, 2012) y con SIDA. También se ha aislado de roedores e insectívoros (Durnez *et al.*, 2008).

## DISCUSIÓN GENERAL

---



## 1 RELEVANCIA DE LAS MICOBACTERIAS AMBIENTALES EN HÁBITATS ACUÁTICOS

Las micobacterias ambientales, conocidas también como micobacterias atípicas o micobacterias no tuberculosas, son microorganismos saprófitos, frecuentes en suelo, alimentos, polvo y especialmente, agua potable (Covert *et al.*, 1999). Pueden ser patógenos oportunistas de humanos y animales, aunque en general son habitantes normales del medio ambiente. Se encuentran en una amplia variedad de hábitats a los cuales están expuestos los seres humanos, incluyendo los sistemas de distribución de agua potable y las aguas para uso doméstico (Collins *et al.*, 1984; Dailloux *et al.*, 2003). En ese sentido, son distintos de los patógenos obligados más próximos, los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Falkinham, 2010). Son capaces de colonizar y crecer en las conducciones de agua en hospitales, edificios de apartamentos y casas. Una vez que se introducen en el sistema (por ejemplo, a través del agua potable), se adhieren a las superficies y crecen para formar una biopelícula (Tesis doctoral Margarita Gomila, 2007). Esa biopelícula formada se convierte en una posible fuente de infección. La infección se produce al transmitirse al medio ambiente, a través de las aguas, aerosoles o polvos, que pueden ser inhaladas o ingeridas, por ejemplo, con los aerosoles producidos en la ducha o bien a partir del polvo de las macetas (Feazel *et al.*, 2009; Falkinham, 2015). Es por ello, que su estudio es de interés en salud pública (Rusin *et al.*, 1997), pero además adquiere una especial relevancia en los ambientes hospitalarios.

Debido a la presencia de las micobacterias ambientales en el entorno humano, las propias actividades humanas han tenido un impacto directo en su ecología y por lo tanto, en su epidemiología. Son oligotróficas, capaces de crecer en concentraciones bajas de materia orgánica y en un amplio rango de temperaturas, con variaciones de pH e incluso a bajas concentraciones de oxígeno, siendo resistentes a los desinfectantes, metales pesados y antibióticos. Por estos motivos, son habitantes normales de aguas (Le Dantec *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 1988).

El número de patologías asociadas a micobacterias ambientales se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Ha ido aumentando el interés por el potencial patogénico de las micobacterias de crecimiento rápido, y también se ha puesto de manifiesto el papel ecológico que pueden jugar estos patógenos oportunistas presentes en las conducciones de agua (De Groote y Huitt, 2006; Falkinham *et al.*, 2008; Falkinham, 2009; Feazel *et al.*, 2009; Havelaar *et al.*, 1985; Neuman *et al.*, 1997; Pagnier *et al.*, 2009). Uno de estos trabajos, punto de partida de esta tesis, es un estudio pionero, llevado a cabo por el grupo de investigación de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares y de la unidad de diálisis del Hospital *Son Llàtzer* en Palma de Mallorca. En este estudio se analizó la comunidad microbiana presente en aguas puras de hemodiálisis, por métodos dependientes e independientes de cultivo, y se detectó un inesperado porcentaje de aislados de micobacterias ambientales (Gomila *et al.*, 2005, 2006), una de las cuales dio origen a la descripción de una nueva especie, denominada *M. llätzerense* (Gomila *et al.*, 2007).

Con el fin de evaluar la presencia de micobacterias ambientales en aguas puras y potables de nuestro entorno éstas se analizaron por dos métodos complementarios, los dependientes y los independientes de cultivo.

## 2 MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO

El género *Mycobacterium* está constituido por 164 especies y 13 subespecies según la LPNSN (<http://www.bacterio.net/>) y constituye un grupo monofilético muy bien definido basado en las secuencias del gen del rRNA 16S dentro del filo *Actinobacteria*. Los caracteres fenotípicos básicos que definen al género se han mantenido desde las primeras descripciones. El estudio de la presencia de micobacterias ambientales en muestras de aguas se puede abordar mediante métodos independientes de cultivo, basándose en la creación de genotecas del gen del rRNA 16S y por RT-PCR para analizar la población presente y metabólicamente activa. En nuestro caso, los análisis de las dos genotecas de las aguas de hemodiálisis estudiadas no detectaron la presencia de clones afiliados al género *Mycobacterium*.

La no detección de representantes del género *Mycobacterium* sp. en la genoteca del gen del rRNA 16S, de la muestra de agua M3 recogida en el punto de entrada al monitor de diálisis en Noviembre de 2004, concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos para el mismo punto de recogida de muestra y las mismas condiciones de desinfección del agua de hemodiálisis mediante hipercloración, realizados en el año precedente (Marzo, 2003) (Gomila *et al.*, 2006). En ese análisis de la genoteca del gen rRNA 16S no se encontraron clones afiliados al género *Mycobacterium* sp., a pesar de que se obtuvieron 60 aislamientos de este género, mediante métodos basados en cultivo en agar R2A (Gomila *et al.*, 2005). Esta discrepancia puede deberse, principalmente, a que la muestra abarca una extensa y compleja diversidad de géneros, que se manifiesta mejor en los estudios independientes de cultivo que en los dependientes de cultivo y que resultan insuficientes para abarcar el estudio de toda la complejidad de géneros que la conforman (cultivables y no cultivables). Es decir que, los métodos dependientes de cultivo introducen un sesgo al detectar únicamente aquellas células cultivables y destacan géneros cuya representatividad, como en el caso del género *Mycobacterium* sp., queda diluida en el análisis de la diversidad total. Adicionalmente, cabe destacar, que el esfuerzo de muestreo fue insuficiente en base a las curvas de rarefacción y los índices de diversidad de géneros y especies representados. Por estudios anteriores cabía esperar la presencia de especies del género *Mycobacterium*, por lo que estarían entre esos 5,5 géneros no detectados pero estimados en los análisis de cobertura.

El filo *Proteobacteria* fue el más abundante en la genoteca de DNA, lo que está en consonancia con estudios anteriores de muestras de aguas de hemodiálisis en el Hospital *Son Llàtzer* (Gomila *et al.*, 2006) y el Hospital Universitario *Son Espases* (Tesis doctoral Claudia Prince, 2014), aunque difieren en las clases más abundantes dentro de este filo. La clase más abundante resultó ser la clase *Gammaproteobacteria* y ningún clon se pudo afiliar a un género conocido con porcentajes iguales o superiores al 95 %, por lo que, al parecer, se trata de

géneros no descritos hasta el momento, si aceptamos el 95 % de similitud en la secuencia del gen del rRNA 16S como límite de género (Rosselló-Mora y Amann, 2015).

Respecto a la ausencia de representantes de especies del género *Mycobacterium* en el estudio de la población metabólicamente activa, a través de la elaboración de la genoteca RT-PCR, cabe mencionar que aportan una nueva información en cuanto a que descartan que las micobacterias tuvieran un papel relevante en la población activa, a pesar del elevado porcentaje de micobacterias cultivadas, que se estimó en estudios anteriores, donde representaban aproximadamente el 30 % de los aislados totales obtenidos (Gomila *et al.*, 2005). Los géneros metabólicamente más activos en toda la comunidad microbiana no incluían a *Mycobacterium* sp. entre el 95 % de los géneros analizados según la estimación de la cobertura de la genoteca, sino que se asignaron a un conjunto de géneros no cultivados hasta el momento dentro del filo *Cyanobacteria*. Dado que los clones de este filo también se englobaron entre los más abundantes de la genoteca del gen rRNA 16S por detrás de los de la clase *Gammaproteobacteria* y junto al filo *Bacteroidetes*, se sugiere que podrían jugar un papel relevante en los procesos biogeoquímicos en el agua de hemodiálisis. La abundancia de los filos *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria* en la genoteca del gen del rRNA 16S no se trasladó a la población activa en el filo *Bacteroidetes*, pero sí en *Cyanobacteria*. El filo *Bacteroidetes* ha sido detectado en otros estudios de muestras de aguas potables (Williams *et al.*, 2004; Eichler *et al.*, 2006) pero su abundancia en la genoteca de DNA no apareció reflejada en los estudios previos realizados por Gomila y colaboradores para la misma muestra de agua, un año antes. Respecto a la abundancia de *Cyanobacteria*, ya se había constatado en el análisis de las genotecas del rRNA realizados el año anterior a partir de muestras similares (Gomila *et al.*, 2006), donde tampoco se esperaba este resultado en un sistema de distribución de agua (filtros, tuberías de PVC, depósitos) situado en oscuridad. Mientras que la gran mayoría de estos microorganismos dependen de la luz para su supervivencia, es posible que algunas poblaciones de cianobacterias detectadas en este estudio sean del grupo reducido que pueden sobrevivir bajo condiciones anaeróbicas, reductoras (Revetta *et al.*, 2010; Di Rienzi *et al.*, 2013). El papel ecológico de los miembros del filo *Cyanobacteria* requiere de estudios futuros específicos, por su importante implicación clínica y epidemiológica en los pacientes sometidos al tratamiento de hemodiálisis.

Estos estudios dilucidan la abundancia relativa y la identidad de las bacterias potencialmente activas que habitan en muestras de agua de hemodiálisis sometidas a tratamientos de hipercloración puntual, descartando que el género *Mycobacterium* sp. sea uno de los más abundantes. La abundancia del filo *Cyanobacteria* en la población metabólicamente activa, podría servir de indicador de la presencia de poblaciones resistentes a la desinfección, concretamente en las primeras fases de formación de la biopelícula y de colonización. Estudios recientes basados en el análisis filogenómico de los metagenomas de muestras de agua de hemodiálisis del Hospital Universitario *Son Espases* y del Hospital *Son Llätzer* (Tesis Claudia Prince, 2014) apuntan a esta hipótesis, tras comprobar que los genes de cianobacterias disminuían a medida que iba madurando la biopelícula y aumentaban los genes relacionados con otros filos y clases. Hay que tener en cuenta que la eficacia de la desinfección se reduce en las biopelículas (Gião *et al.*, 2008, 2009).

Por otro lado, cabe mencionar que existe un cierto riesgo no tenido en cuenta hasta el momento asociado a las cianotoxinas, ya que se han dado episodios muy graves asociados a la exposición humana a cianotoxinas en pacientes hemodializados después del tratamiento con agua contaminada, lo que da una idea de la importancia de la calidad del agua utilizada para la hemodiálisis y de que se someta a regulaciones en la mayoría de los países. La detección de cianotoxinas no está incluida actualmente en el control de calidad rutinario de las aguas (Manganelli *et al.*, 2012).

Considerando el estudio conjunto de las dos genotecas, rDNA 16S y RT-PCR, hay que resaltar el elevado porcentaje de clones no afiliados a géneros descritos hasta el momento (73,6 %), evidente en ambas genotecas con un 69,0 % en la de RT-PCR frente al 75,5 % de la genoteca de rDNA 16S. Es necesario el estudio detallado del conjunto de la diversidad microbiana presente y activa en este tipo de aguas, de los géneros que no han sido cultivados y de los que no se dispone aún de información. Además, se trata de un resultado recurrente en este tipo de estudios (Gomila *et al.*, 2006; Revetta *et al.*, 2010). Muchos de los géneros no descritos hasta el momento en muestras ambientales podrían cultivarse en los próximos años debido a los recientes estudios que apuntan a prácticas de rutina erróneas realizadas en el laboratorio en relación con la generación de sustancias que inhiben el crecimiento en placa de microorganismos si se mezclan componentes básicos como el fostato y agar en el autoclave (Tanaka *et al.*, 2014), pero también al diseño de otros medios de cultivo que permitan el crecimiento de estos géneros aún no cultivados.

En el presente estudio, se constató, en base al análisis de los índices de diversidad que, como era de esperar, del conjunto total de bacterias presentes en la muestra de agua de hemodiálisis, sólo una fracción se mantiene activa metabólicamente. Asumiendo las limitaciones del método utilizado, podría ocurrir que los productos de transcripción del rRNA pudieran persistir en bacterias no cultivables por un período de tiempo suficiente para ser detectados (Revetta *et al.*, 2010). A pesar de que existen diversos estudios de la población activa metabólicamente, en sistemas de distribución de aguas puras de hemodiálisis, no se ha estudiado el tiempo que pueden perdurar los productos de transcripción del rRNA.

La misma muestra de agua de hemodiálisis sometida a tratamiento de desinfección por hipercloración en la que no se habían detectado clones afiliados al género *Mycobacterium*, tanto en la genoteca de DNA como en la de RNA, sí reveló finalmente, y a través de métodos independientes de cultivo, la presencia de micobacterias ambientales mediante la técnica adicional de PCR-anidada a partir del amplificado con cebadores universales y reamplificándolo con los cebadores específicos de micobacterias descritos por Mendum *et al.* (2000) a una temperatura de anillamiento optimizada a 60 °C. Los 12 grupos filogenéticos encontrados y relacionados con especies del género *Mycobacterium* reflejan una diversidad más elevada que la encontrada en el análisis por secuenciación del gen del rRNA 16S de los 20 aislamientos, representantes de los 60 totales, obtenidos en una muestra del mismo punto en los 2 años anteriores (Gomila *et al.*, 2005), y todos ellos pertenecientes al grupo de micobacterias de crecimiento rápido. En nuestro estudio los grupos mayoritarios se afiliaron



filogenéticamente con las cepas tipo de la especie *M. abscessus* subsp. *abscessus*/*M. abscessus* subsp. *bolletii*, con 24 clones, seguido de 10 clones afiliados a *M. llatzerense*/*M. neoaurum* y 8 clones afiliados a las cepas tipo de las especies *M. chelonae*/*M. immunogenum*/*M. franklinii*. El hecho de que se analizase el gen del rRNA 16S no permitió discriminar a nivel de especie, al igual que en la mayoría de estudios de identificación de micobacterias basados en este único gen, pero en este caso, se acentuaba la falta de discriminación por el tamaño de la secuencia obtenida de 473 pb.

Realizar genotecas a partir de otros genes esenciales que permiten discriminar mejor las especies de micobacterias hubiera permitido quizás identificar a nivel de especie esta diversidad, como se hizo en el análisis multigénico de los aislamientos obtenidos. Se probaron cebadores de los genes *hsp65* y de *gyrB*, pero no se obtuvieron amplificados o éstos no fueron de buena calidad para llevar a cabo la genoteca y el posterior análisis. Una PCR previa con cebadores generales de estos genes y otra PCR anidada posterior sobre el amplicón con los cebadores de micobacterias hubieran podido ser apropiados al estar las micobacterias en baja proporción, tal y como ocurre en otros géneros como el género *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2014). Feazel *et al.* (2009) sugieren la utilización de cebadores que amplifican específicamente el ITS1 de micobacterias, pero estas secuencias no las consideramos apropiadas, porque no diferencian bien las especies dentro del género y en algunas ocasiones no son de copia única en el genoma.

### 3 MÉTODOS DEPENDIENTES DE CULTIVO

En la utilización de métodos dependientes de cultivo para la detección de micobacterias ambientales en muestras de aguas potables y puras, se utilizaron diferentes estrategias. La selección de colonias por tinción Ziehl-Neelsen resultó ineficaz por el bajo porcentaje de micobacterias detectadas en este tipo de muestras y la presencia en algunos casos de falsos positivos. En base a estos resultados, se dirigió la estrategia hacia la utilización de procedimientos de descontaminación previos al cultivo en placa, para eliminar los microorganismos que no fueran alcohol ácido resistentes. Sin embargo, los resultados mostraron que las micobacterias ambientales son sensibles a este tipo de procedimiento. Este efecto de inhibición del crecimiento de algunas micobacterias (*M. chelonae* y *M. avium*) provocado por la descontaminación química de la muestra ha sido también demostrado por Radomski *et al.* (2010). Finalmente, se pretendió la detección de micobacterias analizando la totalidad de morfologías coloniales presentes en los crecimientos en placas de agar R2A, concluyendo que tampoco representa un método eficaz si el estudio está enfocado únicamente al aislamiento de micobacterias ambientales. La eliminación previa de la microbiota acompañante presente en la muestra, tampoco es útil para el aislamiento de micobacterias. Se hace necesario optimizar un procedimiento combinado entre la descontaminación y el filtrado de mayor cantidad de muestra, dado el mínimo porcentaje de micobacterias presentes.

En cuanto al análisis multigénico de los aislados, ésta sí es una buena herramienta para la clasificación e identificación de las micobacterias (Gomila *et al.*, 2007). El presente estudio revela que los aislados de origen ambiental se clasifican exclusivamente en el grupo de micobacterias de crecimiento rápido, mientras que las de origen clínico pueden ser de crecimiento rápido o lento. Los métodos independientes de cultivo corroboran estos resultados, a pesar de que en otros estudios de este tipo de muestras se hayan aislado también micobacterias de crecimiento lento (Carson *et al.*, 1988; Sartori *et al.*, 2013).

Respecto a los aislados de origen clínico, destaca el grupo mayoritario de las de crecimiento lento *M. gordonae* con un 57,7 % (15/26) seguido de un 7,7 % (2/26) de *M. avium* subsp. *avium* y el resto de especies con un porcentaje del 3,8 % (1/26): *M. intracellulare*, *M. parascrofulaceum*, y *M. celatum* y las micobacterias de crecimiento rápido, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. chlorophenicum*, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* y *M. peregrinum*.

Dentro de los aislados de origen ambiental un 26,7 % (4/15) de los aislados se identificaron como *M. chelonae* subsp. *chelonae* que fue el grupo mayoritario, seguido de un 13,33% con *M. mucogenicum*/*M. phocaicum*, y un 6,7 % (1/15) para *M. porcinum*/*M. neworleansense* y *M. llutzerense*. *M. llutzerense* fue descrita como una especie nueva a partir de aislados de muestras de agua de hemodiálisis (Gomila *et al.*, 2008), como un microorganismo autotrófico facultativo, oxidador de hidrógeno y con posterioridad, recientemente se ha descrito como patógeno de humanos, en una infección de pulmón de un paciente trasplantado de riñón (Teixeira *et al.*, 2013), en un absceso sub-diafragmático (Cárdenas *et al.*, 2014) y en un absceso de cerebro (Greninger *et al.*, 2015).

En aguas potables hospitalarias se detectaron micobacterias relacionadas con *M. chelonae* subsp. *chelonae* en el Servicio de Microbiología del Hospital *Son Llàtzer* pero no en la muestra de agua de la Unidad de Cuidados Intensivos del mismo hospital. En aguas potables del laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Islas Baleares sólo se detectaron micobacterias en la mitad de las muestras analizadas (4/8) y relacionadas con las especies *M. chelonae* subsp. *chelonae*, *M. llutzerense* y *M. mucogenicum*/*M. phocaicum*. Aparentemente, *M. chelonae* tiene una prevalencia superior en muestras de agua de superficie que en muestras de agua subterráneas y *M. llutzerense* más elevadas en aguas subterráneas. Parece haber una exclusión competitiva entre *M. llutzerense* y *M. chelonae*, o que las diferencias en el ambiente favorecen a uno respecto al otro (Dubrou *et al.*, 2013).

El tratamiento de desinfección con ácido peracético de las aguas de hemodiálisis demostró ser excelente, puesto que eliminó las micobacterias ambientales detectadas en estudios anteriores. De hecho en un 70 % de las muestras de agua analizadas por métodos dependientes de cultivo, no se detectaron micobacterias ambientales. Esta baja detección sirvió para descartar la utilización de la estrategia de descontaminación para aislar micobacterias. En la descontaminación se eliminaban micobacterias presentes, que sí se detectaban en la muestra control. Esto puede deberse a que, a pesar de ser resistentes a los efectos de la cloración en aguas potables, presentan dificultades para recuperarse en cultivo

en las placas de agar y no resisten el proceso de descontaminación después de la homogenización del filtrado. También, por otro lado, podrían quedarse adheridas al filtro, ya que los recuentos revelaron que se perdía parte de los microorganismos al comparar contajes control, antes y después del filtrado.

Con respecto a la comunidad total analizada, cabe decir que en las aguas de hemodiálisis tras implantar el tratamiento de desinfección con ácido peracético, se evidencia un cambio en esta comunidad, no solo porque las micobacterias ambientales no se detectan, ya sea por la reducción total o considerable de éstas, sino también por la composición, distinta a los estudios previos realizados (Gomila *et al.*, 2005). El análisis de los aislados de micobacterias muestra principalmente, la presencia de miembros de las clases *Alphaproteobacteria* (*Bradyrhizobium* sp., *Sphingomonas* sp., entre otros) y *Betaproteobacteria* (*Caulobacter* sp., *Ralstonia* sp., entre otras). De todos modos, resultan necesarios nuevos estudios independientes de cultivo mediante PCR-anidada con cebadores específicos de micobacterias para confirmar si realmente se ha erradicado la comunidad micobacteriana presente en aguas de hemodiálisis del Hospital *Son Llätzer* a lo largo de estos años de implantación del tratamiento de desinfección con ácido peracético.

Dado que previamente se habían detectado micobacterias ambientales, en muestras de aguas de hemodiálisis, se esperaba detectar su presencia también en aguas potables, quizás en mayor cantidad, pero el resultado demostró que no se daba esta circunstancia, probablemente porque en aguas de hemodiálisis el tratamiento puntual con hipercloración les podía proporcionar una ventaja en la eliminación de competidores que no se daba en aguas potables con unos niveles de cloro que resisten otros microorganismos, que pueden ser competidores. Esto, junto con la capacidad de formar biopelículas les permitía sobrevivir en aguas puras de hemodiálisis. Estudios por métodos independientes de cultivo tendrían que llevarse a cabo en las aguas potables de la Universidad de las Islas Baleares para confirmar la ausencia o la presencia en baja concentración de micobacterias en estos ambientes.

No se encontró una relación directa entre las especies identificadas en los aislados clínicos y los que cabría esperar en pacientes que podrían haber estado expuestos a las micobacterias asociadas a muestras de agua del sistema de distribución municipal, aunque cabe tener en cuenta el sesgo en el análisis de los aislados clínicos, ya que no se han analizado todos los aislados clínicos de micobacterias atípicas que llegan rutinariamente al laboratorio de microbiología del hospital. En relación a otros estudios parece que no siempre se correlacionan estas dos variables, o son difíciles de demostrar (van Ingen *et al.*, 2010) y, dado que las micobacterias son ubicuas, su oportunidad de infección parece estar más relacionada con los factores que rodean la predisposición de los pacientes que no con su simple presencia en aguas.

En cuanto a la comunidad bacteriana presente detectada, no correspondiente a especies del genero *Mycobacterium*, está formada por microorganismos propios de estos hábitats (Gomila *et al.*, 2005). Estos microorganismos son característicos de las biopelículas de aguas puras y, algunas sustancias que liberan, tienen implicaciones clínicas al producir respuestas

inflamatorias en pacientes sometidos a hemodiálisis, como son las endotoxinas, esfingolípidos, oligonucleótidos, etc.

#### 4 COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE CULTIVO Y CON ESTUDIOS PREVIOS

Al comparar los resultados obtenidos por ambas metodologías se observa como los aislados de origen ambiental se afilian a algunas de las especies detectadas en la genoteca del gen del rRNA 16S obtenida con cebadores específicos de micobacterias, aunque no se puede discernir con seguridad la especie detectada, ya que el fragmento analizado por métodos independientes de cultivo es solamente de 473 pb. A pesar de esa falta de discriminación entre especies, los métodos independientes de cultivo proporcionan una diversidad superior de cepas de micobacterias.

Nuestros resultados son muy similares en cuanto a detección de especies a los realizados por otros autores en muestras similares. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en 1998 por Carson y colaboradores, se aislaron 550 micobacterias no tuberculosas de distintos puntos de un sistema de distribución de agua de un centro de hemodiálisis de Estados Unidos. Éstas se identificaron como miembros de las especies *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. avium*, *M. terrae*, *M. scrofulaceum* y *M. gordonae* (Carson *et al.*, 1988). Sartori *et al.* (2013) en muestras de aguas recogidas de distintos centros de hemodiálisis en Brasil, aislaron e identificaron especies raramente patogénicas como *M. gordonae* y *M. gastri*, y otras potencialmente patogénicas como *M. kansasii*, *M. lentiflavum* y *M. szulgai*, algunas veces asociadas a brotes de infección hospitalaria. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio donde se analizó la presencia de micobacterias en un sistema de distribución de aguas de la unidad de hemodiálisis, los aislados analizados, se asignaron a las especies, *M. chelonae*, *M. mucogenicum*, y *M. immunogenum*, junto a las subespecies de la especie *M. abscessus*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, antiguamente designadas como las especies *M. abscessus*, *M. bolletii* y *M. massiliense* (Gomila *et al.*, 2007). En cuanto a un estudio realizado en las aguas de grifo y ducha en Holanda se identificaron micobacterias de crecimiento rápido, próximamente relacionadas con *M. peregrinum* y *M. septicum*, bien conocidas por su papel como patógenos oportunistas, así como *M. abscessus*, *M. salmoniphilum* y *M. llatzerense*, junto con probables nuevas especies (Van Ingen *et al.*, 2010). Otros autores también aislaron bacterias y micobacterias con potencial patogénico en las aguas de hemodiálisis y otras aguas (Montanari *et al.*, 2009).

En resumen, se han aislado e identificado especies potencialmente patogénicas, principalmente micobacterias de crecimiento rápido, tanto por métodos dependientes como independientes de cultivo, que en el caso de muestras hospitalarias podrían suponer un riesgo de infección en los pacientes inmunocomprometidos. Para un mejor control de éstas es necesario hacer especial hincapié en aplicar procesos de desinfección efectivos en estos tipos de aguas, monitorizar continuamente el suministro de agua y adoptar en el caso de muestras

ambientales hospitalarias, medidas profilácticas eficientes para minimizar la exposición de pacientes inmunodeprimidos a fuentes contaminadas.



## CONCLUSIONES





1. En las aguas puras de hemodiálisis, y por métodos independientes de cultivo, se detecta una comunidad microbiana formada mayoritariamente por géneros aún no descritos. Muchos de estos nuevos géneros forman parte de la población activa detectada por RT-PCR.
2. El filo mayoritario detectado por métodos independientes de cultivo fue el filo *Proteobacteria*, concretamente, miembros de la clase *Gammaproteobacteria*.
3. En la población activa de aguas puras de hemodiálisis juega un papel relevante el filo *Cyanobacteria*, que no se han detectado en los medios de cultivo utilizados. Para evitar el posible riesgo que representan las cianotoxinas para el paciente en hemodiálisis deberían implementarse protocolos para la detección de cianobacterias.
4. No se han detectado micobacterias mediante métodos independientes de cultivo utilizando cebadores universales para la población microbiana total presente, ni tampoco considerando la población activa por RT-PCR. La utilización de cebadores específicos del gen del rRNA 16S de micobacterias, mediante PCR anidada, ha resultado clave en la detección de micobacterias a través de métodos independientes de cultivo, lo que sugiere que su proporción respecto a la población total es baja. Sin embargo, su limitado tamaño (473 pb) no proporciona información suficiente para discriminar a nivel de especie.
5. Dado que las micobacterias se encuentran en porcentajes muy bajos, entre las bacterias cultivables, los métodos tradicionales (descontaminación, cultivo y tinción) por sí solos no son suficientes para una buena cuantificación y caracterización de las micobacterias ambientales presentes en aguas potables y puras. Hay que combinarlos e introducir métodos moleculares de caracterización y detección.
6. El análisis multigénico es en estos momentos la mejor técnica para la identificación de los aislados, permitiendo una buena diferenciación a nivel intra- e inter-específico; ya que la secuencia del gen del rRNA 16S no es suficientemente discriminativa para poder identificar correctamente los aislados de micobacterias ambientales.
7. El análisis mediante métodos dependientes de cultivo demuestra que las aguas potables y puras tienen una comunidad bacteriana de composición similar.
8. Las especies de micobacterias ambientales, detectadas tanto en aguas potables como puras, pertenecen exclusivamente al grupo de las micobacterias de crecimiento rápido, afiliadas a las especies *M. chelonae* subsp. *chelonae*, *M. llatzerense*, *M. porcinum*/*M. neworleansense* y *M. mucogenicum*/*M. phocaicum*.
9. Los aislados clínicos analizados pertenecen mayoritariamente a las micobacterias de crecimiento lento, asignándose a las especies *M. avium* subsp. *avium*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare* y *M. parascrofulaceum*. Cinco aislados se asignaron filogenéticamente a las especies *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp.

*bolletii*, *M. chlorophenicum*, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* y *M. peregrinum*, definidas como micobacterias de crecimiento rápido.

10. Algunas de las micobacterias analizadas no se han podido asignar a especies descritas hasta el momento, sugiriéndose que representan especies aún no descritas del género *Mycobacterium*, precisando de un análisis polifásico más exhaustivo para su caracterización.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



- Abed, R. M., y Garcia-Pichel, F.** 2001. Long-term compositional changes after transplant in a microbial mat cyanobacterial community revealed using a polyphasic approach. *Environmental Microbiology* **3**(1), 53-62.
- Abraham, W.-R.** 2006. Controlling biofilms of gram-positive pathogenic bacteria. *Current Medicinal Chemistry* **13**(13), 1509-1524.
- Adékambi, T.** 2009. *Mycobacterium mucogenicum* group infections: a review. *Clinical Microbiology and Infection* **15**(10), 911-918.
- Adékambi, T., Colson, P., y Drancourt, M.** 2003. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(12), 5699-5708.
- Adékambi, T., y Drancourt, M.** 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(6), 2095-2105.
- Adékambi, T., Stein, A., Carvajal, J., Raoult, D., y Drancourt, M.** 2006. Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(4), 1268-1273.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.** 2005. Real Farmacopea Española.
- Al-Mahruqi, S. H., Van Ingen, J., Al-Busaidy, S., Boeree, M. J., Al-Zadjali, S., Patel, A., Dekhuijzen, P. R., y Van Soolingen, D.** 2009. Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria, Oman. *Emerging Infectious Diseases* **15**(2), 292-294.
- Alkhovik, O., Dymova, M., y Petrenko, T.** 2013. Detection of nontuberculous mycobacteria in Siberian region. *European Respiratory Journal* **42**(Suppl 57), P4421.
- Alqumber, M. A.** 2014. Prevalence of mycobacteria in water reservoirs of Albaha, Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal* **35**(5), 466-471.
- Álvarez, E., y Tavel, E.** 1885. Recherches sur le bacille de Lustgarten. *Archives of Physiology Norm Pathology* **6**, 303-321.
- Apajalahti, J. H., Kärpänoja, P., y Salkinoja-Salonen, M. S.** 1986. *Rhodococcus chlorophenolicus* sp. nov., a chlorophenol-mineralizing actinomycete. *International Journal of Systematic Bacteriology* **36**(2), 246-251.
- Aranda, M. C.** 2014. Estudio de coste-efectividad de la aplicación de la técnica MALDI-TOF MS en la identificación de micobacterias atípicas. *Gestión y Evaluación de Costes Sanitarios* **15**(4), 417-431.
- Bahram, N. E., Ensieh, S., Shrareh, M., Jamshid, F., Hossein, F., Ghasemian, S. H., Sadat, H. N., Tahmineh, N., Farzaneh, S., y Nima, B.** 2012. Isolation and phenotypic identification of nontuberculous mycobacteria existing in Isfahan different water samples. *Advanced Biomedical Research* **1**:18.
- Balakrishnan, N., Tortoli, E., Engel, S. L., y Breitschwerdt, E. B.** 2013. Isolation of a novel strain of *Mycobacterium iranicum* from a woman in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* **51**(2), 705-707.

- Baldry, M., y French, M. 1989. Disinfection of sewage effluent with peracetic acid. *Water Science and Technology* **21**(3), 203-206.
- Barreto, A. M. W., y Campos, C. E. D. 2000. Micobactérias "não tuberculosas" no Brasil. *Boletim de Pneumologia Sanitária* **8**(1), 23-32.
- Bartralot, R., García-Patos, V., Sitjas, D., Rodríguez-Cano, L., Mollet, J., Martín-Casabona, N., Coll, P., Castells, A., y Pujol, R. 2005. Clinical patterns of cutaneous nontuberculous mycobacterial infections. *British Journal of Dermatology* **152**(4), 727-734.
- Becker, M. L., Suchak, A. A., Wolfe, J. N., Zarychanski, R., Kabani, A., y Nicolle, L. E. 2003. *Mycobacterium neoaurum* bacteremia in a hemodialysis patient. *The Canadian Journal of Infectious Diseases* **14**(1), 45-48.
- Berger, W. H., y Parker, F. L. 1970. Diversity of planktonic foraminifera in deep-sea sediments. *Science* **168**(3937), 1345-1347.
- Besra, G. S., Khoo, K.-H., McNeil, M. R., Dell, A., Morris, H. R., y Brennan, P. J. 1995. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **34**(13), 4257-4266.
- Besra, G. S., Morehouse, C. B., Rittner, C. M., Waechter, C. J., y Brennan, P. J. 1997. Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *Journal of Biological Chemistry* **272**(29), 18460-18466.
- Blackwood, K. S., He, C., Gunton, J., Turenne, C. Y., Wolfe, J., y Kabani, A. M. 2000. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(8), 2846-2852.
- Brennan, P. J. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **83**(1), 91-97.
- Brennan, P. J., y Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry* **64**(1), 29-63.
- Briancesco, R., Semproni, M., Della Libera, S., Sdanganelli, M., y Bonadonna, L. 2010. Non-tuberculous mycobacteria and microbial populations in drinking water distribution systems. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* **46**(3), 254-258.
- Briken, V., Porcelli, S. A., Besra, G. S., y Kremer, L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology* **53**(2), 391-403.
- Brillouin, L. 1962. Science and Information Theory. 2nd. ed. Academic Press, N. Y.
- Brooks, R. W., George, K. L., Parker, B. C., Falkinham III, J. O., y Gruft, H. 1984. Recovery and survival of nontuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions. *Canadian Journal of Microbiology* **30**(9), 1112-1117.
- Brown-Elliott, B., Wallace Jr, R., Tichindelean, C., Sarria, J., McNulty, S., Vasireddy, R., Bridge, L., Mayhall, C., Turenne, C., y Loeffelholz, M. 2011. Five-year outbreak of community-and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. *Journal of Clinical Microbiology* **49**(12), 4231-4238.
- Bullin, C., Tanner, E. I., y Collins, C. 1970. Isolation of *Mycobacterium xenopei* from water taps. *Journal of Hygiene* **68**(1), 97-100.

- Butler, W., O'connor, S. P., Yakrus, M., Smithwick, R., Plikaytis, B., Moss, C., Floyd, M., Woodley, C., Kilburn, J., y Vadney, F. 1993. *Mycobacterium celatum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(3), 539-548.
- Buzas, M. A., y Gibson, T. G. 1969. Species diversity: benthonic foraminifera in western North Atlantic. *Science* **163**(3862), 72-75.
- Cafri, U., Aslan, G., Direkel, S., Tarhan, G., Ceyhan, I., y Emekdaş, G. 2010. Identification and isolation of non-tuberculous mycobacteria from environmental samples. *Mikrobiyoloji bulteni* **44**(3), 395-403.
- Canaud, B., Bosc, J., Leray, H., Morena, M., y Stec, F. 2000. Microbiologic Purity of Dialysate: Rationale and Technical Aspects. *Blood Purification* **18**(3), 200-213.
- Cândido, P. H. C., De Souza Nunes, L., Marques, E. A., Folescu, T. W., Coelho, F. S., De Moura, V. C. N., Da Silva, M. G., Gomes, K. M., Da Silva Lourenço, M. C., y Aguiar, F. S. 2014. Multidrug-resistant nontuberculous mycobacteria isolated from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* **52**(8), 2990-2997.
- Cappelli, G., Riccardi, M., Perrone, S., Bondi, M., Ligabue, G., y Albertazzi, A. 2006. Water treatment and monitor disinfection. *Hemodialysis International* **10**(s1), S13-S18.
- Cárdenas, A. M., Gomila, M., Lalucat, J., y Edelstein, P. H. 2014. Abdominal abscess caused by *Mycobacterium llatzerense*. *Journal of Clinical Microbiology* **52**(4), 1287-1289.
- Caroli, G., Spaziante, G., y Mazzarone, R. 1965. Chemo-antibiotic-resistance in vitro of "atypical" mycobacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Rivista italiana d'igiene* **26**(5), 535-546.
- Caroli, G., Levre, E., Armani, G., Biffi-Gentili, S., y Molinari, G. 1985. Search for acid-fast bacilli in bottled mineral waters. *Journal of Applied Bacteriology* **58**(5), 461-463.
- Carson, L. A., Petersen, N. J., Favero, M. S., y Agüero, S. 1978. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology* **36**(6), 839-846.
- Carson, L. A., Bland, L., Cusick, L., Favero, M., Bolan, G., Reingold, A., y Good, R. 1988. Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(12), 3122-3125.
- Casal, M., Guerrero, A., Martín, N., Moreno, S., y Nogales, M. 1999. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 14-16.
- Castillo, A., Mazari, M., Lloret, L., Sachman, B., Vinuesa, P., y López, Y. 2012. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **31**(5), 683-694.
- Cerna, J. F., Leon, N., Cortés, A. L., Salas, L. P., Helguera, A. C., López, D., Rivera, S., Fernández, E., y González, J. A. 2015. Microbiological quality of ready-to-eat vegetables collected in Mexico City: Occurrence of aerobic-mesophilic bacteria, fecal coliforms, and potentially pathogenic nontuberculous Mycobacteria. *BioMed Research International* 2015:789508.

- Cochran, W., Suh, S. J., McFeters, G., y Stewart, P. 2000. Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. *Journal of Applied Microbiology* **88**(3), 546-553.
- Colwell, R. 1997. EstimateS: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 5. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, U.S.A.
- Colwell, R. K., y Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **345**(1311), 101-118.
- Collins, C., Grange, J., y Yates, M. 1984. Mycobacteria in water. *Journal of Applied Bacteriology* **57**(2), 193-211.
- Cooksey, R. C., Jhung, M. A., Yakrus, M. A., Butler, W. R., Adékambi, T., Morlock, G. P., Williams, M., Shams, A. M., Jensen, B. J., y Morey, R. E. 2008. Multiphasic approach reveals genetic diversity of environmental and patient isolates of *Mycobacterium mucogenicum* and *Mycobacterium phocaicum* associated with an outbreak of bacteremias at a Texas hospital. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(8), 2480-2487.
- Cortesia, C., López, G. J., De Waard, J. H., y Takiff, H. E. 2010. The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**(12), 2574-2581.
- Costerton, J.W., Geesey, G.W., y Cheng, K.J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American* **238**(1), 86-95.
- Covert, T. C., Rodgers, M. R., Reyes, A. L., y Stelma, G. N. 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6), 2492-2496.
- Crago, B., Ferrato, C., Drews, S., Louie, T., Ceri, H., Turner, R., Roles, A., y Louie, M. 2014. Surveillance and molecular characterization of non-tuberculous mycobacteria in a hospital water distribution system over a three-year period. *Journal of Hospital Infection* **87**(1), 59-62.
- Chamoiseau, G. 1979. Etiology of farcy in african bovines nomenclature of the causal organisms *Mycobacterium farcinogenes* chamoiseau and *Mycobacterium senegalense* (Chamoiseau) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **29**(4), 407-410.
- Chan, K.-G. 2009. Exochelin production in *Mycobacterium neoaurum*. *International Journal of Molecular Sciences* **10**(1), 345-353.
- Chao, A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* **11**, 265-270.
- Chao, A., y Lee, S.-M. 1992. Estimating the number of classes via sample coverage. *Journal of the American Statistical Association* **87**(417), 210-217.
- Chatterjee, D., y Khoo, K.-H. 1998. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* **8**(2), 113-120.
- Chaves, D., Sandoval, A., Rodríguez, L., García, J. C., Restrepo, S., y Zambrano, M. M. 2009. Análisis comparativo de seis genomas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica (Bogotá)* **30**(1), 23-31.



- Chen, Y. Q., Chao, C., Zhang, X. J., Zheng, Q., y Liu, Y. Y. 2012. Inactivation of resistant *Mycobacteria mucogenicum* in water: Chlorine resistance and mechanism analysis. *Biomedical and Environmental Sciences* **25**(2), 230-237.
- Cheung, P.-Y., y Kinkle, B. K. 2001. *Mycobacterium* diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(5), 2222-2229.
- Chilima, B. Z., Clark, I. M., Floyd, S., Fine, P. E., y Hirsch, P. R. 2006. Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(4), 2343-2350.
- Cho, S. Y., Peck, K. R., Kim, J., Ha, Y. E., Kang, C.-I., Chung, D. R., Lee, N. Y., y Song, J.-H. 2014. *Mycobacterium chelonae* infections associated with bee venom acupuncture. *Clinical Infectious Diseases* **58**(5), e110-3.
- Chun, J., Lee, J.-H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., y Lim, Y.-W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**(10), 2259-2261.
- Daffe, M., Brennan, P. J., y McNeil, M. 1990. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analyses. *Journal of Biological Chemistry* **265**(12), 6734-6743.
- Dailoux, M., Albert, M., Laurain, C., Andolfatto, S., Lozniewski, A., Hartemann, P., y Mathieu, L. 2003. *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11), 6946-6948.
- Dauendorffer, J.-N., Guillemin, I., Aubry, A., Truffot-Pernot, C., Sougakoff, W., Jarlier, V., y Cambau, E. 2003. Identification of mycobacterial species by PCR sequencing of quinolone resistance-determining regions of DNA gyrase genes. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(3), 1311-1315.
- De Groote, M. A., y Huitt, G. 2006. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases* **42**(12), 1756-1763.
- De Naranjo, P. J., Rodríguez, G., Rodríguez, J., y Caldas, M. L. 1988. La coloración de Ziehl-Neelsen en histopatología. *Biomédica* **8**(3-4), 84-93.
- Deepa, P., Therese, K., y Madhavan, H. 2005. Application of PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) for the identification of mycobacterial isolates. *Indian Journal of Medical Research* **121**(5), 694-700.
- Del-Castillo, M., Palmero, D., Lopez, B., Paul, R., Ritacco, V., Bonvehi, P., Clara, L., Ambroggi, M., Barrera, L., y Vay, C. 2009. Mesotherapy-associated outbreak caused by *Mycobacterium immunogenum*. *Emerging Infectious Disease* **15**(2), 357-359.
- Del Solar, M., Salomón, M., y Bravo, F. 2005. Infección cutánea por micobacterias atípicas de crecimiento rápido (MACR) debido a mesoterapia cosmética: reporte de casos y revisión de la literatura. *Folia Dermatology* **16**(3), 127-135.
- Delafont, V., Mougari, F., Cambau, E., Joyeux, M., Bouchon, D., Héchard, Y., y Moulin, L. 2014. First evidence of amoebae-mycobacteria association in drinking water network. *Environmental Science and Technology* **48**(20), 11872-11882.

- Derz, K., Klinner, U., Schuphan, I., Stackebrandt, E., y Kroppenstedt, R. M. 2004. *Mycobacterium pyrenivorans* sp. nov., a novel polycyclic-aromatic-hydrocarbon-degrading species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(6), 2313-2317.
- Des Marais, D. J. 2003. Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *The Biological Bulletin* **204**(2), 160-167.
- Devulder, G., De Montclos, M. P., y Flandrois, J. 2005. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**(1), 293-302.
- Di Rienzi, S. C., Sharon, I., Wrighton, K. C., Koren, O., Hug, L. A., Thomas, B. C., Goodrich, J. K., Bell, J. T., Spector, T. D., Banfield, J. F. y Ley, R. E. 2013. The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to *Cyanobacteria*. *eLife* **2**, e01102.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease* **8**(9), 881-890.
- Donohue, M. J., Mistry, J. H., Donohue, J. M., O'Connell, K., King, D., Byran, J., Covert, T., y Pfaller, S. 2015. Frequency of nontuberculous *Mycobacteria* detection at potable water taps within the United States. *Environmental Science and Technology* **49**(10), 6127-6133.
- Dorransoro, I., y Torroba, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **30**(Supl. 2), 67-84.
- Dover, L. G., Corsino, P. E., Daniels, I. R., Cocklin, S. L., Tatituri, V., Besra, G. S., y Fütterer, K. 2004. Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance. *Journal of Molecular Biology* **340**(5), 1095-1105.
- Du Moulin, G. C., y Stottmeier, K. D. 1978. Use of cetylpyridinium chloride in the decontamination of water for culture of mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **36**(5), 771-773.
- Dubrou, S., Konjek, J., Macheras, E., Welté, B., Guidicelli, L., Chignon, E., Joyeux, M., Gaillard, J., Heym, B., y Tully, T. 2013. Diversity, community composition, and dynamics of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria in an urban tap water production and distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(18), 5498-5508.
- Durnez, L., Eddyani, M., Mgode, G. F., Katakweba, A., Katholi, C. R., Machang'u, R. R., Kazwala, R. R., Portaels, F., y Leirs, H. 2008. First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(3), 768-773.
- Dvorská, L., Bartos, M., Martin, G., Erler, W., y Pavlik, I. 2001. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. *Veterinari Medicina-Praha* **46**(11/12), 309-328.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., y Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**(16), 2194-2200.
- Eichler, S., Christen, R., Höltje, C., Westphal, P., Bötzel, J., Brettar, I., Mehling, A., y Höfle, M. G. 2006. Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(3), 1858-1872.

- Emler, S., Praplan, P., Rohner, P., Auckenthaler, R., y Hirschel, B. 1996. Disseminated infection with *Mycobacterium celatum*. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **126**(24), 1062-1065.
- Ergan, B., Çöplü, L., Alp, A., y Artvinli, M. 2004. *Mycobacterium smegmatis* pneumonia. *Respirology* **9**(2), 283-285.
- Esteban, J., Gegundez, L., y Sánchez-Castaño, A. 1992. Micobacteriosis durante el período 1980-90 en un hospital de Madrid. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **10**, 611-614.
- Falkinham 3rd, J.O., Iseman, M., Haas, P., y Soolingen, D. 2008. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *Journal of Water and Health* **6**(2), 209-213.
- Falkinham 3rd, J. O. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerging Infectious Diseases* **9**(7), 763-767.
- Falkinham 3rd, J. O. 2009. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *Journal of Applied Microbiology* **107**(2), 356-367.
- Falkinham 3rd, J. O. 2010. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Future microbiology* **5**(6), 951-960.
- Falkinham 3rd, J. O. 2011. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerging Infectious Diseases* **17**(3), 419-424.
- Falkinham 3rd, J. O. 2015. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clinics in Chest Medicine* **36**(1), 35-41.
- Falsanisi, D., Gehr, R., Santoro, D., Dell'Erba, A., Notarnicola, M., y Liberti, L. 2006. Kinetics of PAA demand and its implications on disinfection of wastewaters. *Water Quality Research Journal of Canada* **41**(4), 398-409.
- Feazel, L. M., Baumgartner, L. K., Peterson, K. L., Frank, D. N., Harris, J. K., y Pace, N. R. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(38), 16393-16399.
- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogenetic inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fergie, J. E., Milligan, T. W., Henderson, B. M., y Stafford, W. W. 1997. Intrathoracic *Mycobacterium avium* complex infection in immunocompetent children: case report and review. *Clinical Infectious Diseases* **24**(2), 250-253.
- Fernández de Vega, F. 2006. Nuevos métodos de identificación de micobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **24**, 53-57.
- Fernández de Vega, F., Moreno, J. E., Martín, J. G., y Gutiérrez, J. J. P. 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica. *Recomendaciones SEIMC*.
- Fernández, E., Cerna, J., Ramírez, M., Helguera, A., Rivera, S., Estrada, T., y González, J. 2012. *Mycobacterium mucogenicum* and other non-tuberculous mycobacteria in potable water of a trauma hospital: a potential source for human infection. *Journal of Hospital Infection* **80**(1), 74-76.
- Fisher, R. A., A. S. Corbert y C. B. Williams. 1943. The relation between the number of species and the number of individuals in a random sample of an animal population. *J. Anim. Ecol.* **12**: 42-58.

- Friedmann, F. F. 1903. Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* **29**(26), 464-466.
- Fujikawa, K., Suenaga, A., Motomura, M., Fukuda, T., Ooe, N., y Eguchi, K. 2006. A case of *Mycobacterium fortuitum* meningitis following surgery for meningioma. *Rinsho shinkeigaku, Clinical neurology* **46**(7), 480-484.
- Gangadharam, P. 1980. Atypical mycobacteriosis. *Indian Journal of Tuberculosis* **27**(3), 108.
- García, P., y García, L. 2012. Infecciones por micobacterias de crecimiento rápido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **30**(4), 192-200.
- García, J. G., Gutiérrez, J. P., y Antuña, A. S. 2005. Infecciones respiratorias por micobacterias ambientales. *Archivos de Bronconeumología* **41**(4), 206-219.
- García, R. P. 2008. Papel fundamental del Sistema de Tratamiento del Agua (STA) en la calidad del agua para hemodiálisis. *Nefrología* **28**(5), 475-478.
- Gaspar-Grillo, J. A., Farache Filho, A., Santos, A. C. B., y Leite, C. Q. F. 2012. Isolamento e identificação de micobactérias em águas tratadas provenientes do sistema de abastecimento de Araraquara-SP. [Isolation and identification of mycobacteria in treated water from the supply system Araraquara-SP]. *Alimentos e Nutrição Araraquara* **23**(1), 147-155.
- Genc, G. E., Richter, E., y Erturan, Z. 2013. Isolation of nontuberculous mycobacteria from hospital waters in Turkey. *Apmis* **121**(12), 1192-1197.
- Giao, M., Wilks, S., Azevedo, N., Vieira, M., y Keevil, C. 2009. Incorporation of natural uncultivable *Legionella pneumophila* into potable water biofilms provides a protective niche against chlorination stress. *Biofouling* **25**(4), 345-351.
- Giao, M. S., Azevedo, N., Wilks, S. A., Vieira, M., y Keevil, C. W. 2008. Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(19), 5898-5904.
- Gitti, Z., Neonakis, I., Fanti, G., Kontos, F., Maraki, S., y Tselentis, Y. 2006. Use of the GenoType *Mycobacterium* CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(6), 2244-2246.
- Godoy, M. J., Orozco, L., Hernández, C., DaMata, O., De Waard, J., y González Rico, S. 2008. Identificación de micobacterias no tuberculosas: comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* **28**(2), 96-104.
- Gómez-Álvarez, V., Humrighouse, B. W., Revetta, R. P., y Santo Domingo, J. W. 2015. Bacterial composition in a metropolitan drinking water distribution system utilizing different source waters. *Journal of Water and Health* **13**(1), 140-151.
- Gomila, M., Gascó, J., Busquets, A., Gil, J., Bernabeu, R., Buades, J. M., y Lalucat, J. 2005. Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. *FEMS Microbiology Ecology* **52**(1), 101-114.
- Gomila, M., Gascó, J., Gil, J., Bernabeu, R., Iñigo, V., y Lalucat, J. 2006. A molecular microbial ecology approach to studying hemodialysis water and fluid. *Kidney International* **70**(9), 1567-1576.
- Gomila, M., Ramírez, A., y Lalucat, J. 2007. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(12), 3787-3797.

- Gomila, M., Ramírez, A., Gascó, J., y Lalucat, J. 2008. *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(12), 2769-2773.
- Gomila Ribas, M. 2007. *Comunidades microbianas en la determinación de la calidad de aguas. Tesis doctoral.* Universitat de les Illes Balears, España.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-i., Ludwig, W., y Whitman, W. B. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volum Five: The Actinobacteria, Part, A*: Springer: New York.
- Goslee, S., y Wolinsky, E. 1976. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria 1-4. *American Review of Respiratory Disease* **113**(3), 287-292.
- Greninger, A. L., Langelier, C., Cunningham, G., Keh, C., Melgar, M., Chiu, C. Y., y Miller, S. 2015. Two rapidly growing mycobacterial species isolated from a brain abscess: first whole genome sequence of *Mycobacterium immunogenum* and *Mycobacterium llatzerense*. *Journal of Clinical Microbiology* **53**(7), 2374-2377.
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., y Iademaro, M. F. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **175**(4), 367-416.
- Guerrero, R., Piqueras, M., y Berlanga, M. 2002. Microbial mats and the search for minimal ecosystems. *International Microbiology* **5**(4), 177-188.
- Häggblom, M. M., Nohynek, L. J., Palleroni, N. J., Kronqvist, K., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Salkinoja-Salonen, M. S., Klatte, S., y Kroppenstedt, R. M. 1994. Transfer of polychlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* (Apajalahti *et al.* 1986) to the genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenolicum* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**(3), 485-493.
- Hall-Stoodley, L., Keevil, C., y Lappin-Scott, H. 1999. *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* biofilm formation under high and low nutrient conditions. *Journal of Applied Microbiology* **85**(S1), 60S-69S.
- Hall-Stoodley, L., y Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology* **11**(7), 1034-1043.
- Hall, L., y Roberts, G. D. 2006. Non-molecular identification of nontuberculous mycobacteria in the clinical microbiology laboratory: What's the real deal? *Clinical Microbiology Newsletter* **28**(10), 73-80.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Hammer, Ø., Harper, D., y Ryan, P. 2001. PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electrónica* **4**(1), 9pp.
- Han, X. Y., Dé, I., y Jacobson, K. L. 2007. Rapidly growing mycobacteria clinical and microbiologic studies of 115 cases. *American Journal of Clinical Pathology* **128**(4), 612-621.
- Hashimoto, A., Koga, H., Kohno, S., Miyazaki, Y., Kaku, M., y Hara, K. 1996. Rapid detection and identification of mycobacteria by combined method of polymerase chain reaction and hybridization protection assay. *Journal of Infection* **33**(2), 71-77.

- Havelaar, A., Berwald, L., Groothuis, D., y Baas, J. 1985. Mycobacteria in semi-public swimming-pools and whirlpools. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene* **180**(5-6), 505-514.
- Heckman, G. A., Hawkins, C., Morris, A., Burrows, L. L., y Bergeron, C. 2004. Rapidly progressive dementia due to *Mycobacterium neoaurum* meningoencephalitis. *Emerging Infectious Diseases* **10**(5), 924-927.
- Hedgecock, L., y Faucher, I. 1961. Isolation of increased numbers of unclassified mycobacteria following decontamination of sputum with malachite green and crystal violet 1, 2. *American Review of Respiratory Disease* **84**(5P1), 710-718.
- Henke, J. M., y Bassler, B. L. 2004b. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* **186**(20), 6902-6914.
- Hill, D. L., y Ballou, C. E. 1966. Biosynthesis of mannophospholipids by *Mycobacterium phlei*. *Journal of Biological Chemistry* **241**(4), 895-902.
- Hirsch, C., y Christensen, D. 1983. Novel method for selective isolation of actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(4), 925-929.
- Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M., y Engelhardt, H. 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(10), 3963-3967.
- Hoshino, T., Terahara, T., Tsuneda, S., Hirata, A., y Inamori, Y. 2005. Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. *Journal of Applied Microbiology* **99**(5), 1165-1175.
- Howard, S. T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., Lyons, C. R., y Byrd, T. F. 2006. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**(6), 1581-1590.
- Hunter, S. W., Gaylord, H., y Brennan, P. 1986. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *Journal of Biological Chemistry* **261**(26), 12345-12351.
- Hurlbert, S. H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52**(4), 577-586.
- Huson, D. H. 1998. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**(1), 68-73.
- Hussein, Z., Landt, O., Wirths, B., y Wellinghausen, N. 2009. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. *International Journal of Medical Microbiology* **299**(4), 281-290.
- Idigoras, P., Jiménez-Alfaro, J. A., y Mendiola, J. 2007. Osteomielitis esternal postquirúrgica por *Mycobacterium porcinum*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **25**(1), 68-69.
- Jaramillo, V. L., y McCarthy, C. M. 1986. Recovery of *Mycobacterium avium* after treatment with chemical decontaminants. *Canadian Journal of Microbiology* **32**(9), 728-732.
- Jarikre, L. 1992. *Mycobacterium gordonae* genitourinary disease. *Genitourinary medicine* **68**(1), 45-46.

- Jarzembowski, J. A., y Young, M. B. 2008. Nontuberculous mycobacterial infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **132**(8), 1333-1341.
- Jaubert, J., Mougari, F., Picot, S., Boukerrou, M., Barau, G., Ahmed, S.-A. A., Raskine, L., Camuset, G., Michault, A., y Simac, C. 2015. A case of postoperative breast infection by *Mycobacterium fortuitum* associated with the hospital water supply. *American Journal of Infection Control* **43**(4), 406-408.
- Jordan, P., Stanley, T., Donnelly, F., Elborn, J., McClurg, R., Millar, B., Goldsmith, C., y Moore, J. 2007. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Letters in Applied Microbiology* **44**(5), 459-466.
- Jukes, T. H., y Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism* **3**, 21-132.
- Jun, H. J., Lee, N. Y., Kim, J., y Koh, W. J. 2010. Successful treatment of *Mycobacterium celatum* pulmonary disease in an immunocompetent patient using antimycobacterial chemotherapy and combined pulmonary resection. *Yonsei medical journal* **51**(6), 980-983.
- Kahana, L., Cole, F., y Richardson, H. 1975. Clinical aspects of atypical mycobacterial infection. *Canadian Medical Association Journal* **112**(3), 321-324.
- Kasai, H., Ezaki, T., y Harayama, S. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(1), 301-308.
- Katoch, V., Parashar, D., Chauhan, D., Singh, D., Sharma, V., y Ghosh, S. 2007. Rapid identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique targeting 16S-23S ribosomal RNA internal transcribed spacer & flanking region. *Indian Journal of Medical Research* **125**(2), 155-162.
- Kellogg, J. A., Bankert, D. A., Withers, G. S., Sweimler, W., Kiehn, T. E., y Pfyffer, G. E. 2001. Application of the Sherlock Mycobacteria Identification System using high-performance liquid chromatography in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(3), 964-970.
- Kennedy, B. S., Bedard, B., Younge, M., Tuttle, D., Ammerman, E., Ricci, J., Doniger, A. S., Escuyer, V. E., Mitchell, K., y Noble-Wang, J. A. 2012. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection associated with tattoo ink. *New England Journal of Medicine* **367**(11), 1020-1024.
- Kim, B.-J., Lee, S.-H., Lyu, M.-A., Kim, S.-J., Bai, G.-H., Kim, S.-J., Chae, G.-T., Kim, E.-C., Cha, C.-Y., y Kook, Y.-H. 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology* **37**(6), 1714-1720.
- Kim, C.-K., Choi, S. I., Jeon, B. R., Lee, Y.-W., Lee, Y. K., y Shin, H. B. 2014. Pulmonary infection caused by *Mycobacterium neoaurum*: The first case in Korea. *Annals of Laboratory Medicine* **34**(3), 243-246.
- Kim, K. K., Lee, K. C., Oh, H.-M., y Lee, J.-S. 2010. *Halomonas stevensii* sp. nov., *Halomonas hamiltonii* sp. nov. and *Halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(2), 369-377.
- Kim, S. Y., Kim, M. S., Chang, H. E., Yim, J.-J., Lee, J.-H., Song, S. H., Park, K. U., Song, J., y Kim, E.-C. 2012. Pulmonary infection caused by *Mycobacterium conceptionense*. *Emerging Infectious Diseases* **18**(1), 174-176.

- Kirschner, P., Springer, B., Vogel, U., Meier, A., Wrede, A., Kiekenbeck, M., Bange, F., y Böttger, E. 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **31**(11), 2882-2889.
- Kitis, M. 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International* **30**(1), 47-55.
- Kivihya-Ndugga, L., Van Cleeff, M., Githui, W., Nganga, L., Kibuga, D., Odhiambo, J., y Klatser, P. R. 2003. A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **7**(12), 1163-1171.
- Klanicova, B., Seda, J., Slana, I., Slany, M., y Pavlik, I. 2013. The tracing of mycobacteria in drinking water supply systems by culture, conventional, and real time PCRs. *Current Microbiology* **67**(6), 725-731.
- Klanicova, B., Slana, I., Roubal, P., Pavlik, I., y Kralik, P. 2012. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *International Journal of Food Microbiology* **157**(2), 150-155.
- Kleeberg, H. H., y Nel, E. E. 1973. Occurrence of environmental atypical mycobacteria in South Africa. *Annales de la Societ e Belge de M decine Tropicale* **53**(4), 405-418.
- Kondo, A., Mori, K., Iwata, J., Tamura, M., Yamamoto, T., Nakao, Y., y Maeda, M. 2006. Caseous necrotic granuloma in the pituitary stalk due to nontuberculous mycobacteria (*Mycobacterium tokaiense*) infection-case report. *Neurologia medico-chirurgica* **46**(2), 80-83.
- Kubica, G., Dye, W., Cohn, M., y Middlebrook, G. 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease* **87**(5), 775-779.
- Kulakov, L. A., McAlister, M. B., Ogden, K. L., Larkin, M. J., y O'hanlon, J. F. 2002. Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(4), 1548-1555.
- Kumar, K. J., Chandra, J., Mandal, R., Dutta, R., y Jain, N. 1995. Fatal pulmonary infection caused by *Mycobacterium smegmatis* in an infant. *The Indian Journal of Pediatrics* **62**(5), 619-621.
- Kusunoki, S., y Ezaki, T. 1992. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**(2), 240-245.
- Kuyper, D., Ali, H. H., Mohamed, A. M., y Hinrichs, S. H. 2004. Identification of *Mycobacterium* species using curated custom databases. *Parallel and Distributed Processing Symposium*, 2004. Proceedings. 18th International.
- Lamrabet, O., y Drancourt, M. 2013. *Mycobacterium gilvum* illustrates size-correlated relationships between Mycobacteria and *Acanthamoeba polyphaga*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(5), 1606-1611.
- Lande, R. 1996. Statistics and partitioning of species diversity, and similarity among multiple communities. *Oikos* **76**, 5-13.



- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrand, E. y Goodfellow, M., Eds.). Wiley, Chichester, 125-175.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., y Lopez, R. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**(21), 2947-2948.
- Le Dantec, C., Duguet, J.-P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., y Vincent, V. 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(11), 5318-5325.
- Leão, S. C., Sampaio, J., Martin, A., Palomino, J. C., y Portaels, F. 2005. Profiling *Mycobacterium ulcerans* with *hsp65*. *Emerging Infectious Disease* **11**(11), 1795-1796.
- Leão, S. C., Tortoli, E., Euzéby, J. P., y Garcia, M. J. 2011. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**(9), 2311-2313.
- Lecuona, M., Abreu, R., Rodríguez-Álvarez, C., Castro, B., Campos, S., Hernández-Porto, M., Mendoza, P., y Arias, A. 2015. First isolation of *Mycobacterium canariasense* from municipal water supplies in Tenerife, Canary Islands, Spain. *International Journal of Hygiene and Environmental Health Pii*, S1438-4639(15)00106-6.
- LeChevallier, M. 2004. Control, treatment and disinfection of *Mycobacterium avium* complex in drinking water. *Pathogenic Mycobacteria in water – A guide to public health consequences, monitoring and management* (Pedley, S., Bartram, J., Rees, G., Dufour, A., Cotruvo, J.A., Eds.), Iwa Publishing, London, UK, 143-168.
- Lee, H., Bang, H.-E., Bai, G.-H., y Cho, S.-N. 2003. Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(5), 2213-2218.
- Lehmann, K., y Neumann, R. 1899. Lehmann's Med. Handatanten, X, Atlas and Grundriss der Bakteriologie and Lehr-buch der speziellen bakteriologischen Diagnostik **2**, 411.
- Leite, C. Q. F., Rocha, A. d. S., Leite, S. R., Ferreira, R. M. C., Suffys, P. N., Fonseca, L., y Saad, M. H. F. 2005. A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-Layer chromatography and molecular methods. *Microbiology and Immunology* **49**(7), 571-578.
- Liao, C.-H., Lai, C.-C., Huang, Y.-T., Chou, C.-H., Hsu, H.-L., y Hsueh, P.-R. 2009. Subcutaneous abscess caused by *Mycobacterium conceptionense* in an immunocompetent patient. *Journal of Infection* **58**(4), 308-309.
- Lima, C. A. M. d., Gomes, H. M., Oelemann, M. A. C., Ramos, J. P., Caldas, P. C., Campos, C. E. D., Pereira, M. A. d. S., Montes, F. F. O., Oliveira, M. d. S. C. d., y Suffys, P. N. 2013. Nontuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **108**(4), 457-462.
- Liu, G., Wang, G.-R., Yu, X., Liang, Q., Mu, J., Shang, Y.-Y., Ling, Y., Zhang, H.-Q., Zheng, S.-H., y Huang, H.-R. 2014. Bacteriological characterization of a *Mycobacterium parascrofulaceum* strain isolated from a Chinese pneumonia patient. *International Journal of Infectious Diseases* **25**, 82-87.

- Liu, J., Barry, C. E., y Nikaido, H. 1999. Cell wall: physical structure and permeability. *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence* (Ratledge, C., Dale, J., Eds.), Wiley Online Library, 220-239.
- Livanainen, E., Martikainen, P., y Katila, M. L. 1997. Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters. *Journal of Applied Microbiology* **82**(1), 121-127.
- López, M. J., Povedano, M. C., y Urbano, A. 2012. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias (1ª edición ed.), OmniaScience.
- Loret, J.-F., y Greub, G. 2010. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **213**(3), 167-175.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., y Brock, T. D. 2004. *Biología de los microorganismos*. Pearson Education/Prentice Hall.
- Maeda, N., Nigou, J., Herrmann, J.-L., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P. H., Puzo, G., Gicquel, B., y Neyrolles, O. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *Journal of Biological Chemistry* **278**(8), 5513-5516.
- Magee, J., y Ward, A. 2012. Genus I. *Mycobacterium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edition, Volumen 5*, The Actinobacteria (Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W.B. Eds.), Springer, New York, 312-375.
- Magurran, A. E. 1988. Why diversity? *Ecological Diversity and Its Measurement* (pp. 1-5): Springer.
- Manganelli, M., Scardala, S., Stefanelli, M., Palazzo, F., Funari, E., Vichi, S., Buratti, F. M., y Testai, E. 2012. Emerging health issues of cyanobacterial blooms. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* **48**(4), 415-428.
- Margalef, D. R. 1958. *Information theory in ecology* (Vol. 3): Society for General Systems Research.
- Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A., y Daffé, M. 2014. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chemistry & biology* **21**(1), 67-85.
- Martín, N., González, T., y Fernández, F. 1985. Micobacteriosis: presentación de 38 casos. *Medicina clínica (Barc)* **84**, 651-654.
- Mather, C. A., Rivera, S. F., y Butler-Wu, S. M. 2014. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *Journal of Clinical Microbiology* **52**(1), 130-138.
- Matlova, L., Kaevska, M., Moravkova, M., Beran, V., Shitaye, J., y Pavlik, I. 2012. Mycobacteria in peat used as a supplement for pigs: failure of different decontamination methods to eliminate the risk. *Veterinarni Medicina* **57**(4), 212-217.
- Matthews, T., Lawrence, M., Nair, C., y Tyrrell, D. 1976. Antiviral activity in milk of possible clinical importance. *The lancet* **308**(8000), 1387-1389.
- McFeters, G. A., Broadaway, S. C., Pyle, B. H., y Egozy, Y. 1993. Distribution of bacteria within operating laboratory water purification systems. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(5), 1410-1415.

- McNabb, A., Eisler, D., Adie, K., Amos, M., Rodrigues, M., Stephens, G., Black, W. A., y Isaac-Renton, J. 2004. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(7), 3000-3011.
- McNeil, M., Daffe, M., y Brennan, P. J. 1990. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *Journal of Biological Chemistry* **265**(30), 18200-18206.
- McSwiggan, D., y Collins, C. 1974. The isolation of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium xenopi* from water systems. *Tubercle* **55**(4), 291-297.
- Medina, M., Sauret, J., y Caminero, J. 1999. Enfermedades producidas por micobacterias ambientales. *Medicina clínica* **113**(16), 621-630.
- Mendum, T. A., Chilima, B. Z., y Hirsch, P. R. 2000. The PCR amplification of non-tuberculous mycobacterial 16S rRNA sequences from soil. *FEMS Microbiology letters* **185**(2), 189-192.
- Menhinick, E. F. 1964. A comparison of some species-individuals diversity indices applied to samples of field insects. *Ecology* **45**(4), 859-861.
- Mignard, S., y Flandrois, J.-P. 2008. A seven-gene, multilocus, genus-wide approach to the phylogeny of mycobacteria using supertrees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**(6), 1432-1441.
- Mijs, W., De Haas, P., Rossau, R., Van Der Laan, T., Rigouts, L., Portaels, F., y Van Soolingen, D. 2002. Molecular evidence to support a proposal to reserve the designation *Mycobacterium avium* subsp. *avium* for bird-type isolates and '*M. avium* subsp. *hominissuis*' for the human/porcine type of *M. avium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(5), 1505-1518.
- Mohamed, A. M., Kuyper, D. J., Iwen, P. C., Ali, H. H., Bastola, D. R., y Hinrichs, S. H. 2005. Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(8), 3811-3817.
- Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology* **14**(3), 255-261.
- Montanari, L. B., Sartori, F. G., Cardoso, M. J. d. O., Varo, S. D., Pires, R. H., Leite, C. Q. F., Prince, K., y Martins, C. H. G. 2009. Microbiological contamination of a haemodialysis center water distribution system. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **51**(1), 37-43.
- Moore, M., y Frerichs, J. 1953. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *The Journal of Investigative Dermatology* **20**(2), 133-169.
- Moravkova, M., Lamka, J., Kriz, P., y Pavlik, I. 2011. The presence of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* in common pheasants (*Phasianus colchicus*) living in captivity and in other birds, vertebrates, non-vertebrates and the environment. *Veterinari Medicina (Praha)* **56**, 333-343.
- Moreno, C. 2000. Diversidad de quirópteros en un paisaje del centro de Veracruz, México. Tesis doctoral. Instituto de Ecología, AC, Xalapa, Veracruz, México.
- Morimoto, K., Kazumi, Y., Shiraishi, Y., Yoshiyama, T., Murase, Y., Ikushima, S., Kurashima, A., Kudoh, S., Goto, H., y Maeda, S. 2015. Clinical and microbiological features of definite

- Mycobacterium gordonae* pulmonary disease: the establishment of diagnostic criteria for low-virulence mycobacteria. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **109**(9), 589-593.
- Morita, Y., Patterson, J., Billman-Jacobe, H., y McCONVILLE, M. 2004. Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides. *Biochemical Journal* **378**, 589-597.
- Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J., y García-Valdés, E. 2011. *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(3), 1076-1085.
- Mullis, K. B., y Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.
- Murat, J.-B., Grenouillet, F., Reboux, G., Penven, E., Batchili, A., Dalphin, J.-C., Thaon, I., y Millon, L. 2012. Factors influencing the microbial composition of metalworking fluids and potential implications for machine operator's lung. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(1), 34-41.
- Murcia, M. I., Tortoli, E., Menéndez, M. C., Palenque, E., y García, M. J. 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(9), 2049-2054.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Metabolismo, M. A. P. 2009. Genética de las bacterias. Microbiología Médica 6ª Ed: Elsevier-España.
- Mwikuma, G., Kwenda, G., Hang'ombe, B. M., Simulundu, E., Kaile, T., Nzala, S., Siziya, S., y Suzuki, Y. 2015. Molecular identification of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in Zambia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **14**(1), 1-5.
- Navarrete, A., Peacock, A., Macnaughton, S., Urmeneta, J., Mas-Castella, J., White, D., y Guerrero, R. 2000. Physiological status and community composition of microbial mats of the Ebro Delta, Spain, by signature lipid biomarkers. *Microbial Ecology* **39**(1), 92-99.
- Nel, E., Kleeberg, H., y Gatner, E. 1980. Laboratory manual of tuberculosis methods. *Tuberculosis Research Institute. SAMRC. Pretoria*.
- Neonakis, I. K., Gitti, Z., Krambovitis, E., y Spandidos, D. A. 2008. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods* **75**(1), 1-11.
- Neumann, M., Schulze-Robbeke, R., Hagenau, C., y Behringer, K. 1997. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(2), 547-552.
- Newton, J. A., Weiss, P. J., Bowler, W. A., y Oldfield, E. C. 1993. Soft-tissue infection due to *Mycobacterium smegmatis*: report of two cases. *Clinical Infectious Diseases* **16**(4), 531-533.
- Nigou, J., Gilleron, M., Rojas, M., García, L. F., Thurnher, M., y Puzo, G. 2002. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes and Infection* **4**(9), 945-953.
- Ninet, B., Monod, M., Emler, S., Pawlowski, J., Metral, C., Rohner, P., Auckenthaler, R., y Hirschel, B. 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *Journal of Clinical Microbiology* **34**(10), 2531-2536.
- Niquette, P., Servais, P., y Savoie, R. 2001. Bacterial dynamics in the drinking water distribution system of Brussels. *Water Research* **35**(3), 675-682.

- Nishiuchi, Y., Maekura, R., Kitada, S., Tamaru, A., Taguri, T., Kira, Y., Hiraga, T., Hirotsu, A., Yoshimura, K., y Miki, M. 2007. The recovery of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC. *Clinical Infectious Diseases* **45**(3), 347-351.
- Nishiuchi, Y., Tamura, A., Kitada, S., Taguri, T., Matsumoto, S., Tateishi, Y., Yoshimura, M., Ozeki, Y., Matsumura, N., y Ogura, H. 2009. *Mycobacterium avium* complex organisms predominantly colonize in the bathtub inlets of patients' bathrooms. *Japanese Journal of Infection Disease* **62**(3), 182-186.
- Nogueira, C. L., Simmon, K. E., Chimara, E., Cnockaert, M., Palomino, J. C., Martin, A., Vandamme, P., Brown-Elliott, B. A., Wallace, R. J., y Leão, S. C. 2015. *Mycobacterium franklinii* sp. nov., a species closely related to members of the *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**(7), 2148-2153.
- Nystrand, R. 2008. Microbiology of water and fluids for haemodialysis. *Journal of the Chinese Medical Association* **71**(5), 223-229.
- Oh, W. S., Ko, K. S., Song, J.-H., Lee, M. Y., Ryu, S. Y., Heo, S., Kwon, K. T., Lee, J.-H., Peck, K. R., y Lee, N. Y. 2005. Catheter-associated bacteremia by *Mycobacterium senegalense* in Korea. *BMC infectious diseases* **5**(1), 107.
- Oie, S., Kamiya, A., Yoneda, I., Uchiyama, K., Tsuchida, M., Takai, K., y Naito, K. 2003. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *Journal of Hospital Infection* **54**(2), 115-119.
- Olmos, A. F., De la Fuente, C. G., Nieto, J. A. S., y Ramos, S. V. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2006a. Guías para la calidad del agua potable. Volumen 1. Recomendaciones. 3ª Edición.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2006b. Plan Mundial para detener la Tuberculosis 2006-2015. Actuar para salvar vidas, Alianza Alto a la TB: OMS Ginebra.
- Paerl, H. W., Pinckney, J. L., y Steppe, T. F. 2000. Cyanobacterial–bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environmental Microbiology* **2**(1), 11-26.
- Page, R.D.M. 1996. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**(4), 357-358.
- Pagnier, I., Merchat, M., Raoult, D., y La Scola, B. 2009. Emerging *Mycobacteria* spp. in cooling towers. *Emerging Infectious Diseases* **15**(1), 121-122.
- Parashar, D., Das, R., Chauhan, D., Sharma, V., Lavania, M., Yadav, V., Chauhan, S., y Katoch, V. 2009. Identification of environmental mycobacteria isolated from Agra, north India by conventional and molecular approaches. *The Indian Journal of Medical Research* **129**(4), 424-431.
- Parte, A.C. 2014. LPSN – list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research* **42**(Database issue), D613-616.

- Patil, R., Patil, T., Schenfeld, L., y Massoud, S. 2011. *Mycobacterium porcinum* peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of General Internal Medicine* **26**(3), 346-348.
- Pelletier, P., Du Moulin, G., y Stottmeier, K. 1988. Mycobacteria in public water supplies: comparative resistance to chlorine. *Microbiological Sciences* **5**(5), 147-148.
- Penso, G., Castelnuovo, G., Gaudio, A., Princivale, M., Zampieri, A., y Vella, L. 1952. Studies and research on Mycobacteria. VIII. A new tubercle bacilli, *Mycobacterium minetti* n. sp; microbiologic and pathogenic study. *Rendiconti-Istituto Superiore di Sanita* **15**(7), 491-554.
- Pérez, I., Aguilar, D. A., Fernández, E., Carrillo, A. K., Helguera, A. C., Rivera, S., Estrada, T., Cerna, J. F., y González, J. A. 2013. Occurrence of potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria in Mexican household potable water: a pilot study. *BMC Research Notes* **6**(1), 531.
- Pérez, R., Rodríguez, P., y Ayala, J. 1999. Tratamiento del agua para hemodiálisis. Características del líquido de diálisis. *Tratado de Hemodiálisis. Barcelona: F Valderrábano*, 75-90.
- Pérez, R., y Rodríguez, P. 2001. *La calidad del líquido de Hemodiálisis*. En: II Congreso Internacional de Nefrología por Internet. Disponible en <http://www.uninet.edu/cin2001/html/conf/perez/perez.html>.
- Petti, C. A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Disease* **44**(8), 1108-1114.
- Pfiffer, G. E. 2015. *Mycobacterium*: General characteristics, isolation, and staining procedures. *Manual of Clinical Microbiology, 11<sup>th</sup> Edition* (Jorgensen J., Pfaller, M., Carroll, K., Funke, G., Landry, M., Richter, S., Warnock, D., Eds.). *American Society for Microbiology, Washington, DC*, 536-569.
- Phelan, J., Maitra, A., Mc Nerney, R., Nair, M., Gupta, A., Coll, F., Pain, A., Bhakta, S., y Clark, T. G. 2015. The draft genome of *Mycobacterium aurum*, a potential model organism for investigating drugs against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *International Journal of Mycobacteriology* **4**(3), 207-216.
- Phillips, B., y Kaplan, W. 1976. Effect of cetylpyridinium chloride on pathogenic fungi and *Nocardia asteroides* in sputum. *Journal of Clinical Microbiology* **3**(3), 272-276.
- Pierce, E. S. 2009. Possible transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* through potable water: lessons from an urban cluster of Crohn's disease. *Gut pathogens* **1**(1), 1-5.
- Piersimoni, C., y Scarparo, C. 2008. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *The Lancet infectious diseases* **8**(5), 323-334.
- Piersimoni, C., Tortoli, E., de Lalla, F., Nista, D., Donato, D., Bornigia, S., y De Sio, G. 1997. Isolation of *Mycobacterium celatum* from patients infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases* **24**(2), 144-147.
- Pourahmad, F., Thompson, K. D., Adams, A., y Richards, R. H. 2009. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction–Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for identification of aquatic mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods* **76**(2), 128-135.

- Primm, T. P., Lucero, C. A., y Falkinham, J. O. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **17**(1), 98-106.
- Prince Manzano, C. S. 2014. Técnicas de cultivo y moleculares para el estudio de las comunidades microbianas en aguas hospitalarias. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears, España.
- Radomski, N., Cambau, E., Moulin, L., Haenn, S., Moilleron, R., y Lucas, F. S. 2010. Comparison of culture methods for isolation of nontuberculous mycobacteria from surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(11), 3514-3520.
- Rahbar, M., Lamei, A., Babazadeh, H., y Yavari, S. A. 2010. Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. *African Journal of Biotechnology* **9**(24), 3618-3621.
- Ratledge, C. 1984. Metabolism of iron and other metals by mycobacteria. *Microbiology Series* **15**, 603-627.
- Reasoner, D., y Geldreich, E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* **49**(1), 1-7.
- Reischl, U., Lehn, N., Wolf, H., y Naumann, L. 1998. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **36**(10), 2853-2860.
- Revetta, R. P., Pemberton, A., Lamendella, R., Iker, B., y Santo Domingo, J. W. 2010. Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses. *Water Research* **44**(5), 1353-1360.
- Rhines, C. 1935. The persistence of avian tubercle bacilli in soil and in association with soil microorganisms. *Journal of Bacteriology* **29**(3), 299-311.
- Richards, C. L., Broadaway, S. C., Eggers, M. J., Doyle, J., Pyle, B. H., Camper, A. K., y Ford, T. E. 2015. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria in drinking water and associated biofilms on the Crow Reservation, Montana, USA. *Microbial Ecology*, 1-12.
- Richardson, E., Samson, D., y Banaei, N. 2009. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria by multiplex, real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **47**(5), 1497-1502.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J., y Pierre-Audigier, C. 1999. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(3), 852-857.
- Rosselló-Móra, R., y Amann, R. 2015. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology* **38**(4), 209-216.
- Rossi, S., Antonelli, M., Mezzanotte, V., y Nurizzo, C. 2007. Peracetic acid disinfection: a feasible alternative to wastewater chlorination. *Water Environment Research* **79**(4), 341-350.
- Roth, A., Reischl, U., Streubel, A., Naumann, L., Kroppenstedt, R. M., Habicht, M., Fischer, M., y Mauch, H. 2000b. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology* **38**(3), 1094-1104.
- Rusin, P. A., Rose, J. B., Haas, C. N., y Gerba, C. P. 1997. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer, pp. 57-83.

- Rutala, W., y Weber, D. 1999. Infection control: the role of disinfection and sterilization. *Journal of Hospital Infection* **43**, S43-S55.
- Saiman, L. 2004. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatric Respiratory Reviews* **5**, S367-S369.
- Saitou, N., y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**(4), 406-425.
- Salah, I. B., Adékambi, T., y Drancourt, M. 2009. *Mycobacterium phocaicum* in therapy pool water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **212**(4), 439-444.
- Saldías, P. F., Tirapegui S, F. y Díaz, O. 2013. Infección pulmonar por *Mycobacterium avium* complex en el huésped inmunocompetente. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias* **29**, 162-167.
- Sambrook, J., y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Third. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sampaio, J. L. M., Junior, D. N., de Freitas, D., Höfling-Lima, A. L., Miyashiro, K., Alberto, F. L., y Leao, S. C. 2006. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(9), 3201-3207.
- Sánchez, D., Matthijs, S., Gomila, M., Tricot, C., Mulet, M., García-Valdés, E., y Lalucat, J. 2014. *rpoD* gene pyrosequencing for the assessment of *Pseudomonas* diversity in a water sample from the Woluwe river. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(15), 4738-4744.
- Sanders, H. L. 1968. Marine benthic diversity: a comparative study. *American naturalist* **102**, 243-282.
- Santos, R., Oliveira, F., Fernandes, J., Goncalves, S., Macieira, F., y Cadete, M. 2005. Detection and identification of mycobacteria in the Lisbon water distribution system. *Water Science and Technology* **52**(8), 177-180.
- Sartori, F. G., Leandro, L. F., Montanari, L. B., de Souza, M. G. M., Pires, R. H., Sato, D. N., Leite, C. Q. F., de Andrade Prince, K., y Martins, C. H. G. 2013. Isolation and identification of environmental mycobacteria in the waters of a haemodialysis center. *Current Microbiology* **67**(1), 107-111.
- Sawyer, L. K., y Hermanowicz, S. W. 1998. Detachment of biofilm bacteria due to variations in nutrient supply. *Water Science and Technology* **37**(4), 211-214.
- Schinsky, M. F., Morey, R. E., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Wilson, R. W., Floyd, M. M., Butler, W. R., Daneshvar, M. I., Brown-Elliott, B. A., y Wallace, R. J. 2004. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5), 1653-1667.
- Schleif, R. F., y Wensink, P. C. 1981. *Practical methods in molecular biology*. New York: Springer-Verlag.
- Schlesinger, L. S., Hull, S. R., y Kaufman, T. M. 1994. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *The Journal of Immunology* **152**(8), 4070-4079.



- Schulze-Röbbecke, R., y Fischeder, R. 1989. Mycobacteria in biofilms. Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin. *International Journal of Hygiene and Environmental Medicine* **188**(3-4), 385-390.
- Schulze-Röbbecke, R., Janning, B., y Fischeder, R. 1992. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tubercle and Lung Disease* **73**(3), 141-144.
- Schwartz, T., Hoffmann, S., y Obst, U. 2003. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and UV disinfection in a public drinking water distribution system. *Journal of Applied Microbiology* **95**(3), 591-601.
- Selvakumar, N., Gomathi Sekar, M., Rahman, F., Syamsunder, A., Duraipandian, M., Wares, F., y Narayanan, P. 2005. Comparison of variants of carbol-fuchsin solution in Ziehl-Neelsen for detection of acid-fast bacilli [Technical Note]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **9**(2), 226-229.
- Selvakumar, N., Rahman, F., Rajasekaran, S., Narayanan, P., y Frieden, T. R. 2002. Inefficiency of 0.3% carbol fuchsin in Ziehl-Neelsen staining for detecting acid-fast bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(8), 3041-3043.
- Sgarioni, S. A., Hirata, R. D. C., Hiroyuki Hirata, M., Leite, C. Q. F., Prince, K. d., Leite, S. R. d. A., Vedovello Filho, D., Siqueira, V. L. D., Caleffi-Ferracioli, K. R., y Cardoso, R. F. 2014. Occurrence of *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **45**(2), 707-711.
- Shachor-Meyouhas, Y., Sprecher, H., Eluk, O., Ben-Barak, A., y Kassis, I. 2011. An outbreak of *Mycobacterium mucogenicum* bacteremia in pediatric hematology-oncology patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **30**(1), 30-32.
- Shafipour, M., Ghane, M., Rahimi alang, S., Livani, S., y Ghaemi, E. 2014. The comparison of biochemical and sequencing 16S rDNA gene methods to identify nontuberculous mycobacteria. *Archives of Razi Institute* **69**(2), 137-142.
- Shannon, C. 1948. A mathematical theory of distribution. *Bell Systematic and Technology* **27**, 623.
- Shedd, A., Edhegard 2nd, K., y Lugo-Somolinos, A. 2010. *Mycobacterium immunogenum* skin infections: two different presentations. *International Journal of Dermatology* **49**(8), 941-944.
- Shin, J.-H., Lee, H.-K., Cho, E.-J., Yu, J.-Y., y Kang, Y.-H. 2008. Targeting the *rpoB* gene using nested PCR-restriction fragment length polymorphism for identification of nontuberculous mycobacteria in hospital tap water. *The Journal of Microbiology* **46**(6), 608-614.
- Shojaei, H., Daley, C., Gitti, Z., Hashemi, A., Heidarieh, P., Moore, E. R., Naser, A. D., Russo, C., van Ingen, J., y Tortoli, E. 2013. *Mycobacterium iranicum* sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic species isolated from clinical specimens on three different continents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**(4), 1383-1389.
- Shojaei, H., Hashemi, A., Heidarieh, P., Ataei, B., y Naser, A. D. 2011. Pulmonary and extrapulmonary infection caused by *Mycobacterium conceptionense*: the first report from Iran. *JRSM Short Reports* **2**(4), 31.
- Simberloff, D. 1972. Properties of the rarefaction diversity measurement. *American naturalist* **106**, 414-418.

- Simmon, K. E., Brown-Elliott, B. A., Ridge, P. G., Durtschi, J. D., Mann, L. B., Slechta, E. S., Steigerwalt, A. G., Moser, B. D., Whitney, A. M., y Brown, J. M. 2011. *Mycobacterium chelonae-abscessus* complex associated with sinopulmonary disease, Northeastern USA. *Emerging Infectious Disease* **17**(9), 1692-1700.
- Simpson, E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature* **163**, 688.
- Singh, B., Ghosh, J., Islam, N. M., Dasgupta, S., y Kirsebom, L. A. 2010. Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**(2), 165-177.
- Sivasankari, P., Khyriem, A. B., Venkatesh, K., y C-Parija, S. 2006. Atypical mycobacterial infection among HIV seronegative patients in Pondicherry. *Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences* **48**(2), 107-109.
- Skiest, D., y Levi, M. 1998. Catheter-related bacteremia due to *Mycobacterium smegmatis*. *Southern Medical Journal* **91**(1), 36-37.
- Smith, E. P., y van Belle, G. 1984. Nonparametric estimation of species richness. *Biometrics* **40**, 119-129.
- Smithwick, R. W., Stratigos, C. B., y David, H. L. 1975. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **1**(5), 411-413.
- Soini, H., y Musser, J. M. 2001. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry* **47**(5), 809-814.
- Songer, J., Bicknell, E., y Thoen, C. 1980. Epidemiological investigation of swine tuberculosis in Arizona. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **44**(2), 115-120.
- Sousa, S., Bandeira, M., Carvalho, P. A., Duarte, A., y Jordao, L. 2015. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. *International Journal of Mycobacteriology* **4**(1), 36-43.
- Springer, B., Böttger, E. C., Kirschner, P., y Wallace, R. J. 1995. Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**(2), 262-267.
- Stamm, L. M., Morisaki, J. H., Gao, L.-Y., Jeng, R. L., McDonald, K. L., Roth, R., Takeshita, S., Heuser, J., Welch, M. D., y Brown, E. J. 2003. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *The Journal of Experimental Medicine* **198**(9), 1361-1368.
- Steingrube, V. A., Gibson, J. L., Brown, B. A., Zhang, Y., Wilson, R. W., Rajagopalan, M., y Wallace, R. 1995. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **33**(1), 149-153.
- Stewart, P. S., y Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* **358**(9276), 135-138.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M., y Costerton, J. 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(12), 5608-5613.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., y Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology* **56**(1), 187-209.
- Talavlikar, R., Carson, J., Meatherill, B., Desai, S., Sharma, M., Shandro, C., Tyrrell, G. J., y Kuhn, S. 2011. *Mycobacterium senegalense* tissue infection in a child after fish tank exposure. *The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **22**(3), 101.
- Tan, C.-K., Lai, C.-C., Chou, C.-H., y Hsueh, P.-R. 2009. *Mycobacterium celatum* pulmonary infection mimicking pulmonary tuberculosis in a patient with ankylosing spondylitis. *International Journal of Infectious Diseases* **13**(6), e459-e462.
- Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C. H., y Kamagata, Y. 2014. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(24), 7659-7666.
- Teixeira, L., Avery, R., Iseman, M., Arrossi, A., Harrington, S., Stephens, K., y Winans, C. 2013. *Mycobacterium llatzerense* lung infection in a liver transplant recipient: case report and review of the literature. *American Journal of Transplantation* **13**(8), 2198-2200.
- Thibeaut, S., Levy, P.-Y., Pelletier, M.-L., y Drancourt, M. 2010. *Mycobacterium conceptionense* infection after breast implant surgery, France. *Emerging infectious diseases* **16**(7), 1180-1181.
- Thomas, J. M., y Ashbolt, N. J. 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environmental Science and Technology* **45**(3), 860-869.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J., y Levi, Y. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology* **97**(5), 950-963.
- Thomson, R., Tolson, C., Sidjabat, H., Huygens, F., y Hargreaves, M. 2013a. *Mycobacterium abscessus* isolated from municipal water-a potential source of human infection. *BMC Infectious Diseases* **13**(1), 241.
- Thomson, R., Tolson, C., Carter, R., Coulter, C., Huygens, F., y Hargreaves, M. 2013b. Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM. *Journal of Clinical Microbiology* **51**(9), 3006-3011.
- Tipper, J. C. 1979. Rarefaction and rarefaction-the use and abuse of a method in paleoecology. *Paleobiology* **5**, 423-434.
- Torvinen, E., Suomalainen, S., Paulin, L., y Kusnetsov, J. 2014. Mycobacteria in Finnish cooling tower waters. *Apmis* **122**(4), 353-358.
- Tsitko, I., Rahkila, R., Priha, O., Ali-Vehmas, T., Terefework, Z., Soini, H., y Salkinoja-Salonen, M. S. 2006. Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. *FEMS Microbiology Letters* **256**(2), 236-243.
- Tsukamura, M. 1966. *Mycobacterium parafortuitum*: a new species. *Journal of General Microbiology* **42**(1), 7-12.
- Tsukamura, M. 1967. *Mycobacterium chitae*: a new species. *Japanese Journal of Microbiology* **11**(1), 43-47.

- Tsukamura, M. 1976. Properties of *Mycobacterium smegmatis* freshly isolated from soil. *Japanese Journal of Microbiology* **20**(4), 355-356.
- Tsukamura, M., y Mizuno, S. 1972. A new species of rapidly growing scotochromogenic mycobacteria, *Mycobacterium neoaurum*. *Medicine Biology (Tokyo)* **85**, 229-233.
- Tsukamura, M., Mizuno, S., y Tsukamura, S. 1981. Numerical analysis of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium obuense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium rhodesiae* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium aichiense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium chubuense* sp. nov., nom. rev., and *Mycobacterium tokaiense* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* **31**(3), 263-275.
- Tsukamura, M., Nemoto, H., y Yugi, H. 1983. *Mycobacterium porcinum* sp. nov., a porcine pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(2), 162-165.
- Turenne, C., Thibert, L., Williams, K., Burdz, T., Cook, V., Wolfe, J., Cockcroft, D., y Kabani, A. 2004. *Mycobacterium saskatchewanense* sp. nov., a novel slowly growing scotochromogenic species from human clinical isolates related to *Mycobacterium interjectum* and Accuprobe-positive for *Mycobacterium avium* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(3), 659-667.
- Turenne, C. Y., Semret, M., Cousins, D. V., Collins, D. M., y Behr, M. A. 2006. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(2), 433-440.
- Unni, M., Jesudason, M., Rao, S., y George, B. 2005. *Mycobacterium fortuitum* bacteraemia in an immunocompromised patient. *Indian Journal of Medical Microbiology* **23**(2), 137-138.
- Vaerewijck, M. J., Huys, G., Palomino, J. C., Swings, J., y Portaels, F. 2005. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews* **29**(5), 911-934.
- Valdés, F., y Cid, A. 2004. Micobacterias atípicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas* **95**(6), 331-357.
- Van Ingen, J., Blaak, H., De Beer, J., De Roda Husman, A. M., y Van Soolingen, D. 2010. Rapidly growing nontuberculous mycobacteria cultured from home tap and shower water. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(17), 6017-6019.
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., y Manaia, C. M. 2014. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews* **38**(4), 761-778.
- Vess, R., Anderson, R., Carr, J., Bond, W., y Favero, M. 1993. The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* **74**(2), 215-221.
- Vijayaraghavan, R., Chandrashekhar, R., Sujatha, Y., y Belagavi, C. 2006. Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. *Journal of Hospital Infection* **64**(4), 344-347.
- Villanueva, L., Navarrete, A., Urmeneta, J., White, D. C., y Guerrero, R. 2004. Combined phospholipid biomarker-16S rRNA gene denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial diversity and physiological status in an intertidal microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(11), 6920-6926.
- Von Baum, H., Bommer, M., Forke, A., Holz, J., Frenz, P., y Wellinghausen, N. 2010. Is domestic tap water a risk for infections in neutropenic patients? *Infection* **38**(3), 181-186.

- Vonmoos, S., Leuenberger, P., Beer, V., y De Haller, R. 1986. Pleuropulmonary infection caused by *Mycobacterium smegmatis*. Case description and literature review. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* **116**(52), 1852-1856.
- Vuorio, R., Andersson, M., Rainey, F., Kroppenstedt, R., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Viljanen, M., y Salkinoja-Salonen, M. 1999. A new rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium murale* sp. nov., isolated from the indoor walls of a children's day care centre. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**(1), 25-35.
- Wang, Y., Ogawa, M., Fukuda, K., Miyamoto, H., y Taniguchi, H. 2006. Isolation and identification of mycobacteria from soils at an illegal dumping site and landfills in Japan. *Microbiology and immunology* **50**(7), 513-524.
- Washer, L. L., Riddell IV, J., Rider, J., y Chenoweth, C. E. 2007. *Mycobacterium neoaurum* bloodstream infection: report of 4 cases and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* **45**(2), e10-e13.
- Wayne, L. G., y Kubica, G. P. 1984. *The Mycobacteria: a Sourcebook*: Dekker.
- Weinberger, M., Berg, S. L., Feuerstein, I. M., Pizzo, P. A., y Witebsky, F. G. 1992. Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* **14**(6), 1229-1239.
- Wells, A., Agius, E., y Smith, N. 1955. *Mycobacterium fortuitum*. *American Review of Tuberculosis* **72**(1), 53-63.
- Wendt, S. L., George, K. L., Parker, B. C., Gruft, H., y Falkinham III, J. O. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous Mycobacteria: III. Isolation of potentially pathogenic Mycobacteria from aerosols 1, 2. *American Review of Respiratory Disease* **122**(2), 259-263.
- Whittaker, R. H. 1972. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* **21**(2/3), 213-251.
- Wickman, K. 1986. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria: a bacteriological survey of Swedish strains isolated between 1973 and 1981. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **18**(4), 337-345.
- Wieland, P., Holt, M., Roman, M., Cole, H., y Daugherty, S. 2003. International space station internal thermal control system cold plate/fluid-stability test-two year update: SAE Technical Paper.
- Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2.4. 1-2.4. 5.
- Wilson, R. W., Steingrube, V. A., Böttger, E. C., Springer, B., Brown-Elliott, B. A., Vincent, V., Jost, K. C., Zhang, Y., Garcia, M. J., y Chiu, S. H. 2001. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(5), 1751-1764.
- Williams, M. M., Yakrus, M. A., Arduino, M. J., Cooksey, R. C., Crane, C. B., Banerjee, S. N., Hilborn, E. D., y Donlan, R. M. 2009. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(7), 2091-2098.

- Wimpenny, J., Manz, W., y Szewzyk, U. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* **24**(5), 661-671.
- Wolinsky, E. 1979. Nontuberculous Mycobacteria and Associated Diseases 1, 2. *American Review of Respiratory Disease* **119**(1), 107-159.
- Wolinsky, E. 1992. Mycobacterial diseases other than tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases* **15**(1), 1-12.
- Wolinsky, E., y Ryneerson, T. K. 1968. Mycobacteria in Soil and Their Relation to Disease-Associated Strains 1, 2, 3. *American Review of Respiratory Disease*, **97**(6P1), 1032-1037.
- World Health Organization. 2008. Tuberculosis and air travel: guidelines for prevention and control: World Health Organization.
- World Health Organization Pan American Health Organization. 1987. *Guías para la calidad del agua potable* (Vol. 3): Pan American Health Organization.
- Wu, R. I., Mark, E. J., y Hunt, J. L. 2012. Staining for acid-fast bacilli in surgical pathology: practice patterns and variations. *Human pathology* **43**(11), 1845-1851.
- Wu, T.-S., Lu, C.-C., y Lai, H.-C. 2009. Current situations on identification of nontuberculous mycobacteria. *Journal of Biomedical Laboratory Science* **21**(1), 1-6.
- Yam, W.-C., Yuen, K.-Y., Kam, S.-Y., Yiu, L.-S., Chan, K.-S., Leung, C.-C., Tam, C.-M., Ho, P.-O., Yew, W.-W., y Seto, W.-H. 2006. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *Journal of Medical Microbiology* **55**(5), 529-536.
- Yamazaki, Y., Danelishvili, L., Wu, M., Hidaka, E., Katsuyama, T., Stang, B., Petrofsky, M., Bildfell, R., y Bermudez, L. E. 2006. The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. *Cellular Microbiology* **8**(5), 806-814.
- Yang, H. J., Yim, H. W., Lee, M. Y., Ko, K. S., y Yoon, H. J. 2011. *Mycobacterium conceptionense* infection complicating face rejuvenation with fat grafting. *Journal of Medical Microbiology* **60**(3), 371-374.
- Yates, M., Pozniak, A., Uttley, A., Clarke, R., y Grange, J. 1997. Isolation of environmental mycobacteria from clinical specimens in south-east England: 1973–1993. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **1**(1), 75-80.
- Yu, X.-l., Lu, L., Chen, G.-z., Liu, Z.-G., Lei, H., Song, Y.-z., y Zhang, S.-l. 2014. Identification and characterization of non-tuberculous Mycobacteria isolated from tuberculosis suspects in Southern-Central China. *PLoS One* **9**(12), e114353.
- Zanetti, S., Faedda, R., Fadda, G., Dupré, I., Mollicotti, P., Ortu, S., Delogu, G., Sanguinetti, M., Ardito, F., y Sechi, L. A. 2001. Isolation and identification of *Mycobacterium neoaurum* from a patient with urinary infection. *The new microbiologica* **24**(2), 189-192.
- Zeng, D.-N., Fan, Z.-Y., Chi, L., Wang, X., Qu, W.-D., y Quan, Z.-X. 2013. Analysis of the bacterial communities associated with different drinking water treatment processes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **29**(9), 1573-1584.
- Zlojtro, M., Jankovic, M., Samaržija, M., Zmak, L., Jankovic, V. K., Obrovac, M., Zlojtro, I., y Jakopovic, M. 2015. Nosocomial pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* associated with a hospital's water supply contamination: a case series of 135 patients. *Journal of Water and Health* **13**(1), 125-130.

- Zolg, J. W., y Philippi-Schulz, S. 1994. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **32**(11), 2801-2812.
- Zong, W., Zhang, X., Wang, H., Xu, X. L., Wang, Q., Tian, W., Jin, Y. L., Wu, Q., y Tang, M. 2012. The first case of cutaneous infection with *Mycobacterium parascrofulaceum*. *Therapeutics and Clinical Risk Management* **8**, 353-358.
- Zosso, C., Lienhard, R., Siegrist, H. H., Malinverni, R., y Clerc, O. 2015. Post liposuction infections by rapidly growing mycobacteria. *Infectious Diseases* **47**(2), 69-72.





ANEXO



**Tabla S1.** Asignación filogenética de los 50 clones obtenidos en la genoteca de DNA a partir de la muestra 1, de agua de hemodilúis.

Clon	Longitud (pb)	Cepa tipo de especie más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso	Clon/Cepa más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso
C1	824	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>T</sup>	86,9	AB025013	Clon 3BCL34/ <i>Herbaspirillum</i> sp. AU13533	95/91	AM087514/ EU549851
C2	824	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>T</sup>	87,7	AB025013	<i>Comamonas</i> sp. XJ-L144	90	EU817496
C3	835	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	83,7	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> *TDX16	99/93	HF586987/ KJ599678
C4	605	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 <sup>T</sup>	97,5	CP000248	Clon 3232B040225/ <i>Novosphingobium</i> sp. MG44	99/99	JN198921/ AJ746101
C5	835	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	84,1	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> *TDX16	100/93	HF586987/ KJ599678
C6	842	<i>Natronocella acetinirlica</i> ANL 6-2 <sup>T</sup>	85,3	EF103128	Clon 3BCL50/ <i>Cyanobacterium</i> *TDX16	95/89	AM087544/ KJ599678
C7	835	<i>Sediminibacterium ginsengisoli</i> DCY13 <sup>T</sup>	84,2	EF067860	Uncultured <i>Bacteroidetes</i> Clon QEDN2DH10/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	90/89	CU927117/ KJ147093
C8	825	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>T</sup>	87,7	AB025013	<i>Comamonas</i> sp. XJ-L144	90	EU817496
C9	835	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	84,1	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> *TDX16	100/93	HF586987/ KJ599678
C10	838	<i>Thioalbus denitrificans</i> Su4 <sup>T</sup>	90,6	EU837269	Clon HL-L 0-11 bac35/ <i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i> HRh1	90/89	HG514062/ NR_116699
C11	823	<i>Novosphingobium nitrogenifigens</i> DSM 19370 <sup>T</sup>	90,5	AEWJ01000057	Clon 15/ <i>Novosphingobium</i> sp. MG42	96/95	AF513088/ AJ746099
C13	851	<i>Rhizobacter gummiophilus</i> NS21 <sup>T</sup>	89,2	AB609313	<i>Aquabacterium</i> sp. MG67	92	AJ746124
C14	855	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> m-1 <sup>T</sup>	85,2	AF387301	Clon 3ACL64/ <i>Piscinibacter aquaticus</i> NBRC 102349	94/90	AM087510/ NR_114061
C15	861	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	96,0	JN674641	Clon 4X205/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	99/99	LC002965/ KJ1147093
C16	836	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>T</sup>	85,7	AB025013	Clon FL_02_12/ <i>Sediminibacterium</i> sp. OTC5a	92/91	KC666052/ KJ726630
C17	862	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	95,9	JN674641	Clon 4X205/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	99/98	LC002965/ KJ1147093
C18	863	<i>Natronocella acetinirlica</i> ANL 6-2 <sup>T</sup>	89,6	EF103128	Clon 3BCL34/ <i>Acidiferrobacter</i> sp. SPII_3	99/91	AM087514/ KC128649
C19	859	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> m-1 <sup>T</sup>	88,1	AF387301	Clon 3BCL22/ <i>Acidiferrobacter</i> sp. SPIII_3	97/89	AM087513/ KC128649
C21	860	<i>Natronocella acetinirlica</i> ANL 6-2 <sup>T</sup>	89,0	EF103128	Clon 3BCL92/ <i>Acidiferrobacter</i> sp. SPIII_3	96/90	AM087512/ KC128649
C22	862	<i>Natronocella acetinirlica</i> ANL 6-2 <sup>T</sup>	88,6	EF103128	Clon 3BCL34/ <i>Acidiferrobacter</i> sp. SPIII_3	98/90	AM087514/ KC128649
C23	809	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>T</sup>	97,2	AB025013	<i>Novosphingobium</i> sp. MG42	100	AJ746099
C25	865	<i>Rhizobacter dauci</i> H6 <sup>T</sup>	91,7	AB297965	Clon 4-2/ <i>Rhizobacter</i> sp. DS48-6-9	93/92	KF638291/ KM670028
C26	841	<i>Candidatus Thiomargarita joergensenii</i> NAM032	88,7	FR690922	Clon 3ACL64/ <i>Acidiferrobacter</i> sp. SPII_3	98/91	AM087510/ KC128649
C27	862	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	95,9	JN674641	Clon 4X205/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	99/98	LC002965/ KJ1147093
C28	865	<i>Candidatus Thiomargarita joergensenii</i> NAM032	89,6	FR690922	Clon 3ACL21/ <i>Thiohalomonas denitrificans</i> HLD_14	99/91	AM087509/ EF117913

Tabla S1. Continuación.

Clon	Longitud (pb)	Cepa tipo de especie más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso	Clon/Cepa más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso
C29	857	<i>Ectothiorhodospinus mongolicus</i> M9 <sup>1</sup>	88,5	AY298904	Clon 3ACL134/ <i>Ectothiorhodospinus mongolicus</i> M9	95/89	AM087514/NR_042831
C30	837	(mitochondria) <i>Chaetosphaeridium globosum</i>	66,2	AF494279	<i>Uncultured proteobacterium</i> clon GASP-MA253_B02	79	EF663021
C33	845	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	96,0	JN674641	Clon 4X205/ <i>Sediminibacterium salmonicum</i> OTU-e14	99/99	LC002965/KJ1147093
C34	824	<i>Novosphingobium stygium</i> IFO 16085 <sup>T</sup>	97,3	AB025013	<i>Novosphingobium</i> sp. MG37	99	AJ746094
C36	865	<i>Rhizobacter gummiphilus</i> 'NS21 <sup>T</sup>	87,7	AB609313	<i>Aquabacterium</i> sp. MG67	91	AJ746124
C37	842	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	88,5	JN674641	Clon 5ZP3006/ <i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-12 1648v	96/93	KF145740/JF266660
C38	865	<i>Candidatus Thiomargarita joergensenii</i> NAM032	89,3	FR690922	Clon 3ACL64/ <i>Thiohalophilus thiocyanatoydans</i> HRhD_2	98/89	AM087510/NR_043875
C39	865	<i>Rhizobacter gummiphilus</i> NS21 <sup>T</sup>	92,7	AB609313	<i>Aquabacterium</i> sp. MG67	96	AJ746124
C40	753	<i>Natronocella acetinirrica</i> ANL 6-2 <sup>T</sup>	90,3	EF103128	Clon 3ACL18/ <i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> strain m-1 <sup>T</sup>	99/92	AM087515/NR_114629
C41	878	<i>Methylococcus capsulatus</i> Texas <sup>T</sup>	84,2	AUKJ01000004	Clon 3BCL50/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	96/89	AM087544/KJ599678
C42	665	<i>Natronocella acetinirrica</i> ANL 6-2 <sup>T</sup>	90,8	EF103128	Clon 3ACL18/ <i>Natronocella acetinirrica</i> ANL_1	99/91	JN541149/EF103127
C43	908	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> HL-EbGR7 <sup>T</sup>	90,9	CP001339	Clon 3ACL18/ <i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> HL-EbGR7	99/91	JN541149/NR_074692
C44	882	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	84,4	HM038000	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/94	AB185017/KJ599678
C45	881	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	84,5	HM038000	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/93	AB185017/KJ599678
C46	860	<i>Candidatus Caedibacter acanthamoebae</i>	90,1	AF132138	Clon MABRDTU38/ <i>Candidatus Nucleicultrix amoebiphila</i>	99/94	FJ529991/KF697195
C47	885	<i>Candidatus Thiomargarita joergensenii</i> NAM032	89,8	FR690922	Clon 3ACL21/ <i>Thioalbus denitrificans</i> Su4	99/92	AM087515/NR_122087
C48	873	<i>Rhizobacter gummiphilus</i> 'NS21 <sup>T</sup>	98,1	AB609313	Clon ctg CGOF116/ <i>Rhizobacter</i> sp. DS48-6-9	100/99	DQ395833/KM670028
C49	883	<i>Actinimicrobium antarcticum</i> 'KOPRI 25157 <sup>T</sup>	86,4	HQ699437	Clon 3BCL34/ <i>Herbaspirillum</i> sp. AU13533	95/92	AM087514/EU549851
C50	610	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> m-1 <sup>T</sup>	91,0	NR_114629	Clon 3ACL18/ <i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> m-1 <sup>T</sup>	99/91	AM087515/NR_114629
C52	889	<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> NO-37 <sup>T</sup>	84,3	AF376020	Clon OTU63/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	98/88	JN222486/KJ599678
C53	770	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	95,2	JN674641	Clon 3BCL31/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	99/98	AM087520/KJ1147093
C57	708	<i>Reyranelia massiliensis</i> 521 <sup>T</sup>	98,3	HE997181	<i>Reyranelia</i> sp. B60-109	99	JX458408
C58	627	<i>Novosphingobium rhizosphaerae</i> JM-1 <sup>T</sup>	87,0	KM365125	Clon GFC_062/ <i>Natronocella acetinirrica</i> ANL 1	89/86	HQ628711/EF103127
C63	739	<i>Sediminibacterium salmoneum</i> NBRC 103935 <sup>T</sup>	88,1	KI866530	<i>Uncultured Bacteroidetes bacterium</i> Clon Elev_165_1334	92	EF019955
C64	784	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> m-1 <sup>T</sup>	91,4	NR_114629	Clon 3ACL18/ <i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> m-1 <sup>T</sup>	99/92	AM087515/NR_114629

\* Estos clones se asignan filogenéticamente al filo *Cyanobacteria* en un género taxonómicamente no descrito.

**Tabla S2.** Asignación filogenética de los 42 clones obtenidos en la genoteca de RNA (RT-PCR) a partir de la muestra 1, de agua de hemodíalisis.

Clon	Longitud (pb)	Cepa tipo de especie más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso	Clon y/o Cepa más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso
RT3	664	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>†</sup>	83,7	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT11	683	<i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> m-1 <sup>†</sup>	91,8	NR_114629	Clon 3ACL18/ <i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> strain m-1 <sup>†</sup>	99/92	AM087515/NR_114629
RT12	664	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>†</sup>	83,8	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT13	659	<i>Bradyrhizobium valentinum</i> LmjM3 <sup>†</sup>	96,7	JX514883	Aislado 111285545228/ <i>Bradyrhizobium ferriligni</i> CCBAU 51501	97	HQ118340/KP411886
RT14	661	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>†</sup>	86,9	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/95	HF586987/KJ599678
RT15	662	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>†</sup>	87,2	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	100/95	HF586987/KJ599678
RT16	664	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>†</sup>	83,1	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	98/91	AB185017/KJ599678
RT19	678	<i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> m-1 <sup>†</sup>	91,9	NR_114629	Clon 3ACL18/ <i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> m-1 <sup>†</sup>	99/92	AM087515/NR_114629
RT20	646	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443 <sup>†</sup>	97,3	X66025	Clon LIB056 A A04/ <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6187	98/98	KM851490/FJ390923
RT21	645	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>†</sup>	83,5	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT22	656	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>†</sup>	86,8	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/95	HF586987/KJ599678
RT23	582	(chloroplast) <i>Cyanoptyche gloeocystis</i> SAG 34.90	83,9	AM084275	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT24	662	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>†</sup>	87,1	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/95	HF586987/KJ599678
RT25	664	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>†</sup>	83,7	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT26	646	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443 <sup>†</sup>	99,7	X66025	Clon LIB056 A A04/ <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6187	99	KM851490/FJ390923
RT27	644	<i>Thioalkalivibrio sulfidophilus</i> HL-EbGR7 <sup>†</sup>	90,4	CP001339	Clon 3ACL18/ <i>Natronocella acetinitrilica</i> ANL 1	99/92	AM087515/EF103127
RT28	591	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>†</sup>	86,7	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/95	HF586987/KJ599678
RT32	609	<i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> m-1 <sup>†</sup>	86,1	NR_114629	Clon TH-75/ <i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> m-1 <sup>†</sup>	87/85	JN802222/NR_114629
RT33	650	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443 <sup>†</sup>	96,8	X66025	Clon FFCH13690/ <i>Bradyrhizobium denitrificans</i> NBRC_105663 <sup>†</sup>	97/97	EU133399/AB682257
RT34	661	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>†</sup>	87,0	Y17712	Clon B1NR70D1/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	94/90	AY957886/KJ599678
RT36	652	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>†</sup>	87,2	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/95	HF586987/NR_104911
RT37	661	<i>Novosphingobium tardaugens</i> NBRC 16725 <sup>†</sup>	86,5	BASZ01000029	Clon LIB073_B_F07/ <i>Novosphingobium</i> sp. 2PR51-13	89/84	KM852011/EU440981
RT38	660	<i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> m-1 <sup>†</sup>	91,6	AF387301	Clon 3ACL18/ <i>Acidiferro bacter thiooxydans</i> DSM 2392 <sup>†</sup>	99/92	AM087515/NR_114870
RT39	644	<i>Natronocella acetinitrilica</i> ANL 6-2 <sup>†</sup>	90,3	EF103128	Clon 3ACL18/ <i>Natronocella acetinitrilica</i> ANL 1	99/91	AM087515/EF103127

Tabla S2. Continuación.

Clon	Longitud (pb)	Cepa tipo de especie más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso	Clon y/o Cepa más próxima	Similitud (%)	Nº Acceso
RT40	644	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	94,5	JN674641	Clon 4X205/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	99/98	LC002965/KJ147093
RT41	644	<i>Natronocella acetinitrilica</i> ANL 6-2 <sup>T</sup>	90,5	EF103128	Clon 3ACL18/ <i>Natronocella acetinitrilica</i> ANL 1	99/91	AM087515/EF103127
RT42	662	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	87,2	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	100/95	HF586987/KJ599678
RT43	644	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443 <sup>T</sup>	99,7	X66025	Clon 3ACL18/ <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6187	99/99	AM087515/FJ390923
RT44	656	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	87,0	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/95	HF586987/KJ599678
RT45	645	<i>Sediminibacterium goheungense</i> HME7863 <sup>T</sup>	94,3	JN674641	Clon 4X205/ <i>Sediminibacterium salmoneum</i> OTU-e14	98	LC002965/KJ147093
RT47	646	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443 <sup>T</sup>	99,7	X66025	Clon LIB056 A. A04/ <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6187	99	KM851490/FJ390923
RT48	583	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	83,8	HM038000	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT49	654	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	87,2	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	100/95	HF586987/KJ599678
RT50	435	<i>Mesorhizobium camethorni</i> CCNWXJ 40-4 <sup>T</sup>	95,3	EU169581	Clon S2P1085/ <i>Mesorhizobium</i> sp. PNG	98/98	KF7145665/AB604651
RT51	641	<i>Candidatus Caedibacter acanthamoebae</i>	84,1	AF132138	Clon 174/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	94/88	GU225979/KJ599678
RT53	654	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	87,2	HM038000	Clon mCIB_19/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	100/95	HF586987/KJ599678
RT54	642	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>T</sup>	83,3	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/91	AB185017/KJ599678
RT57	646	<i>Bradyrhizobium denitrificans</i> LMG 8443 <sup>T</sup>	99,5	X66025	Clon LIB056 A. A04/ <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6187	99	KM851490/FJ390923
RT59	655	<i>Vampirovibrio chlorellavorus</i> ICPB 3707 <sup>T</sup>	83,4	HM038000	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT60	655	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>T</sup>	83,4	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT61	655	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>T</sup>	83,3	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678
RT62	655	<i>Malonomonas rubra</i> GraMalII <sup>T</sup>	83,3	Y17712	Clon TH-75/ <i>Cyanobacterium</i> * TDX16	99/92	AB185017/KJ599678

\* Estos clones se asignan filogenéticamente al filo *Cyanobacteria* en un género taxonómicamente no descrito.

**Tabla S3.** Asignación filogenética de los 60 clones obtenidos en la genoteca del gen del rRNA 16S específica del género *Mycobacterium* (473 pb) a partir de la muestra 1 de agua de hemodíalisis.

Clon	Longitud (pb)	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	N° acceso
Z1	473	<i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup> / <i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup>	99,6	AJ746070, JMDW01000030
Z2	472	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. tokaiense</i> ATCC 27282 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup> / <i>M. murale</i> MA-112 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup>	99,2	AY457072, AF480590, HQ153090, Y08857, AY457080
Z3	473	<i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup> / <i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup>	99,8	AJ746070, JMDW01000030
Z4	473	<i>M. saskatchewanense</i> ATCC BAA-544 <sup>T</sup>	99,4	AY208856
Z5	473	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	99,8	AY457072, AY457080, HQ153090
Z6	472	<i>M. iranicum</i> M05 <sup>T</sup> / <i>M. senegalense</i> CIP 104941 <sup>T</sup> / <i>M. chlorophenolicum</i> PCP-1 <sup>T</sup> / <i>M. houstonense</i> ATCC 49403 <sup>T</sup> / <i>M. mucogenicum</i> ATCC 49650 <sup>T</sup>	99,2	HQ009482, AY457081, X79094, AY457067, AY457074
Z7	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,6	CU458896, AHS01000006
Z8	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z9	473	<i>M. boenickei</i> ATCC 49935 <sup>T</sup> / <i>M. neworleansense</i> ATCC 49404 <sup>T</sup> / <i>M. porcinum</i> CIP 105392 <sup>T</sup> / <i>M. conceptionense</i> CIP 108544 <sup>T</sup>	99,4	AY012573, AY457068, AY457077, AY859684
Z10	473	<i>M. parafortuitum</i> DSM 43528 <sup>T</sup>	100,0	X93183
Z11	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z12	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,2	CU458896, AHS01000006
Z13	473	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	99,6	AY457072, AY457080, HQ153090
Z14	473	<i>M. boenickei</i> ATCC 49935 <sup>T</sup> / <i>M. neworleansense</i> ATCC 49404 <sup>T</sup> / <i>M. porcinum</i> CIP 105392 <sup>T</sup> / <i>M. conceptionense</i> CIP 108544 <sup>T</sup>	100,0	AY012573, AY457068, AY457077, AY859684
Z15	473	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup>	99,4	JMDW01000030
Z16	473	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	99,4	AY457072, AY457080, HQ153090
Z17	473	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. salmoniphilum</i> ATCC 13758 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	99,4	AY457072, DQ866768, AY457080, HQ153090
Z18	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,6	CU458896, AHS01000006
Z19	472	<i>M. boenickei</i> ATCC 49935 <sup>T</sup> / <i>M. porcinum</i> CIP 105392 <sup>T</sup> / <i>M. conceptionense</i> CIP 108544 <sup>T</sup> / <i>M. neworleansense</i> ATCC 49404 <sup>T</sup>	100,0	AY012573, AY457077, AY859684, AY457068

Tabla S3. Continuación.

Clon	Longitud (pb)	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	N° acceso
Z20	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,2	CU458896, AHS01000006
Z21	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,8	CU458896, AHS01000006
Z22	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,6	CU458896, AHS01000006
Z23	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z24	473	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> / <i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup>	99,8	JMDW01000030, AJ746070
Z25	472	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> / <i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup>	99,4	JMDW01000030, AJ746070
Z26	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z27	473	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup>	99,4	JMDW01000030
Z28	472	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> / <i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup>	100,0	JMDW01000030, AJ746070
Z29	472	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z30	473	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	99,6	AY457072, AY457080, HQ153090
Z31	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,6	CU458896, AHS01000006
Z32	473	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	99,8	AY457072, AY457080, HQ153090
Z33	472	<i>M. tokaiense</i> ATCC 27282 <sup>T</sup> / <i>M. murale</i> MA-112/96 <sup>T</sup> / <i>M. pyrenivorans</i> DSM 44605 <sup>T</sup>	99,6	AF480590, Y08857, AJ431371
Z34	473	<i>M. boenickei</i> ATCC 49935 <sup>T</sup> / <i>M. porcinum</i> CIP 105392 <sup>T</sup> / <i>M. conceptionense</i> CIP 108544 <sup>T</sup> / <i>M. neworleansense</i> ATCC 49404 <sup>T</sup>	99,2	AY012573, AY457077, AY859684, AY457068
Z35	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,6	CU458896, AHS01000006
Z36	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,8	CU458896, AHS01000006
Z38	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,4	CU458896, AHS01000006
Z39	473	<i>M. tokaiense</i> ATCC 27282 <sup>T</sup> / <i>M. murale</i> MA-112/96 <sup>T</sup>	99,4	AF480590, Y08857
Z40	472	<i>M. boenickei</i> ATCC 49935 <sup>T</sup> / <i>M. porcinum</i> CIP 105392 <sup>T</sup> / <i>M. conceptionense</i> CIP 108544 <sup>T</sup> / <i>M. neworleansense</i> ATCC 49404 <sup>T</sup>	100,0	AY012573, AY457077, AY859684, AY457068
Z41	472	<i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup> / <i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup>	100,0	AJ746070, JMDW01000030
Z42	473	<i>M. chitae</i> ATCC 19627 <sup>T</sup>	98,7	X55603
Z43	472	<i>M. smegmatis</i> ATCC 19420 <sup>T</sup>	99,8	AJ131761



Tabla S3. Continuación.

Clon	Longitud (pb)	Especie tipo más próxima	Similitud (%)	N° acceso
Z44	472	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	98,9	AY457072, AY457080, HQ153090
Z45	472	<i>M. boenickei</i> ATCC 49935 <sup>T</sup> / <i>M. porcinum</i> CIP 105392 <sup>T</sup> / <i>M. conceptionense</i> CIP 108544 <sup>T</sup> / <i>M. neworleansense</i> ATCC 49404 <sup>T</sup>	100,0	AY012573, AY457077, AY859684, AY457068
Z46	472	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> / <i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup>	99,8	JMDW01000030, AJ746070
Z47	472	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> / <i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup>	100,0	JMDW01000030, AJ746070
Z48	472	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> / <i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup>	100,0	JMDW01000030, AJ746070
Z49	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,2	CU458896, AHS01000006
Z50	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z51	473	<i>M. smegmatis</i> ATCC 19420 <sup>T</sup>	99,6	AJ131761
Z52	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z53	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z54	473	<i>M. chelonae</i> CIP 104535 <sup>T</sup> / <i>M. immunogenum</i> CIP 106684 <sup>T</sup> / <i>M. franklinii</i> CV002 <sup>T</sup>	99,4	AY457072, AY457080, HQ153090
Z55	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,8	CU458896, AHS01000006
Z56	472	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,8	CU458896, AHS01000006
Z58	472	<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795 <sup>T</sup> / <i>M. llatzerense</i> MG13 <sup>T</sup>	99,8	JMDW01000030, AJ746070
Z59	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,2	CU458896, AHS01000006
Z60	472	<i>M. tokaiense</i> ATCC 27282 <sup>T</sup> / <i>M. murale</i> MA-112/96 <sup>T</sup>	99,4	AF480590, Y08857
Z61	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	100,0	CU458896, AHS01000006
Z62	473	<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i> ATCC 19977 <sup>T</sup> / <i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> BD <sup>T</sup>	99,8	CU458896, AHS01000006



Table S4. Continuación.

22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200																																																																													
M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40	M41	M42	M43	M44	M45	M46	M47	M48	M49	M50	M51	M52	M53	M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	M61	M62	M63	M64	M65	M66	M67	M68	M69	M70	M71	M72	M73	M74	M75	M76	M77	M78	M79	M80	M81	M82	M83	M84	M85	M86	M87	M88	M89	M90	M91	M92	M93	M94	M95	M96	M97	M98	M99	M100	M101	M102	M103	M104	M105	M106	M107	M108	M109	M110	M111	M112	M113	M114	M115	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M122	M123	M124	M125	M126	M127	M128	M129	M130	M131	M132	M133	M134	M135	M136	M137	M138	M139	M140	M141	M142	M143	M144	M145	M146	M147	M148	M149	M150	M151	M152	M153	M154	M155	M156	M157	M158	M159	M160	M161	M162	M163	M164	M165	M166	M167	M168	M169	M170	M171	M172	M173	M174	M175	M176	M177	M178	M179	M180	M181	M182	M183	M184	M185	M186	M187	M188	M189	M190	M191	M192	M193	M194	M195	M196	M197	M198	M199	M200																																																																		
945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200
M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40	M41	M42	M43	M44	M45	M46	M47	M48	M49	M50	M51	M52	M53	M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	M61	M62	M63	M64	M65	M66	M67	M68	M69	M70	M71	M72	M73	M74	M75	M76	M77	M78	M79	M80	M81	M82	M83	M84	M85	M86	M87	M88	M89	M90	M91	M92	M93	M94	M95	M96	M97	M98	M99	M100	M101	M102	M103	M104	M105	M106	M107	M108	M109	M110	M111	M112	M113	M114	M115	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M122	M123	M124	M125	M126	M127	M128	M129	M130	M131	M132	M133	M134	M135	M136	M137	M138	M139	M140	M141	M142	M143	M144	M145	M146	M147	M148	M149	M150	M151	M152	M153	M154	M155	M156	M157	M158	M159	M160	M161	M162	M163	M164	M165	M166	M167	M168	M169	M170	M171	M172	M173	M174	M175	M176	M177	M178	M179	M180	M181	M182	M183	M184	M185	M186	M187	M188	M189	M190	M191	M192	M193	M194	M195	M196	M197	M198	M199	M200																																																																		
M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40	M41	M42	M43	M44	M45	M46	M47	M48	M49	M50	M51	M52	M53	M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	M61	M62	M63	M64	M65	M66	M67	M68	M69	M70	M71	M72	M73	M74	M75	M76	M77	M78	M79	M80	M81	M82	M83	M84	M85	M86	M87	M88	M89	M90	M91	M92	M93	M94	M95	M96	M97	M98	M99	M100	M101	M102	M103	M104	M105	M106	M107	M108	M109	M110	M111	M112	M113	M114	M115	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M122	M123	M124	M125	M126	M127	M128	M129	M130	M131	M132	M133	M134	M135	M136	M137	M138	M139	M140	M141	M142	M143	M144	M145	M146	M147	M148	M149	M150	M151	M152	M153	M154	M155	M156	M157	M158	M159	M160	M161	M162	M163	M164	M165	M166	M167	M168	M169	M170	M171	M172	M173	M174	M175	M176	M177	M178	M179	M180	M181	M182	M183	M184	M185	M186	M187	M188	M189	M190	M191	M192	M193	M194	M195	M196	M197	M198	M199	M200																																																																		
M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40	M41	M42	M43	M44	M45	M46	M47	M48	M49	M50	M51	M52	M53	M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	M61	M62	M63	M64	M65	M66	M67	M68	M69	M70	M71	M72	M73	M74	M75	M76	M77	M78	M79	M80	M81	M82	M83	M84	M85	M86	M87	M88	M89	M90	M91	M92	M93	M94	M95	M96	M97	M98	M99	M100	M101	M102	M103	M104	M105	M106	M107	M108	M109	M110	M111	M112	M113	M114	M115	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M122	M123	M124	M125	M126	M127	M128	M129	M130	M131	M132	M133	M134	M135	M136	M137	M138	M139	M140	M141	M142	M143	M144	M145	M146	M147	M148	M149	M150	M151	M152	M153	M154	M155	M156	M157	M158	M159	M160	M161	M162	M163	M164	M165	M166	M167	M168	M169	M170	M171	M172	M173	M174	M175	M176	M177	M178	M179	M180	M181	M182	M183	M184	M185	M186	M187	M188	M189	M190	M191	M192	M193	M194	M195	M196	M197	M198	M199	M200																																																																		

























Tabla 58. Continuación.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40	M41	M42	M43	M44	M45	M46	M47	M48	M49	M50	M51	M52	M53	M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	M61	M62	M63	M64	M65	M66	M67	M68	M69	M70	M71	M72	M73	M74	M75	M76	M77	M78	M79	M80	M81	M82	M83	M84	M85	M86	M87	M88	M89	M90	M91	M92	M93	M94	M95	M96	M97	M98	M99	M100	M101	M102	M103	M104	M105	M106	M107	M108	M109	M110	M111	M112	M113	M114	M115	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M122	M123	M124	M125	M126	M127	M128	M129	M130	M131	M132	M133	M134	M135	M136	M137	M138	M139	M140	M141	M142	M143	M144	M145	M146	M147	M148	M149	M150	M151	M152	M153	M154	M155	M156	M157	M158	M159	M160	M161	M162	M163	M164	M165	M166	M167	M168	M169	M170	M171	M172	M173	M174	M175	M176	M177	M178	M179	M180	M181	M182	M183	M184	M185	M186	M187	M188	M189	M190	M191	M192	M193	M194	M195	M196	M197	M198	M199	M200	M201	M202	M203	M204	M205	M206	M207	M208	M209	M210	M211	M212	M213	M214	M215	M216	M217	M218	M219	M220	M221	M222	M223	M224	M225	M226	M227	M228	M229	M230	M231	M232	M233	M234	M235	M236	M237	M238	M239	M240	M241	M242	M243	M244	M245	M246	M247	M248	M249	M250	M251	M252	M253	M254	M255	M256	M257	M258	M259	M260	M261	M262	M263	M264	M265	M266	M267	M268	M269	M270	M271	M272	M273	M274	M275	M276	M277	M278	M279	M280	M281	M282	M283	M284	M285	M286	M287	M288	M289	M290	M291	M292	M293	M294	M295	M296	M297	M298	M299	M300	M301	M302	M303	M304	M305	M306	M307	M308	M309	M310	M311	M312	M313	M314	M315	M316	M317	M318	M319	M320	M321	M322	M323	M324	M325	M326	M327	M328	M329	M330	M331	M332	M333	M334	M335	M336	M337	M338	M339	M340	M341	M342	M343	M344	M345	M346	M347	M348	M349	M350	M351	M352	M353	M354	M355	M356	M357	M358	M359	M360	M361	M362	M363	M364	M365	M366	M367	M368	M369	M370	M371	M372	M373	M374	M375	M376	M377	M378	M379	M380	M381	M382	M383	M384	M385	M386	M387	M388	M389	M390	M391	M392	M393	M394	M395	M396	M397	M398	M399	M400	M401	M402	M403	M404	M405	M406	M407	M408	M409	M410	M411	M412	M413	M414	M415	M416	M417	M418	M419	M420	M421	M422	M423	M424	M425	M426	M427	M428	M429	M430	M431	M432	M433	M434	M435	M436	M437	M438	M439	M440	M441	M442	M443	M444	M445	M446	M447	M448	M449	M450	M451	M452	M453	M454	M455	M456	M457	M458	M459	M460	M461	M462	M463	M464	M465	M466	M467	M468	M469	M470	M471	M472	M473	M474	M475	M476	M477	M478	M479	M480	M481	M482	M483	M484	M485	M486	M487	M488	M489	M490	M491	M492	M493	M494	M495	M496	M497	M498	M499	M500	M501	M502	M503	M504	M505	M506	M507	M508	M509	M510	M511	M512	M513	M514	M515	M516	M517	M518	M519	M520	M521	M522	M523	M524	M525	M526	M527	M528	M529	M530	M531	M532	M533	M534	M535	M536	M537	M538	M539	M540	M541	M542	M543	M544	M545	M546	M547	M548	M549	M550	M551	M552	M553	M554	M555	M556	M557	M558	M559	M560	M561	M562	M563	M564	M565	M566	M567	M568	M569	M570	M571	M572	M573	M574	M575	M576	M577	M578	M579	M580	M581	M582	M583	M584	M585	M586	M587	M588	M589	M590	M591	M592	M593	M594	M595	M596	M597	M598	M599	M600	M601	M602	M603	M604	M605	M606	M607	M608	M609	M610	M611	M612	M613	M614	M615	M616	M617	M618	M619	M620	M621	M622	M623	M624	M625	M626	M627	M628	M629	M630	M631	M632	M633	M634	M635	M636	M637	M638	M639	M640	M641	M642	M643	M644	M645	M646	M647	M648	M649	M650	M651	M652	M653	M654	M655	M656	M657	M658	M659	M660	M661	M662	M663	M664	M665	M666	M667	M668	M669	M670	M671	M672	M673	M674	M675	M676	M677	M678	M679	M680	M681	M682	M683	M684	M685	M686	M687	M688	M689	M690	M691	M692	M693	M694	M695	M696	M697	M698	M699	M700	M701	M702	M703	M704	M705	M706	M707	M708	M709	M710	M711	M712	M713	M714	M715	M716	M717	M718	M719	M720	M721	M722	M723	M724	M725	M726	M727	M728	M729	M730	M731	M732	M733	M734	M735	M736	M737	M738	M739	M740	M741	M742	M743	M744	M745	M746	M747	M748	M749	M750	M751	M752	M753	M754	M755	M756	M757	M758	M759	M760	M761	M762	M763	M764	M765	M766	M767	M768	M769	M770	M771	M772	M773	M774	M775	M776	M777	M778	M779	M780	M781	M782	M783	M784	M785	M786	M787	M788	M789	M790	M791	M792	M793	M794	M795	M796	M797	M798	M799	M800	M801	M802	M803	M804	M805	M806	M807	M808	M809	M810	M811	M812	M813	M814	M815	M816	M817	M818	M819	M820	M821	M822	M823	M824	M825	M826	M827	M828	M829	M830	M831	M832	M833	M834	M835	M836	M837	M838	M839	M840	M841	M842	M843	M844	M845	M846	M847	M848	M849	M850	M851	M852	M853	M854	M855	M856	M857	M858	M859	M860	M861	M862	M863	M864	M865	M866	M867	M868	M869	M870	M871	M872	M873	M874	M875	M876	M877	M878	M879	M880	M881	M882	M883	M884	M885	M886	M887	M888	M889	M890	M891	M892	M893	M894	M895	M896	M897	M898	M899	M900	M901	M902	M903	M904	M905	M906	M907	M908	M909	M910	M911	M912	M913	M914	M915	M916	M917	M918	M919	M920	M921	M922	M923	M924	M925	M926	M927	M928	M929	M930	M931	M932	M933	M934	M935	M936	M937	M938	M939	M940	M941	M942	M943	M944	M945	M946	M947	M948	M949	M950	M951	M952	M953	M954	M955	M956	M957	M958	M959	M960	M961	M962	M963	M964	M965	M966	M967	M968	M969	M970	M971	M972	M973	M974	M975	M976	M977	M978	M979	M980	M981	M982	M983	M984	M985	M986	M987	M988	M989	M990	M991	M992	M993	M994	M995	M996	M997	M998	M999	M1000
M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40	M41	M42	M43	M44	M45	M46	M47	M48	M49	M50	M51	M52	M53	M54	M55	M56	M57	M58	M59	M60	M61	M62	M63	M64	M65	M66	M67	M68	M69	M70	M71	M72	M73	M74	M75	M76	M77	M78	M79	M80	M81	M82	M83	M84	M85	M86	M87	M88	M89	M90	M91	M92	M93	M94	M95	M96	M97	M98	M99	M100	M101	M102	M103	M104	M105	M106	M107	M108	M109	M110	M111	M112	M113	M114	M115	M116	M117	M118	M119	M120	M121	M122	M123	M124	M125	M126	M127	M128	M129	M130	M131	M132	M133	M134	M135	M136	M137	M138	M139	M140	M141	M142	M143	M144	M145	M146	M147	M148	M149	M150	M151	M152	M153	M154	M155	M156	M157	M158	M159	M160	M161	M162	M163	M164	M165	M166	M167	M168	M169	M170	M171	M172	M173	M174	M175	M176	M177	M178	M179	M180	M181	M182	M183	M184	M185	M186	M187	M188	M189	M190	M191	M192	M193	M194	M195	M196	M197	M198	M199	M200	M201	M202	M203	M204	M205	M206	M207	M208	M209	M210	M211	M212	M213	M214	M215	M216	M217	M218	M219	M220	M221	M222	M223	M224	M225	M226	M227	M228	M229	M230	M231	M232	M233	M234	M235	M236	M237	M238	M239	M240	M241	M242	M243	M244	M245	M246	M247	M248	M249	M250	M251	M252	M253	M254	M255	M256	M257	M258	M259	M260	M261	M262	M263	M264	M265	M266	M267	M268	M269	M270	M271	M272	M273	M274	M275	M276	M277	M278	M279	M280	M281	M282	M283	M284	M285	M286	M287	M288	M289	M290	M291	M292	M293	M294	M295	M296	M297	M298	M299	M300	M301	M302	M303	M304	M305	M306	M307	M308	M309	M310	M311	M312	M313	M314	M315	M316	M317	M318	M319	M320	M321	M322	M323	M324	M325	M326	M327	M328	M329	M330	M331	M332	M333	M334	M335	M336	M337	M338	M339	M340	M341	M342	M343	M344	M345	M346	M347	M348	M349	M350	M351	M352	M353	M354	M355	M356	M357	M358	M359	M360	M361	M362	M363	M364	M365	M366	M367	M368	M369	M370	M371	M372	M373	M374	M375	M376	M377	M378	M379	M380	M381	M382	M383	M384	M385	M386	M387	M388																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					



























CONTRIBUCIONES DE LA AUTORA

---



## Publicaciones o Documentos Científico-Técnicos

(Publicaciones en revistas)

Gomila, M., Solís, J.J., David, Z., Ramon, C. y Lalucat, J. 2008. Comparative reductions of bacterial indicators, bacteriophage-infecting enteric bacteria and enteroviruses in wastewater tertiary treatments by lagooning and UV-radiation. *Water Science and Technology* **58**(11), 2223-2233.

Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J., y García-Valdés, E. 2011. *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(3), 1076-1085.

Sánchez, D., Mulet, M., Rodríguez, A.C., David, Z., Lalucat, J., y García-Valdés, E. 2014. *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill. *Systematic and Applied Microbiology* **37**(2), 89-94.

## Contribuciones a Congresos

García-Valdés, E., David, Z., Mulet, M., Cladera, A., Mayol, J., y Lalucat, J. 2005. Hydrocarbon-degrading marine bacteria relevant in the nitrogen cycle. Póster. VERTIMAR-2005. Symposium for monitoring of accidental spills in the marine environment. Vigo (ESPAÑA).

Gomila, M., David, Z., Prince, C.S., Gascó, J., y Lalucat, J. 2009. Comunidades microbianas en el agua de hemodiálisis. Póster. XXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología. Almería (ESPAÑA).



## Comparative reductions of bacterial indicators, bacteriophage-infecting enteric bacteria and enteroviruses in wastewater tertiary treatments by lagooning and UV-radiation

Margarita Gomila, Javier J. Solis, Zoyla David, Cristina Ramon and Jorge Lalucat

### ABSTRACT

A two-year monitoring program of microbiological and physical–chemical parameters at 2 waste water treatment plants (WWTPs) in Mallorca (Spain) was performed in order to (1) evaluate the efficiency of lagooning and UV radiation as tertiary treatment processes; (2) determine the characteristics of wastewater effluent for its potential agricultural reuse; and (3) establish correlations between bacteriological and virological parameters. The presence of currently established bacterial indicators (total coliforms, faecal coliforms, *Escherichia coli*, enterococci, and spores of sulphite-reducing clostridia), virological (enteroviruses, somatic coliphages, F-specific coliphages, and phages infecting *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*), and helminth eggs were tested during this study. Bacterial and viral indicators were removed at least with one log reduction in the lagooning system, and to a lesser extent with UV-radiation treatment. The lagooning system was less efficient in removing phages and viruses than were bacterial indicators, with the exception of F-specific phages. Phages of *B. fragilis* and *B. thetaiotaomicron* were less removed than all of the other microbiological parameters. In the UV-radiation treatment, however, the faecal coliforms proved the most sensitive, while clostridial spores, somatic coliphages, *Bacteroides* phages, and enteric viruses were the more resistant. Helminth eggs were not detected in any samples from effluents of either the secondary or tertiary treatments.

Indicator levels in both treatments met the established regulations of both local and national authorities for the disposal or reuse of wastewater in irrigation for non-human crop. We demonstrate that somatic coliphages are effective indicators of enteric viruses in both of the WWTPs studied.

**Key words** | enteric viruses, lagooning, microbiological parameters, physical–chemical parameters, UV radiation system, wastewater treatment plants

### INTRODUCTION

Tertiary treatments are needed before regenerated water is used in irrigation or prior to the environmental disposal of wastewater if pathogen dispersal is to be prevented. Inadequately treated wastewater is the main source of pathogens in both surface and subsurface waters. The growing demand for water, especially in areas facing

shortages, means that more and more reclaimed water is being used for irrigation and subsurface water regeneration. The use of regenerated waters requires the establishment of rules and a strict legislation to guarantee the health protection and to decrease the health risk to an acceptable level. In this sense there are two reference rules: the guidelines of the World Health Organization (WHO 2006) and the California Code of Regulations (2000), more strict

Margarita Gomila  
Javier J. Solis  
Zoyla David  
Cristina Ramon  
Jorge Lalucat (corresponding author)  
Àrea Microbiologia, Departament de Biologia,  
Universitat de les Illes Balears, and Institut  
Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB),  
07122 Palma de Mallorca, Illes Balears,  
Spain

Javier J. Solis  
E.D.A.S. Racons, Ctra. Nacional 332 km 204–205,  
03779 El Molinell (El Verger), Alicante,  
Spain

Jorge Lalucat (corresponding author)  
Facultad de Ciencias, Campus UIB,  
Crtra. Valldemosa km 7.5,  
07122 Palma de Mallorca,  
Balears,  
Spain  
E-mail: [jlalucat@uib.es](mailto:jlalucat@uib.es)

than the other one. In Spain, the standing rule was published on the 7<sup>th</sup> of December 2007 (Real Decreto RD1620/2007). Although regulations determine the acceptable pathogen levels for these purposes, correlations between the different types of indicators or waterborne pathogens often prove quite low. In addition, standards may vary from one geographical region or regulatory agency to the next.

In order to minimize the public health risks associated with exposure to reclaimed water, the main aim of reclamation water treatments is to reduce the pathogen load. To do that, several disinfection processes can be applied; e.g. disinfection agents, as chlorination or peracetic acid, UV light, or lagooning. In the last years some studies try to establish which disinfection processes or combinations of them provide better quality reclaimed water (Lucena *et al.* 2004; Alonso *et al.* 2005; Hijnen *et al.* 2006; Zanetti *et al.* 2007; Montemayor *et al.* 2008).

The effectiveness of pathogen removal in wastewater treatments is assessed by routinely monitoring the final effluent for standard bacterial indicators. For decades, the faecal coliform group of bacteria has been used as an indicator of water quality, detecting the presence of pathogens harmful to humans. However, the resistance of various pathogenic microorganisms depends on many factors, including water treatment. Viruses, as well as some parasites are now known to be more resistant to water treatment than are the bacterial indicators currently used to determine water quality (Payment *et al.* 1985, Payment 1991, Payment & Franco 1993). Therefore more effective indicators are needed for the assessment of water treatment processes. Potentially better new indicators include somatic coliphages, F-specific bacteriophages, and phages infecting *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Hilton & Stotzky 1973; Wentsel *et al.* 1982; Havelaar & Hogeboom 1984; IAWPRC 1991; Jofre *et al.* 1995; Lasobras *et al.* 1999; Grabow 2001).

The aims of the present study were to investigate variations in the occurrence and elimination of various bacterial indicators, bacteriophages of enteric bacteria, enteroviruses, and helminth eggs in two different wastewater treatment plants (WWTPs) involving two different tertiary systems, namely lagooning (B) and ultraviolet light radiation (S). In parallel, basic physical and chemical

parameters were monitored. Secondary and tertiary effluents were evaluated during different seasons (autumn, spring, summer, and winter) over a two-year period. The efficiency of removal treatments and correlations between parameters were also determined during this period. We attempt to establish which disinfection processes (UV light and lagooning) provides better quality reclaimed water.

## METHODS

### Wastewater treatment plants studied

While the two WWTPs studied process both domestic and industrial wastewater, the latter constitutes only a fraction of their load-bearing capacity. The S plant is designed for a population equivalent of 16,000 inhabitants, the B plant for 5,000. The capacity of daily treated water is 6,250 m<sup>3</sup> and 1,000 m<sup>3</sup>, respectively. In both plants an aerobic digest and activated sludge treatment are utilized in the secondary treatment. The removal of pathogens found in the effluent of secondary treatment is accomplished via ultraviolet radiation (Trojan UV3000B, 4 banks of 8 lamps of 87.5W each) at the S plant (flowing in a laminar way) and through an aerobic lagooning system at B plant. Lagoons are less than 2 meters in depth and the residence time in the lagoons is estimated to be approximately 60 days. In both cases, part of the plant effluent is reclaimed for crop and fruit tree irrigation, and some is discharged to the sea through a marine emissary (S plant) or filtered in a torrent (B plant).

### Sampling programme

12 litres of water for each sample were collected from the effluent points of secondary and tertiary treatments, from April 2003 until February 2005. Eight sampling programmes were carried out over five successive days during each season (April, July, September, and November 2003; March, August, and November 2004; and February 2005). Samples were labelled B (lagooning) or S (UV system), and numbers 2 and 3 indicated secondary or tertiary treatments, respectively. Eighty wastewater samples from each plant were collected in sterile containers, transported to the



laboratory within 2 h of collection, and processed immediately.

All bacterial indicators were determined from serial dilutions, as were somatic and F-specific phages. *Bacteroides* phages were determined from serial dilutions in concentrates of 50 to 500 mL, depending on the sample load. Enteroviruses were determined in a concentrate of 500 mL for secondary treatment effluents and 1 L for tertiary treatment effluents. The presence or absence of helminth eggs was detected in a 1 L sample of secondary treatment effluent and from a 10 L sample of the tertiary treatment effluent. 500 mL samples were used to determine physical and chemical parameters.

### Bacteriological analysis

Bacteria were counted using the membrane filter method (0.45 µm pore; mixed esters of cellulose filters, S-PAK™, Millipore) for total coliforms (TC), faecal coliforms (FC), and enterococci (FE), on ENDO agar, mFC agar, m*Enterococcus* agar, and Bile Aesculine agar, according to the American Public Health Association *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA 1998). Plates were incubated at 37°C in all cases, except for the FC and FE that were incubated at 44°C. *Escherichia coli* counts were determined by membrane filtration followed by incubation on Chromocult agar (Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C. Spores of sulphite-reducing clostridia (SRC) were counted in serial dilutions, depending on the sample, on SPS agar at 42°C as described by Bufton (Bufton 1959).

### Bacteriophage analysis

Bacteriophages were counted via the double-agar-layer technique by using the ISO 10705-2 standard for enumeration of somatic coliphages (ISO 10705-2 2000), the ISO 10705-1 standard for enumeration of F-specific RNA bacteriophages (ISO 10705-1 1995), and the ISO 10705-4 standard for enumeration of bacteriophages infecting *B. fragilis* (ISO 10705-4 2001). *E. coli* WG5 grown on modified Scholten's broth was used as the host strain for quantification of somatic coliphages. *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* WG49 grown on tryptone-yeast

extract-glucose broth was used as the host strain for F-specific bacteriophages. *B. fragilis* RYC2056 and *B. thetaiotaomicron* GA17 grown on *Bacteroides* phage recovery medium broth were used as the host strains for the quantification of *Bacteroides* bacteriophages.

To assess the quality of our analysis, reference bacteriophages were used as an internal control. Bacteriophage ΦX174 (ATCC 13706-B1), which belongs to the family *Microviridae*, was used as the reference bacteriophage for somatic coliphages (ISO 10705-2 2000). Bacteriophage MS2 (ATCC 15597-B1), which belongs to the family *Leviviridae*, was used as the reference bacteriophage for F-specific RNA bacteriophages (ISO 10705-1 1995), and bacteriophage B56-3 was used as the reference bacteriophage for phages infecting *B. fragilis* RYC2056.

If needed, bacteriophages were concentrated by the method described in Méndez *et al.* (2004), which is a modification of a previously described membrane filtration–elution method for phage concentrations (Sobsey *et al.* 1990; Sinton *et al.* 1996). Briefly, this process was carried out as follows: MgCl<sub>2</sub> was added to the water sample to a final concentration 0.05 M. The sample was then filtered through a negatively charged cellulose ester membrane with a 0.22 µm pore size and 47 mm diameter (Millex®-GS; Millipore Corp., Bedford, MA, USA). The membrane filter was cut into eight fragments and placed in a glass flask containing 5 mL of eluting solution (1% beef extract, 0.5 M NaCl, and 3% Tween 80). The flask was then placed in an ultrasound cleaning bath for 3 min. The eluted bacteriophages were titrated via the double-layer agar method.

### Enterovirus analysis and helminth egg detection

We attempted to detect enteroviruses and helminth eggs on two days in each weekly sampling programme, generally on Mondays and Fridays. Thirteen samples were tested for each point (S2, S3, B2 and B3).

For enteric virus enumeration, 500 mL and 1 L of water from the secondary and tertiary effluents, respectively, were concentrated by organic flocculation. They were then quantified via plaque formation by inoculating cell monolayers of a BGM (Buffalo green monkey) kidney continuous cell line (European Collection of Animal Cell

Cultures, accession no. 90092601), as previously described (Mocé-Llivina *et al.* 2004). Briefly, waste water samples were concentrated by organic flocculation (Katzenelson *et al.* 1976), with yeast extract added to a final concentration of 3%, and the pH adjusted to 3.5 with HCl 1N. Samples were centrifuged and then decontaminated by filtration through low-protein binding polyether sulfone (PES) membrane filters (0.22  $\mu\text{m}$  pore size; Millex<sup>®</sup>-GP; Millipore Corp., Bedford, MA). The resulting sediment was resuspended with PBS 1X. Virus suspension was quantified via the double-layer method: 2 mL of virus suspension was placed in sterile tubes, with 260  $\mu\text{L}$  of BGM cell suspension added to each tube. Two millilitres of 2X Eagle's minimum essential medium (MEM) containing gentamicin, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , nystatin, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and ceftazidime, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was then added to each tube. Finally, 2 mL of 2% molten agar and kept at 55°C was added. After mixing, the cell growth medium was discarded and the tube content was immediately poured onto a prepared confluent monolayer in a 90-mm diameter Petri dish. The plates were then incubated right side up at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> at a relative humidity of more than 80% for 96 h. The agar was subsequently removed, and the monolayer was stained with 0.1% crystal violet as was done in the monolayer assay.

Helminth eggs were detected using the procedures described by the World Health Organization (Ayres & Mara 1996). The wastewater sample was allowed to settle for one or two hours, and 90% of the supernatant was removed with a suction pump. The sediment was then carefully transferred to centrifuge tubes and spun (1,000  $\times g$  for 15 min). The pellet was resuspended in an equal volume of acetoacetic buffer, pH 4.5, along with two volumes of ethyl acetate, mixed and centrifuged. Finally, the pellet was resuspended in five volumes of zinc sulphate solution. An aliquot was transferred to a McMaster slide for final examination under a light microscope.

### Physical–chemical analysis of the effluents

Several physical and chemical parameters were determined to characterize the system: conductivity, salinity, pH, suspended solids, turbidity, transmittance at 256 nm, chemical oxygen demand (COD), chloride and total

alkalinity, nitrites, nitrates, phosphates, and sulphates. Temperature was measured at the time of sampling. The pH was determined using a Crison micropH 2001 with a temperature-compensatory system. Conductivity and salinity were measured with a conductivity meter at 20°C (WTW, Wissenschaftlich Technische Werkstätten; LF 196), and turbidity was measured with a Hach 2100P Turbiditymeter. All procedures were performed in accordance with *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA 1998).

### Data processing and statistical analysis

To conduct statistical analysis, the physical and chemical parameters and the following variables were converted using the  $\log_{10}(N + 1)$  function: total and faecal coliforms, *E. coli*, enterococci, somatic coliphages, F-specific phages, and bacteriophages infecting *B. fragilis* RYC and *B. thetaiotaomicron* GA17. Values that fell below the detection level of the method were not considered significant. All statistical tests were carried out using the statistical package for social science (SPSS version 14.0). Log<sub>10</sub>-transformed values were used for all computations and tests and data were plotted as boxes and whiskers. This plot provided summary statistics for five values: the minimum, the maximum, the median, the 25th percentile, and the 75th percentile. Pearson's correlations were determined and differences were considered significant at  $P < 0.05$ . Log<sub>10</sub> reduction values were calculated as follows:  $\log_{10}N_t - \log_{10}N_0$ , where  $N_t$  is the value for the effluent from the tertiary treatment and  $N_0$  is the value of the effluent from the secondary treatment.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physical–chemical parameters

Table 1 summarizes the mean, minimum and maximum values, as well as the dispersion of these values, for the physical and chemical parameters determined during the course of our two-year study. The effluent parameters for both secondary treatments (B2 and S2) were of the same order of magnitude. However, differences were detected in

**Table 1** | Physical–chemical characteristics of the wastewater in both WWTPs studied

	B2 <sup>a</sup>		B3 <sup>a</sup>		S2 <sup>b</sup>		S3 <sup>b</sup>	
	Mean + SE <sup>†</sup>	Min–Max <sup>‡</sup>	Mean + SE <sup>†</sup>	Min–Max <sup>‡</sup>	Mean + SE <sup>†,§</sup>	Min–Max <sup>‡</sup>	Mean + SE <sup>†,§</sup>	Min–Max <sup>‡</sup>
Conductivity (mS/cm)	8.8 ± 1.4	6.04–11.9	7.1 ± 1.5	3.81–9.1	8.2 ± 0.2 (7.9 ± 0.8)	5.8–11.7	8.3 ± 0.3 (7.9 ± 0.8)	5.8–12
Salinity	0	0	0	0	0	0	0	0
Temperature (°C)	21.1 ± 4.8	12–29.7	21.0 ± 4.9	12.6–28.9	21.4 ± 0.6 (21.9 ± 1.4)	14.5–28.8	21.9 ± 0.7 (22.3 ± 1.5)	15.1–28.7
pH	7.7 ± 0.2	7.02–8.2	8.3 ± 0.5	7.0–9.1	7.7 ± 0.03 (7.7 ± 0.1)	7–8	7.7 ± 0.03 (7.7 ± 0.1)	7–8.1
Turbidity (NTU)	63.7 ± 22.5	2.41–81	20.0 ± 3.5	5.5–123.5	25.8 ± 5.7 (22.1 ± 15.3)	3.8–128.7	38 ± 9.3 (20.5 ± 14.5)	3.8–210.5
Suspended solids (mg/L)	108.7 ± 31.0	4.5–1,046.1	115 ± 36.7	2.0–1,029.9	80.4 ± 35.9 (38.2 ± 18.8)	3.9–1,585.2	263.1 ± 201.8 (38.3 ± 20.1)	7.7–6,702.8
Transmittance at 256 nm	50.1 ± 3.3	0.7–91.6	56.2 ± 1.8	35.1–87.7	48.7 ± 2.9 (50.3 ± 7.1)	13.5–87	44 ± 3.2 (48.4 ± 6.4)	12.9–74.2
Total alkalinity (mg/L)	312.9 ± 23.1	30.5–648	279.9 ± 24.7	25.1–648	314.4 ± 26.6 (190.7 ± 52.6)	35.2–792	328.0 ± 27.7 (202.3 ± 63.6)	94–576
Chloride (mg/L)	148.8 ± 10	2–367.9	138.9 ± 9.9	1.8–376.58	170.3 ± 8.0 (178.2 ± 9.9)	2.9–283.6	166.8 ± 6.0 (172.8 ± 13.4)	123.1–248.2
Nitrites (mg/L)	0.2 ± 0.04	0–0.8	0.08 ± 0.01	0–0.5	0.3 ± 0.05 (0.4 ± 0.1)	0–0.9	0.31 ± 0.06 (0.4 ± 0.1)	0–1.1
Nitrates (mg/L)	8.1 ± 2.6	0–60.2	7.0 ± 2.6	0–81.2	18.9 ± 9.2 (1.0 ± 0.6)	0–331.3	18.9 ± 11.0 (1.1 ± 0.6)	0–345.0
Phosphates (mg/L)	35.7 ± 3.7	2.4–90.4	28.9 ± 2.6	9.5–58.3	28.2 ± 4.1 (20.4 ± 9.8)	0.4–85.2	32.2 ± 4.8 (21.7 ± 11.8)	1.2–91.7
Sulphates (mg/L)	2,360.8 ± 171.8	847.9–5,669	2,076.1 ± 132.9	849.2–4,693.0	1,990.5 ± 170.1 (2,130.8 ± 316.8)	71.5–6,519.9	2,023.7 ± 132.3 (1,974.1 ± 196.4)	821.4–4,761.5
COD (mg/L)	214.9 ± 59.4	0–2,140.3	213.9 ± 62.2	0–2,260.3	221.3 ± 67.5 (61.9 ± 8.3)	20–2,522.5	160.2 ± 73.2 (50.0 ± 6.4)	22.5–2,396.8

<sup>a</sup>B(WWTP B), S (WWTP S), 2 and 3, secondary and tertiary effluent, respectively.<sup>†</sup>Arithmetic mean of all the values and standard error.<sup>‡</sup>Range from minimum to maximum.<sup>§</sup>In brackets, geometric mean of the values that have more than 1 ulog of reduction for faecal coliforms.

the effluents from the tertiary treatments. In the lagooning system (B3), the chemical parameters were lower than in the UV-treatment (S3):  $\text{Cl}^-$  16%,  $\text{NO}_2^-$  75%,  $\text{NO}_3^-$  62% and  $\text{PO}_4^{3-}$  11%. In the S plant, the values of certain physical parameters such as turbidity (18 of 33), transmittance at 256 nm (13 of 33), and suspended solids (19 of 33) were higher in the tertiary than in the secondary effluents. Conductivity, temperature, and phosphates were the only parameters with no outliers in the statistical analysis. The other parameters showed 1 to 5 outliers from the samples analyzed (data not shown). Failed values were attributed to anomalies in the treatment process (discharges from an alternative sedimentation tank, or to unusual incidence of rain).

### Microbiological parameters

As shown in Table 2, secondary effluents follow the same pattern as was observed in the physical–chemical parameters; values for secondary effluents in both WWTPs were of the same order of magnitude, except for F-specific phages and those infecting *B. fragilis* RYC2056. However, values were lower in the WWTP B than in the S. Differences were detected in the effluents from the tertiary treatment; values were at least one order of magnitude lower in plant B. In some cases, values for *Escherichia coli* were higher than those for faecal coliforms, reflecting the different methodologies used to measure these two parameters; i.e., more sensitive for *Escherichia coli* determinations. As in the physical–chemical parameters there are high oscillations between minimal and maximal values for all parameters, due some values (less than 10%) are out of normal range. These are more frequent in the WWTP S. In some samples, values for enteric viruses, as well as for *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* and F-specific phages, were below the detection limit of the method. Somatic coliphages were detected at higher levels than the other phage groups tested, while the numbers of phages infecting the two strains of *Bacteroides* proved similar in both WWTPs.

Helminth eggs were not found in any sample. A survey of their presence in the influents and effluents of secondary treatments from Mallorca's 20 WWTPs was conducted simultaneously with the present study. In no sample were

eggs containing pathogens harmful to humans detected (data not shown).

### Removal of indicators

Table 3 shows the mean values of  $\log_{10}$  reductions for bacterial indicators, bacteriophages, and enteric viruses from the tertiary treatments at both WWTPs. In the lagooning system, bacterial and viral indicators were eliminated by at least one order of magnitude, and to a lesser extent (between 30 and 60% mean removal) with UV-radiation. Acceptable removals in the UV-treatment were only achieved in six samples distributed over the two-year period. Log reductions were recalculated considering only those values in which faecal coliform reductions were higher than 1 log unit as an indication of the well treatment (indicated in parenthesis in Table 3). In these cases, all reductions were higher, excepting somatic coliphages. Physical and chemical values were recalculated for the same samples, supporting our contention that the depuration process was efficient in those samplings (values in brackets in Table 1).

In the lagooning system, phages and viruses were generally more resistant to the treatment process than were bacterial indicators, with the exception of F-specific phages. Phages of *Bacteroides* and enteric viruses were more resistant than all of the other microbiological parameters. With UV-radiation treatment, however, the faecal coliforms were the most sensitive while clostridial spores, somatic coliphages, and viruses proved the more resistant. In both WWTPs, the presence of F-specific phages was slightly more reduced than were other viruses, with similar elimination values as with bacteria. This might be attributable to the temperature of the water, which was higher than 17°C in 85% of the samples. Previous studies have reported that warm temperatures increase the inactivation of F-specific bacteriophages (Durán *et al.* 2002). None of the studied parameters followed a clear seasonal pattern, probably due to the warm climate prevalent throughout the year.

Lagooning was more effective in reducing the number of bacteria and phages than was UV-radiation, which requires strict maintenance protocols; in contrast, lagoons are self-maintaining. In addition, effective UV processes

**Table 2** | Levels of bacteria, phages and enteroviruses in the secondary and tertiary effluent in the B WWTP and S WWTP

	B2			B3			S2			S3		
	Mean + SE	Min–Max*	%†	Mean + SE	Min–Max*	%†	Mean + SE	Min–Max*	%†	Mean + SE	Min–Max*	%†
Total coliforms	$1.4 \times 10^6 \pm 5.6 \times 10^5$	$4.7 \times 10^4 - 2.1 \times 10^7$	100 (40)	$7.7 \times 10^4 \pm 4.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^2 - 1.6 \times 10^6$	100 (40)	$4.4 \times 10^6 \pm 7.7 \times 10^5$	$7.3 \times 10^4 - 2.0 \times 10^7$	100 (40)	$1.7 \times 10^6 \pm 3.7 \times 10^5$	$6.8 \times 10^3 - 7.9 \times 10^6$	100 (35)
Faecal coliforms	$2.1 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3 - 1.3 \times 10^6$	100 (39)	$1.1 \times 10^4 \pm 5.3 \times 10^3$	$5 - 1.6 \times 10^5$	89.74 (39)	$9.4 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^5$	$1.3 \times 10^4 - 4.7 \times 10^7$	100 (39)	$3.5 \times 10^5 \pm 9.4 \times 10^4$	$8.9 \times 10^2 - 2.5 \times 10^6$	100 (35)
<i>Escherichia coli</i>	$1.6 \times 10^5 \pm 4.8 \times 10^4$	$5.7 \times 10^2 - 1.5 \times 10^6$	100 (40)	$2.2 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$	$20 - 5.1 \times 10^5$	97.5 (40)	$6.4 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$	$7.0 \times 10^3 - 4.2 \times 10^6$	100 (40)	$2.9 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$	$7.1 \times 10^2 - 3.6 \times 10^6$	100 (35)
Enterococci	$2.6 \times 10^4 \pm 7.2 \times 10^3$	$1.6 \times 10^2 - 2.2 \times 10^5$	100 (40)	$7.5 \times 10^3 \pm 3.7 \times 10^3$	$5 - 1.3 \times 10^5$	97.5 (40)	$8.2 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$	$8.5 \times 10^2 - 3.2 \times 10^5$	100 (40)	$4.1 \times 10^4 \pm 9.7 \times 10^3$	$2.9 \times 10^2 - 2.2 \times 10^5$	100 (35)
<i>Clostridium</i> spp.	$5.3 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3 - 3.1 \times 10^5$	100 (40)	$3.0 \times 10^3 \pm 8.2 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2 - 3.1 \times 10^4$	100 (40)	$3.0 \times 10^4 \pm 4.7 \times 10^3$	$1.6 \times 10^3 - 1.5 \times 10^5$	100 (40)	$2.9 \times 10^4 \pm 4.4 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3 - 1.0 \times 10^5$	100 (30)
Somatic coliphages	$7.8 \times 10^5 \pm 5.7 \times 10^5$	$4.5 \times 10^2 - 2.3 \times 10^7$	100 (40)	$2.2 \times 10^4 \pm 6.5 \times 10^3$	$2.4 \times 10^1 - 1.7 \times 10^5$	100 (40)	$6.7 \times 10^5 \pm 1.3 \times 10^5$	$1.2 \times 10^4 - 3.3 \times 10^6$	100 (40)	$3.2 \times 10^5 \pm 9.3 \times 10^4$	$4.0 \times 10^2 - 2.0 \times 10^6$	100 (35)
F-specific phages	$8.5 \times 10^3 \pm 4.2 \times 10^3$	$0 - 1.5 \times 10^5$	84.21 (38)	$3.6 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$	$0 - 2.9 \times 10^3$	75.68 (38)	$6.8 \times 10^4 \pm 1.9 \times 10^4$	$4.0 \times 10^1 - 5.0 \times 10^5$	100 (40)	$7.3 \times 10^4 \pm 2.9 \times 10^4$	$0 - 7.7 \times 10^5$	96.97 (35)
Phages of <i>B. fragilis</i> RYC2056	$7.8 \times 10^2 \pm 3.8 \times 10^2$	$0 - 1.4 \times 10^4$	81.08 (37)	$1.0 \times 10^2 \pm 4.5 \times 10^1$	$0 - 1.3 \times 10^3$	71.05 (38)	$5.0 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$	$6 - 2.7 \times 10^4$	100 (38)	$3.9 \times 10^3 \pm 9.4 \times 10^2$	$0 - 1.9 \times 10^4$	90.63 (32)
Phages of <i>B. thetaiotaomicron</i> GA17	$1.8 \times 10^3 \pm 8.3 \times 10^2$	$0 - 2.6 \times 10^4$	86.11 (36)	$3.0 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$	$0 - 3.4 \times 10^3$	64.86 (37)	$6.8 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3$	$5.0 \times 10^1 - 3.0 \times 10^4$	100 (37)	$7.0 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^3$	$0 - 4.7 \times 10^4$	96.88 (32)
Enteric viruses‡	$10.3 \pm 5.4$	0–58	53.85 (13)	$2.7 \pm 1.8$	0–22	23.08 (13)	$9.9 \pm 3.8$	0–52	69.23 (13)	$3.9 \pm 1.6$	0–18	69.23 (13)

\*Range from minimum to maximum.

†Percentage of positive samples. In brackets the number of total samples studied.

‡For enteric viruses the values are per 1L. In the rest of parameters the values are per 100 mL. 0, below the limit of detection.

**Table 3** | Log<sub>10</sub> reduction of bacterial indicators, bacteriophages, and enteric viruses in B and S waste water treatment plants

	B WWTP			S WWTP		
	Log <sub>10</sub> reduction <sup>*</sup>	Min–Max	Samples <sup>†</sup>	Log <sub>10</sub> reduction <sup>*†</sup>	Min–Max	Samples <sup>†</sup>
Total coliforms	1.7	0–5.3	37 (2)	0.4 (1.1)	0–1.7	29 (4)
Faecal coliforms	1.8	0–5.1	37 (2)	0.5 (1.5)	0–2.2	31 (2)
<i>Escherichia coli</i>	1.7	0–5.3	37 (3)	0.4 (1.1)	0–1.7	32 (1)
Enterococci	1.3	0–3.9	33 (7)	0.2 (1.1)	0–1.7	29 (4)
<i>Clostridium</i> spp.	1.1	0–2.7	38 (2)	0.2 (0.7)	0–1.2	21 (11)
Somatic coliphages	0.8	0–2.7	34 (6)	0.5 (0.3)	0–2.1	32 (1)
F-specific phages	1.6	0–4.3	29 (6)	0.5 (0.9)	0–2.1	28 (5)
Phages of <i>B. fragilis</i> RYC2056	0.6	0–2.3	24 (8)	0.3 (0.8)	0–2.7	25 (7)
Phages of <i>B. thetaiotaomicron</i> GA17	0.7	0–2.6	27 (5)	0.3 (0.5)	0–3.2	20 (12)
Enteric viruses	0.7	0–1		0.5 (0.5)	0–0.8	

<sup>\*</sup>Geometric mean of positive values.

<sup>†</sup>In brackets, geometric mean of log<sub>10</sub> reduction of samples with reduction higher than 1 ulog for faecal coliforms (6 values from 33 samples).

<sup>‡</sup>Number of positive samples used to calculate the geometric mean. In brackets, number of samples without reduction and not computed.

depend greatly upon the system design, the time of water exposure, the UV dose, the wavelength intensity, and other important wastewater parameters as total suspended solids and chemical oxygen demand (Alonso *et al.* 2005). Jacangelo *et al.* (2003) showed that the elimination and inactivation of microbial indicators or pathogens changes depending on the dose of UV-radiation applied. For example, three-fold higher UV doses were needed to reduce *Clostridium perfringens* spores *vs.* F-specific bacteriophage. In a recent study, Hijnen *et al.* (2006) demonstrated that in processes with UV disinfection the bacteriophages

inactivation indexes are at the same level than the indexes for enteric viruses suggesting that they could be a useful model microorganism for the inactivation of them. Phages eliminations of 90–99% have been described in lagooning systems and wetlands (Omura *et al.* 1985; Gersberg *et al.* 1987). Payan (2006) described reductions around 1.2 logarithmic units. Same levels of reduction were found in the present study.

Possible correlations between microbiological parameters were estimated for the four sampling points, and are shown in Table 4. While all parameters correlated well

**Table 4** | Correlation coefficients among *E. coli*, sulphite-reducing clostridia spores, somatic coliphages, *B. fragilis* RYC2056 and enteric viruses

	<i>E. coli</i>			SRC			Somatic coliphages			RYC2056			Enteric viruses		
	n	r	P	n	r	P	n	r	P	n	r	P	n	r	P
Total coliforms	151	0.921	0	152	0.599	0	152	0.652	0	123	0.540	0	28	0.275	NS
Faecal coliforms	145	0.937	0	146	0.616	0	146	0.636	0	118	0.522	0	28	0.446	0.017
<i>E. coli</i>				152	0.560	0	152	0.603	0	124	0.515	0	28	0.420	0.026
Enterococci	151	0.901	0	152	0.611	0	152	0.624	0	123	0.577	0	28	0.342	NS
Spores sulphite-reducing	152	0.56	0				153	0.542	0	124	0.558	0	28	0.366	NS
Somatic coliphages	152	0.603	0	153	0.542	0				124	0.735	0	28	0.718	0
F-specific phages	128	0.581	0	129	0.602	0	129	0.815	0	111	0.751	0	26	0.451	0.021
<i>B. fragilis</i> RYC2056	124	0.515	0	124	0.558	0	124	0.735	0				23	0.589	0.003
<i>B. thetaiotaomicron</i> GA17	123	0.5	0	123	0.413	0	123	0.794	0	114	0.881	0	24	0.613	0.001
Enteric viruses	28	0.42	0.026	28	0.366	NS	28	0.718	0	23	0.589	0.003			

NS, not statistically significant (i.e.  $P > 0.05$ ).

in the S WWTP, in the B WWTP only somatic coliphages correlated well with the remaining parameters. Spores of sulphite-reducing bacteria also correlated with the other parameters, with the exception of enteric viruses. In summary ( $N = 153$ ), no significant statistical correlations were found between bacteriological parameters and enteric viruses. The best correlation with enteric viruses was found with somatic coliphages ( $r = 0.718$ ,  $P = 0$ ). The other phages gave lower correlation values.

## CONCLUSIONS

Wastewater treatments permit the use of regenerated water for non-potable applications such as irrigation. A major goal of wastewater reclamation facilities is to reduce pathogen loads and thereby minimize the public health risks associated with exposure. Reductions in bacterial indicators, bacteriophages or enteroviruses improve when a tertiary process (e.g., chemical, physical or biological) is applied (Lucena *et al.* 2004; Harwood *et al.* 2005). In both treatments studied, UV-radiation and lagooning, the reduction of bacterial indicators (total and faecal coliforms, *E. coli* or enterococci) proved higher than in phages and viruses. Regarding the comparative removal of current bacterial indicators and bacteriophages, our data show that total and faecal coliforms, as well as enterococci, were removed more efficiently than the phages, as has already been previously described in the case of coliphages (Lasobras *et al.* 1997; Durán *et al.* 2002; Jofre 2002). In contrast, clostridia were more resistant to both treatments than were bacterial indicators and F-specific coliphages; nonetheless, they were removed more efficiently than were the other viruses.

It is generally accepted that an effective microorganism indicator should be present at the same time as its target pathogen. Moreover, it should be both quantitatively abundant and at least as resistant to any treatment processes. Finally, its survival rate should be slightly higher, and it should be easy to enumerate via sensitive and specific methods (Payment & Franco 1993). A major goal of this study was to examine monitoring strategies and to determine whether any predictive relationship exists between conventional and alternative indicator organisms and

pathogens. For accuracy and simplicity in the analysis we can conclude that: (1) Bacterial indicators are best evaluated in the wastewater examined in this study by *E. coli* enumerations, and coliphages analysis are recommended as viral indicator, because this method is sensitive, rapid and economically viable. (2) The evaluation of the water quality of the effluents might be completed by the quantification of spores of SRC, due to their long survival in the environment, as a more restrictive criterion. (3) The incidence of helminth eggs in the wastewater of this geographical region is very low. In fact, they are absent from effluents of secondary treatments, and are not a necessary marker for evaluating the quality of treated wastewater. (4) Our results clearly demonstrate the need to analyze a combination of bacteriological and virological parameters when monitoring WWTPs. Simply measuring a single parameter is insufficient for properly determining the quality of treated water for further reuse.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the CICYT (Spain) grant REN2002-04035-CO3-01 and by the 'I Plà Balear de Recerca I Desenvolupament Tecnològic de les Illes Balears'. M. Gomila was the recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. We thank EDAR B (lagooning), EDAR S (UV system) and IBASAN (Govern de les Illes Balears) for providing water samples. We are deeply acknowledged to L. Mocé-Llivina, M. Muniesa, J. Jofre, and F. Lucena, for their help in the teaching of the virological techniques and G. Esteban for help in helminths analysis.

## REFERENCES

- Alonso, E., Santos, A. & Riesco, P. 2005 UV disinfection: Radiation and wastewater quality parameters as operational indicators. *Fresenius Environ. Bull.* **14**(4), 322–326.
- APHA, American Public Health Association, American Water Works Association, Association and Water Environment Federation 1998 *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. APHA, Washington, DC.
- Ayres, R. M. & Mara, D. D. 1996 *Analysis of Wastewater for use in Agriculture: a Laboratory Manual of Parasitological and*

- Bacteriological Techniques*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Buften, A. W. 1959 A note of the enumeration of thermophilic sulphite-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **22**, 278–280.
- California Code of Regulations. 2000 Title 22: California Code of Regulations, Chapter 3 Water Recycling Criteria. [http://www.dhs.ca.gov/ps/ddwem/publications/Regulations/recycleregs\\_index.htm](http://www.dhs.ca.gov/ps/ddwem/publications/Regulations/recycleregs_index.htm)
- Durán, A. E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F. & Jofre, J. 2002 Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* **92**(2), 338–347.
- Gersberg, R. M., Lyon, S. R., Brenner, R. & Elkins, B. V. 1987 Fate of viruses in artificial wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 731–736.
- Grabow W. O. K. 2001 Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Available on website <http://www.wrc.org.za> (ISSN 0378-4738). *Water SA* **27**, 251–268.
- Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R. & Rose, J. B. 2005 Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6), 3163–3170.
- Havelaar, A. H. & Hogeboom, W. H. 1984 A method for the detection of male specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.* **56**(3), 439–447.
- Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. & Medema, G. J. 2006 Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Res.* **40**, 3–22.
- Hilton, M. C. & Stotzky, G. 1973 Use of coliphages as indicators of water pollution. *Can. J. Microbiol.* **19**(6), 747–751.
- IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology 1991 Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* **25**(5), 529–545.
- International Organisation for Standardisation 1995 ISO 10705–1: water quality. Detection and enumeration of bacteriophages-part 1: enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland.
- International Organisation for Standardisation 2000 ISO 10705–2: water quality. Detection and enumeration of bacteriophages-part 2: Enumeration of somatic coliphages. Geneva, Switzerland.
- International Organisation for Standardisation 2001 ISO 10705–4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages-part 2: enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. Geneva, Switzerland.
- Jacangelo, J. G., Loughran, P., Petrik, B., Simpson, D. & McIlroy, C. 2003 Removal of enteric viruses and selected microbial indicators by UV irradiation of secondary effluent. *Water Sci. Technol.* **47**(9), 193–198.
- Jofre, J. 2002 Bacteriophage as indicators. In: Bitton, G. (ed.) *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Jofre, J., Ollé, E., Ribas, F., Vidal, A. & Lucena, F. 1995 Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(9), 3227–3231.
- Katzenelson, E., Fattal, B. & Hostovesky, T. 1976 Organic flocculation: an efficient second step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**(4), 638–639.
- Lasobras, J., Muniesa, M., Frias, J., Lucena, F. & Jofre, J. 1997 Relationship between the morphology of bacteriophages and their resistance in the environment. *Water Sci. Technol.* **35**(11–12), 129–132.
- Lasobras, J., Dellundé, J., Jofre, J. & Lucena, F. 1999 Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *J. Appl. Microbiol.* **86**(4), 723–729.
- Lucena, F., Duran, A. E., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Gantzer, C., Skrabber, S. & Jofre, J. 2004 Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *J. Appl. Microbiol.* **97**(5), 1069–1076.
- Méndez, J., Audicana, A., Isern, A., Llana, J., Moreno, B., Tarancón, M. L., Jofre, J. & Lucena, F. 2004 Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water. *J. Virol. Meth.* **117**(1), 19–25.
- Mocé-Llivina, L., Lucena, F. & Jofre, J. 2004 Double-layer plaque assay for quantification of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(5), 2801–2805.
- Montemayor, M., Costan, A., Lucena, F., Jofre, J., Muñoz, J., Dalmau, E., Mujeriego, R. & Sala, L. 2008 The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Sci. Technol.* **57**(6), 935–940.
- Omura, T., Shin, H. K. & Ketranakul, A. 1985 Behaviour of coliphages in oxidation ponds. *Water Sci. Technol.* **17**(10), 219–227.
- Payan, A. 2006 Bacteriófagos como modelo en el origen de la contaminación fecal y en aguas regeneradas. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
- Payment, P. 1991 Elimination of coliphages, Clostridium perfringens and human enteric viruses during drinking water treatment: results of large volume sampling. *Water Sci. Technol.* **24**(2), 213–215.
- Payment, P. & Franco, E. 1995 Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicators of the efficiency of water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(8), 2418–2424.
- Payment, P., Trudel, M. & Plante, R. 1985 Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(6), 1418–1428.
- Real Decreto 1620/2007 2007 Real decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la



reutilización de las aguas depuradas. *Boletín Oficial del Estado* **294**, 50639–50661.

- Sinton, L. W., Finlay, R. K. & Reid, J. A. 1996 A simple membrane filtration–elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100 ml water samples. *J. Microbiol. Meth.* **25**(3), 257–269.
- Sobsey, M., Schwab, K. J. & Handzel, T. R. 1990 A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male-specific RNA coliphages. *J. Am. Water Works Assoc.* **82**(9), 52–59.
- Wentsel, R. S., O'Neil, P. E. & Kitchens, J. F. 1982 Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(2), 430–434.
- WHO, World Health Organization 2006 *Guidelines for the Safe Use of Wastewaters, Excreta and Greywater*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zanetti, F., De Luca, G., Sacchetti, R. & Stampi, S. 2007 Disinfection efficiency of peracetic acid (PAA): inactivation of coliphages and bacterial indicators in a municipal wastewater plant. *Environ. Technol.* **28**(11), 1265–1271.



## *Pseudomonas* Diversity in Crude-Oil-Contaminated Intertidal Sand Samples Obtained after the *Prestige* Oil Spill<sup>∇†</sup>

Magdalena Mulet, Zoyla David, Balbina Nogales, Rafael Bosch, Jorge Lalucat, and Elena García-Valdés\*

Microbiologia, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, and Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB), 07122 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain

Received 22 July 2010/Accepted 29 November 2010

The Galicia seashore, in northwestern Spain, was one of the shorelines affected by the *Prestige* oil spill in November 2002. The diversity of autochthonous *Pseudomonas* populations present at two beaches (Carnota municipality) was analyzed using culture-independent and culture-dependent methods. The first analysis involved the screening of an *rpoD* gene library. The second involved the isolation of 94 *Pseudomonas* strains that were able to grow on selective media by direct plating or after serial enrichments on several carbon sources: biphenyl, gentisate, hexadecane, methylnaphthalene, naphthalene, phenanthrene, salicylate, xylene, and succinate. Eight denitrifying *Pseudomonas* strains were also isolated by their ability to grow anaerobically with nitrate. The calculated coverage index for *Pseudomonas* species was 89% when clones and isolates were considered together, and there were 29 phylospecies detected. The most abundant were members of the species *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. anguilliseptica*, and *P. oleovorans*. Thirty-one isolates could not be identified at the species level and were considered representatives of 16 putative novel *Pseudomonas* species. One isolate was considered representative of a novel *P. stutzeri* genomovar. Concordant results were obtained when the diversities of the cloned DNA library and the cultured strains were compared. The clone library obtained by the *rpoD* PCR method was a useful tool for evaluating *Pseudomonas* communities and also for microdiversity studies of *Pseudomonas* populations.

Members of the genus *Pseudomonas* are metabolically versatile, ubiquitous, and important for the recycling of elements in the environment. Some strains are able to metabolize organic pollutants, including crude-oil components, and are essential for the natural attenuation of pollution. The bioremediation capabilities of several of these strains have been investigated. Commercial products containing *Pseudomonas* species (e.g., Putidoil [http://tarr.uspto.gov/servlet/tarr?regser=serial&entry=73592999]) are already used for bioaugmentation in large-scale environmental biotechnology (12). Environmental degradation of pollutants can also be enhanced by stimulating indigenous microorganisms through the addition of nutrients (biostimulation). In either strategy, the role of autochthonous bacterial populations in the biodegradation process is first assessed by characterizing the bacteria present in the natural habitat. Traditionally, this is done by specific isolation methods, but culturing techniques are limited by the presence of viable but not culturable bacteria. The limitations of cultivation-based studies of microbial communities have been discussed previously (e.g., reference 32). Therefore, culture-independent methods are now employed in microbial ecology for the direct detection and identification of bacteria in environmental samples, providing complementary data to the

culture-dependent methodologies used for the characterization of bacterial communities.

Although *Pseudomonas* spp. are easily isolated from environmental samples, two PCR methods have been proposed for the specific detection of the *Pseudomonas* genus in environmental samples without the need for cultivation. The first uses specific 16S rRNA gene-targeted primers (33), whereas the second includes specific primers for the ITS1 intergenic region (21). Both methods have drawbacks, such as a lack of discriminatory power and the presence of several copies within a single bacterial chromosome (25). To overcome these limitations, we developed a set of highly selective primers for the amplification of the *rpoD* gene in members of the genus *Pseudomonas* that can be applied to environmental DNA (25). The *rpoD* gene evolves much faster than the rRNA coding genes, is present as a single copy in the genome, and provides higher resolution than does analysis of rRNA gene sequences for *Pseudomonas* identification. Moreover, its phylogenetic analysis correlates well with other phylogenetic markers in the genus *Pseudomonas* (24).

To understand the role of autochthonous *Pseudomonas* populations in the natural attenuation of contaminants, the presence and diversity of *Pseudomonas* in the affected shoreline following the *Prestige* oil spill in Galicia (northwestern Spain) in November 2002 were studied. The details and hydrocarbon composition of the oil spill have been described previously (2). Ninety-four *Pseudomonas* strains were isolated by different methods, and the results were compared with those obtained from the analysis of an *rpoD* gene library. This library was previously obtained from DNA extracted from a sample that was also used for strain isolation. The exhaustive reanalysis of

\* Corresponding author. Mailing address: Microbiologia, Departament de Biologia, Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC-UIB), Universitat de les Illes Balears, 07122 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain. Phone: 34 971173141. Fax: 34 971173184. E-mail: elena.garciavaldes@uib.es.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 3 December 2010.

TABLE 1. Ascription of the isolated strains to species or group<sup>a</sup>

No. of strains	Isolate(s)	Closest type strain	Phylospecies	% similarity with closest type strain	% similarity among isolates	Assignment to species or phylogenetic group	% <i>rpoD</i> minimal similarity within group
1	V125	<i>P. alcaliphila</i> or <i>P. mendocina</i>	P13	95.39		<i>P. oleovorans</i> G	93
3	V111, V198, V202	<i>P. alcaliphila</i> or <i>P. mendocina</i>	P14	93.46–94.71	97.49–100	<i>P. oleovorans</i> G	93
1	V233	<i>P. alcaliphila</i> or <i>P. mendocina</i>	P15	94.18		<i>P. oleovorans</i> G	93
2	V68, V84	<i>P. anguilliseptica</i>	P7	97.63–97.63	100	<i>P. anguilliseptica</i>	71
2	V276, V277	<i>P. anguilliseptica</i>	P8	91.23–91.23	100	<i>P. anguilliseptica</i> G	71
2	V365, V367	<i>P. borbori</i>	P10	96.46–96.46	100	<i>P. borbori</i>	71
4	V80, V141, V142, V143	<i>P. borbori</i>	P11	77.69–77.91	99.67–100	<i>P. anguilliseptica</i> G	71
1	V138	<i>P. guineae</i>	P9	90.99		<i>P. anguilliseptica</i> G	71
2	V12, Vn1	<i>P. marincola</i>	P12	77.46–77.69	99.83–99.83	<i>P. anguilliseptica</i> G	71
3	V69, V70, Vk2	<i>P. mendocina</i>	P16	81.40–81.82	99.67–100	<i>P. oleovorans</i> G	93
8	V19, V20, V87, V194, V195, V196, V199, V200	<i>P. monteilii</i>	P1	92.96–93.68	97.50–100	<i>P. putida</i> G	78
4	V218, V219, V221, V222	<i>P. monteilii</i>	P4	90.39–90.39	87.07–100	<i>P. putida</i> G	78
1	V289	<i>P. monteilii</i>	P5	86.28		<i>P. putida</i> G	78
1	V1	<i>P. mosseli</i>	P6	75.33		<i>P. putida</i> G	78
3	V190, V203, VGXC2	<i>P. nitroreducens</i>	P17	94.06–94.24	99.84–100	<i>P. aeruginosa</i> G	68
3	V92, V113, V120	<i>P. pachastrellae</i>	P18	92.71–92.71	99.35–99.68	<i>P. pachastrellae</i> (tentative)	
4	VGXO14, Vi1, V11, Vm1	<i>P. pachastrellae</i>	P19	76.65–78.63	89.00–99.18	Not ascribed	
6	V23, V25, V32, V33, V35, V36	<i>P. putida</i>	P3	99.18–99.84	99.34–100	<i>P. putida</i>	78
2	V320, V315	<i>P. stutzeri</i> gv1	P23	97.74–97.92	99.83–99.83	gv1	75
32	V4, V27, V63, V64, V65, V67, V71, V73, V79, V83, V110, V114, V127, V129, V187, V188, V189, V197, V204, V205, V224, V225, V227, V230, V231, V232, V278, V280, V316, V347, V362, V370	<i>P. stutzeri</i> gv3	P20	97.57–99.66	97.03–100	gv3	75
1	V317	<i>P. stutzeri</i> gv5	P24	99.66		gv5	75
6	V228, V229, V112, V226, V116, V118	<i>P. stutzeri</i> gv19	P21	99.83–100	99.83–100	gv19	75
1	V81	<i>P. stutzeri</i> new gv	P27	85.73 (JM300 gv8)		<i>P. stutzeri</i> G	75
1	PE	<i>P. stutzeri</i> new gv		83.73 (28a3 gv14)		<i>P. stutzeri</i> G	75
1	V29	<i>P. umsongensis</i>	P29	94.71		<i>P. jessenii</i> G	90

<sup>a</sup> G, group; gv, genomovar; P, phylotype.

the *rpoD* gene library, based on recently obtained sequences of the *Pseudomonas* type strains, allowed the assessment of *Pseudomonas* diversity by culture-dependent and -independent methods. The two methods were compared to assess the possible bias introduced in the characterization of *Pseudomonas* communities. Both clones and isolates were ascribed phylogenetically to *Pseudomonas* species to determine their diversity. The correlation between both methods is discussed.

#### MATERIALS AND METHODS

**Sampling sites.** Sand samples from an intertidal zone contaminated after the *Prestige* oil spill were taken in March 2004 (sample E), September 2004 (samples D, F, and G), and July 2005 (samples A, B, and C) at Carnota municipality, Galicia, northwestern Spain. Samples A and G were collected at Boca do Rio beach (42°50'11.52''N, 9°6'11.52''W), whereas the others were collected at two different sites at Praia da Seda beach (42°46'29.27''N, 9°7'27.08''W). This part of the coast was not fertilized with nutrients, and no bioaugmentation treatments were performed in the area after the tanker accident.

**Bacterial isolation and growth conditions.** Strains were isolated after an enrichment procedure or by direct plating on selective media. Samples were enriched by inoculating two different liquid media, mineral basal medium (MMB) (4) or mineral marine medium (MMM) (20), both supplemented with

1 g/liter of a carbon source: biphenyl (BPH), gentisate (G), hexadecane (HEX), 2-chloronaphthalene (CN), 2-methylnaphthalene (MEN), naphthalene (NAH), phenanthrene (PHN), salicylate (SAL), xylene (X), or succinate (SUC). Each round of enrichment was incubated for 10 or 15 days in MMB or MMM, respectively. After three successive passages on selective medium, bacteria were isolated on plates containing the same medium prepared with washed agar and the corresponding carbon sources. The incubation temperature was 20°C. Directly plated samples were spread onto MMB and MMM agars with succinate, naphthalene, or hexadecane as the energy and carbon sources. Additionally, some samples were directly inoculated on marine agar 2216 (MA; Difco). Details are given in Table S1 in the supplemental material. For routine culture, cells were incubated at 30°C on Luria broth (LB) medium. All strains isolated in MMB were tested for growth by plating on MA medium, which contains 19.45 g NaCl per liter.

Denitrifying bacteria were isolated in two ways. First, samples were enriched for denitrifying bacteria in MMM with 1 g/liter potassium nitrate (0.11 M) under anaerobic conditions (Gaspack; Oxoid) with 5 g/liter of maltose, ethylene-glycol, glycerol, or starch as a carbon source. Second, enrichments of hydrocarbon degraders using hexadecane and naphthalene (see above) were screened for the presence of denitrifiers using the same conditions and substrates as before. Gas production in Durham tubes was detected under anaerobic conditions as described by Cowan and Steel (11). For isolation, both types of enrichments were plated anaerobically on MMM agar plates with nitrate and the same carbon source used for the enrichment.

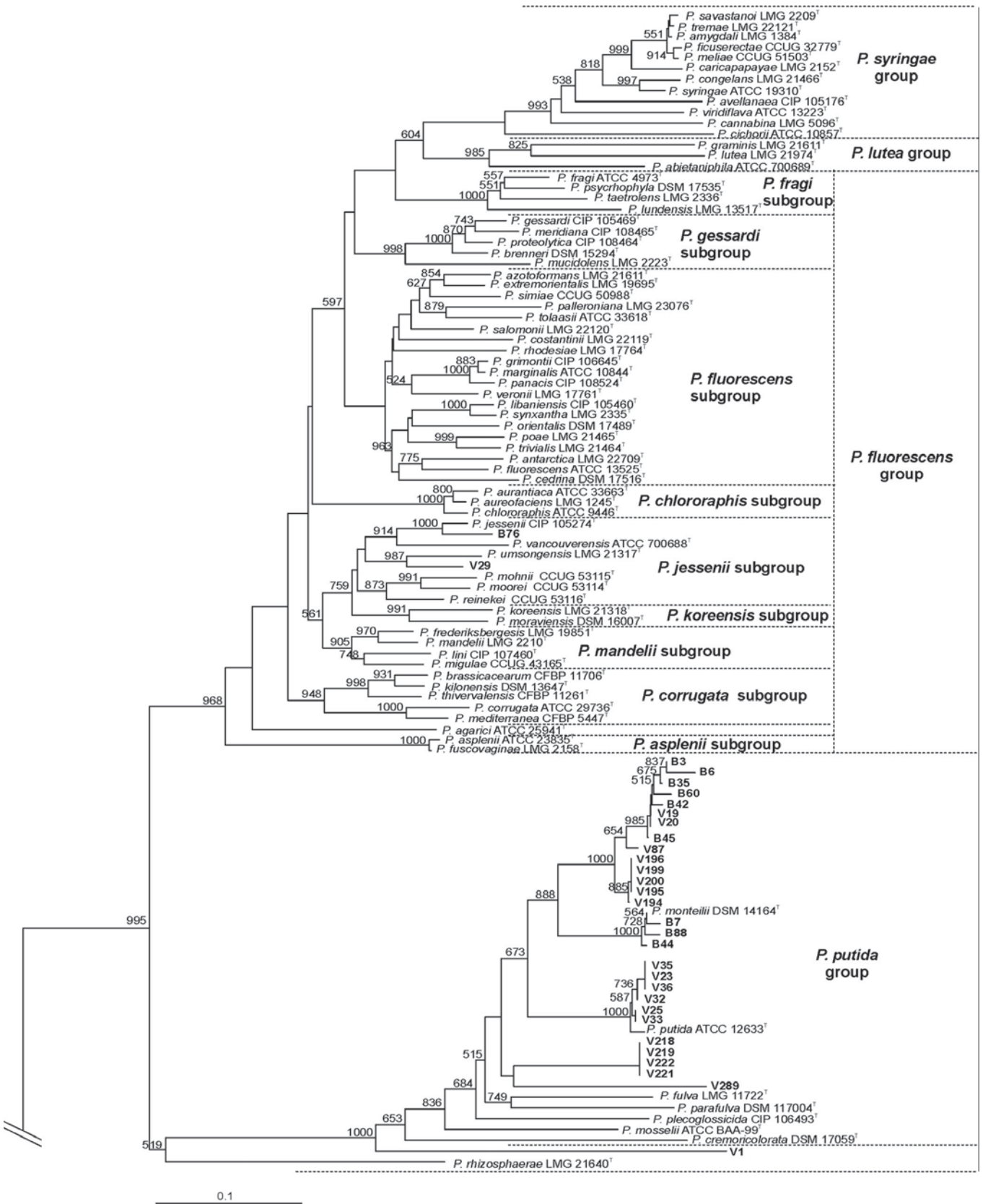


FIG. 1. Phylogenetic tree based on the *rpoD* gene of 107 *Pseudomonas* type strains, the clones analyzed, and the isolates. Distance matrix was calculated by the Jukes-Cantor method. The dendrogram was generated by neighbor joining. The *Cellvibrio japonicus* Ueda107 *rpoD* sequence was used as the outgroup. The bars indicate sequence divergence. Bootstrap values of more than 500 (from 1,000 replicates) are indicated at the nodes. Isolates are indicated with a letter V, and clones are indicated with a letter B, both followed by the corresponding number.

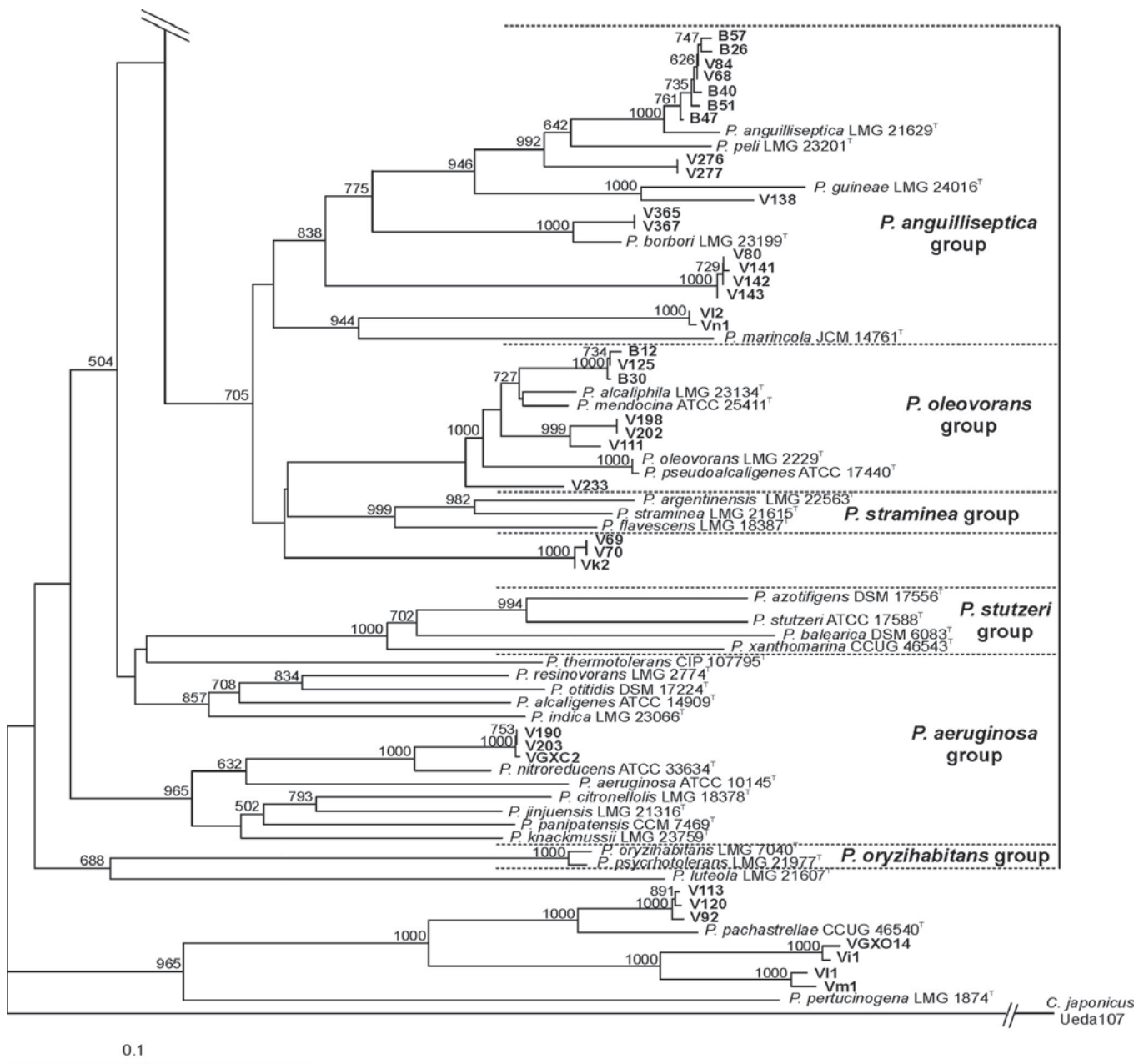


FIG. 1—Continued.

Additionally, 0.1 g of Putidol powder (Institute for Geological Research, Tyumen, Russia) was suspended in 10 ml of Ringer solution (pH 6.9) (Merck) and plated on LB medium, and one colony was selected for identification.

**DNA extraction and purification.** Total nucleic acids of cultured strains were extracted by following previously described procedures (10, 34).

**Identification of bacterial isolates.** Isolates were initially identified by a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 16S rRNA genes. Nearly complete 16S rRNA genes were amplified from extracted DNA using primers F27 and R1492 described in Table S2 in the supplemental material (19). PCR amplifications were performed as described previously (20) using *Taq* polymerase (GE Healthcare) in a Mastercycler personal thermal cycler (Eppendorf, Germany). Ten microliters of the amplified products was digested separately with 20 U of endonucleases *AluI* and *CfoI* (Roche) at 37°C for 3 h. Restriction fragments were separated by electrophoresis in 4% (wt/vol) NuSieve 3:1 agarose gels (Cambrex Bio Science Rockland Inc.) in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer and visualized by staining with ethidium bromide. The restriction patterns of the two enzymes were compared manually. Isolates with the same

restriction profiles of their 16S rRNA genes with both enzymes were grouped together. The 16S rRNA genes of representative isolates from each RFLP group were partially sequenced using primer F357 (see Table S2 in the supplemental material) as previously described (1). The isolates in RFLP groups corresponding to *Pseudomonas* were selected for further analysis. Amplified 16S rRNA gene PCR products of all *Pseudomonas*-like isolates were then digested with *BamHI* as previously described (6, 7) to differentiate *P. stutzeri* isolates.

All isolates with a *Pseudomonas*-like RFLP profile were further identified by sequencing the *rpoD* gene. Primers and PCR conditions have been described by Mulet et al. (25).

**Phylogenetic analysis.** Partial sequences of the 16S rRNA gene and the *rpoD* genes were compared with reference sequences obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the European Bioinformatics Institute (EBI) using the BLAST and FASTA/nucleotide similarity search programs (3, 28) and also with *Pseudomonas* strain reference sequences maintained in the PseudoMLSA database (5). Alignments were analyzed according to Mulet et al. (25). The gene distances were calculated using the Jukes-Cantor method,

and phylogenetic trees were generated by neighbor joining, as previously described (25).

**Detection of the naphthalene dioxygenase gene.** The gene encoding the c subunit of the naphthalene dioxygenase gene (*nahAc*) was detected by a PCR procedure as described by Ferrero et al. (13).

**Statistical analysis.** Each different sequence was considered a single phylotype, and several phylotypes were grouped in a single phylospecies when they affiliated in the same phylogenetic branch and the similarity of the *rpoD* genes was higher than 95%. Sequence information obtained from the clones and isolates of all the sampling sites was pooled together to calculate coverage, diversity indices, and phylotype and phylospecies richness. Two isolates from the same origin enriched under the same conditions and with an identical *rpoD* gene sequence were considered siblings. The rarefaction index was calculated by a freeware program, Analytic Rarefaction 1.3, available at <http://www.uga.edu/strata/software/index.html> (16).

**Nucleotide sequence accession numbers.** The partial 16S rRNA gene and *rpoD* sequences have been deposited at the EBI database under accession numbers FN995242 to FN995255, FN994194 to FN994287, and FN994779 (see the list in Table S3 in the supplemental material).

## RESULTS

**Culture-dependent analysis.** A collection of 343 isolates was obtained from seven different sand samples taken from beaches polluted by the *Prestige* oil tanker accident in Galicia in northwestern Spain. An initial analysis of the 16S rRNA gene RFLP profiles and partial sequencing of the 16S rRNA gene led to the selection of 86 presumptive *Pseudomonas* strains. A total of 11 patterns were defined for these isolates after profiling with the enzymes AluI and CfoI. Sixty-seven isolates (78%), belonging to different *Pseudomonas* species, had a pattern called 1.1 (see Table S1 in the supplemental material), which consisted of four bands for AluI digestion (160, 220, 240, and 420 bp) and five bands for CfoI digestion (230, 280, 320, 380, and 410 bp). All isolates in which the 16S rRNA gene was digested by the enzyme BamHI (producing two bands of 600 and 800 bp) were presumably identified as *P. stutzeri*. Eight additional isolates were obtained under denitrification conditions, bringing the total number of *Pseudomonas* isolates to 94.

Overall, 55 *Pseudomonas* isolates were obtained after enrichment or direct plating on mineral medium with hydrocarbons as the carbon and energy sources. Twenty-two isolates were isolated on succinate medium, nine were isolated on marine agar, and eight were obtained as denitrifiers (Table 1). All isolates are indicated with the letter V. Forty-eight of the 55 isolates were subcultured with the same hydrocarbon used for isolation, alongside corresponding controls without a substrate. Forty-eight percent were definitively able to grow on the corresponding hydrocarbon. From the 22 *Pseudomonas* isolates that grew on succinate, 20 were also tested for growth on naphthalene or hexadecane; three grew on naphthalene and three on hexadecane. Ten strains were isolated on MA medium; four of them were able to grow on naphthalene. In summary, 31% of the *Pseudomonas* strains isolated on succinate or MA medium were also able to grow with hydrocarbons as substrates, without previous selective pressure with hydrocarbons. Furthermore, 21 naphthalene degraders were analyzed for the presence of the naphthalene dioxygenase gene (*nahAc*), which codes for the key enzyme in the naphthalene-metabolizing pathway. The *nahAc* gene was detected in all the strains tested; 3 strains belonged to the *nahAc P. putida* C18 type and 18 strains to the *nahAc P. stutzeri* AN10 type, as

described by Ferrero et al. (13) (see Table S1 in the supplemental material).

The isolates were ascribed phylogenetically to their closest type or reference strain in the *rpoD* databases (Table 1 and Fig. 1 and 2; see also Table S1 in the supplemental material) when the sequence similarity was higher than 95%. The topology of the phylogenetic trees and similarity values lower than 95% suggest that some strains represent phylospecies not yet named (Table 1; see also Table S1 in the supplemental material). In the genus *Pseudomonas*, 18 phylogenetic groups and subgroups have been defined previously, besides *P. luteola*, *P. oryzihabitans*, *P. pachastrellae*, and *P. pertucinogena*, which did not cluster in any of the 18 groups (24). Eighty-six isolates were distributed into six known groups (*P. jessenii*, *P. putida*, *P. anguilliseptica*, *P. oleovorans*, *P. stutzeri*, and *P. aeruginosa*). Three isolates affiliated closely with *P. pachastrellae* (V92, V113, and V120). Four isolates (Vi1, V11, Vm1, and VGXO14) formed a new branch in the *Pseudomonas rpoD* tree.

The highest number of isolates (43 plus the isolate from Putidoil) was affiliated with the species *P. stutzeri* (Fig. 2). The highly specific nature of the *rpoD* gene sequence even discriminated between genomovars (gv) within the *P. stutzeri* complex (2 isolates were ascribed to gv1, 33 to gv3, 1 to gv5, and 6 to gv19). One isolate, strain V81, could not be ascribed to any gv because its closest relatives were members of gv7 (85.73% sequence similarity) and it was located in an independent branch of the phylogenetic tree (Fig. 2).

Eight *Pseudomonas* isolates were isolated after being enriched in a denitrifying medium. Four isolates were assigned to the *P. aeruginosa*, *P. anguilliseptica*, or *P. oleovorans* group. The other four isolates could not be ascribed to any known group and formed a new cluster in a clearly differentiated branch in the *rpoD* gene tree. All denitrifiers were sufficiently distant from known type strains and could be considered representatives of four or five new species. The denitrifying strains belonging to the phylogenetic groups of *P. nitroreducens* (VGXC2) and *P. oleovorans* (Vk2) appeared to be similar to other aerobic cultivated isolates: the sequence of strain VGXC2 was 94.06% similar to the *rpoD* gene of strain V190 and 94.24% similar to the *rpoD* gene of strain V203. Both isolates had atypical AluI/CfoI restriction patterns of the 16S rRNA gene (profiles 44.1 and 59.1, respectively). Strain Vk2 was close to the *P. oleovorans* group and clustered with isolates V69 and V70, which are identical in *rpoD* sequences and originated from the same sample (D) with the same isolation substrate and are therefore considered siblings. Four denitrifying *Pseudomonas* isolates used glycerol as the carbon source, two used maltose, and the other two used starch. No isolates were obtained with ethylene glycol as the substrate under denitrifying conditions (see Table S1 in the supplemental material).

Samples of two different Putidoil formulations were studied. From the first formulation (before year 2000), three different colony morphologies were identified from the lyophilized product on mineral medium with naphthalene as the carbon source (isolates PTDA, PTDB, and PTDE). All three had identical sequences for seven genes (16S rRNA gene, ITS1 gene, *rpoD*, *gyrB*, *catA*, *nahH*, and *nosZ*); they were considered isolates of the same strain and were labeled PTDA in further analyses. They were previously ascribed to *P. stutzeri* gv3 (10, 26). From a second Putidoil formulation used at the Galicia



FIG. 2. Phylogenetic tree based on the *rpoD* gene of *P. stutzeri* strains, the clones analyzed, and the isolates. Distance matrix was calculated by the Jukes-Cantor method. The dendrogram was generated by neighbor joining. The *P. aeruginosa* type strain *rpoD* sequence was used as the outgroup. The bar indicates sequence divergence. Bootstrap values of more than 500 (from 1,000 replicates) are indicated at the nodes. Isolates are indicated with a letter V, and clones are indicated with a letter B, both followed by the corresponding number.



TABLE 2. Ascription of the *rpoD* clones to species or group<sup>a</sup>

No. of clones	Clone(s)	Closest type strain	Phylospecies	% similarity with closest type strain or reference	% similarity among isolates	Assignment	% <i>rpoD</i> minimal similarity within group
2	B12, B30	<i>P. alcaliphila</i> or <i>P. mendocina</i>	P13	95.04–95.04	99.50–99.50	<i>P. oleovorans</i> G	93
5	B26, B40, B47, B51, B57	<i>P. anguilliseptica</i>	P7	97.12–97.63	99.16–99.50	<i>P. anguilliseptica</i> G	71
1	B76	<i>P. jessenii</i>	P28	96.97		<i>P. jessenii</i> G	90
6	B6, B35, B42, B45, B60, B3	<i>P. monteilii</i>	P1	91.50–92.78	98.01–99.51	<i>P. putida</i> G	78
3	B44, B88, B7	<i>P. monteilii</i>	P2	99.34–99.67	98.84–99.18	<i>P. monteilii</i>	78
5	B28, B54, B65, B102, B111	<i>P. stutzeri</i> gv3	P20	98.79–100	98.10–99.49	gv3	75
3	B69, B95, B105	<i>P. stutzeri</i> gv5	P24	99.66–99.83	99.83–100	gv5	75
1	B39	<i>P. stutzeri</i> gv7	P25	100		gv7	75
3	B36, B74, B80	<i>P. stutzeri</i> gv4	P22	91.88–92.07	99.14–100	<i>P. stutzeri</i> G	75
1	B59	<i>P. stutzeri</i> gv15	P26	95.80		<i>P. stutzeri</i> G	75
16	B9, B13, B17, B22, B29, B41, B43, B49, B55, B67, B75, B78, B89, B96, B103 B104	<i>P. stutzeri</i> gv19	P21	99.14–100	98.45–100	gv19	75

<sup>a</sup> G, group; gv, genomovar; P, phylotype.

seashore in 2004 for remediation trials of the *Prestige* oil spill (but not at the beach where the sand samples in this study were taken), another strain was isolated and labeled PE (see Table S1 in the supplemental material). This strain was ascribed to *P. stutzeri* by its *rpoD* gene sequence but not to any known genomovar (Fig. 2).

**Comparison of isolate diversity with results from a culture-independent analysis.** A clone library from *rpoD* amplicons consisting of 111 clones was obtained previously from sand sample F (25). Eighty-four *rpoD* clones in the gene library had the expected insert size. The primers used are highly selective for *Pseudomonas* species, but the *rpoD* genes of other closely related species may be amplified. After sequencing, 46 sequences were ascribed with certainty to the *Pseudomonas* genus (25). However, at that time, the database of the *rpoD* gene for the genus *Pseudomonas* was incomplete and contained sequences of only 35 *Pseudomonas* type strains, and few clones could be assigned to species or known groups. An exhaustive analysis of the clone sequences was performed in the present work, because the current database contains 107 *Pseudomonas* type strains (5, 24). This database allowed the ascription of the sequences and their comparison with the isolate sequences. Clones are indicated with a letter B followed by the corresponding number (Table 2 and Fig. 1, 2, and 3; see also Table S2 in the supplemental material).

Following the distribution established for the *Pseudomonas* genus by Mulet et al. (24) and as indicated in Fig. 1 and 2, Table 2, and Table S4 in the supplemental material, only a few clones affiliated to the *P. fluorescens* lineage. Clone B76 was close to *P. jessenii* in the corresponding subgroup, and nine clones (B3, B6, B7, B35, B42, B44, B45, B60, and B88) were close to *P. monteilii* in the *P. putida* subgroup, along with eight isolates (V19, V20, V87, V194, V195, V196, V199, and V200). Most of the clones were located in the *P. aeruginosa* lineage: five clones (B26, B40, B47, B51, and B57) were close to *P. anguilliseptica* and to isolates V68 and V84; two clones (B12 and B30) were close to *P. alcaliphila* or *P. mendocina* and to isolate V125 in the *P. oleovorans* group. Twenty-nine clones were affiliated to *P. stutzeri* (5 to gv3, 3 to gv5, 1 to gv7, and 16 to gv19, and 4 clones were considered representatives of two

presumably new genomovars close to gv4 and gv15). Clones and isolates were found in gv3, gv5, and gv19, whereas only isolates were found in gv1 and only clones were found in gv7 (B39) and gv15 (B59). Two isolates, PE and V81, represent presumably novel genomovars.

**Statistical analysis.** The phylotypes were grouped in putative phylospecies by considering only the isolates, only the clones in the gene library, or both together. For all samples analyzed, a total of 29 phylospecies were obtained and are listed in Tables 1 and 2. The calculated coverage indexes were 85% for the isolates, 93% for the clones, and 89% for isolates and clones grouped together. The rarefaction curves indicating the phylospecies richness of the pooled samples are shown in Fig. 3. The *Pseudomonas* diversity in the clone library was clearly analyzed exhaustively (Fig. 3a). Of the 29 different phylospecies detected when all samples were pooled together, only 14 were detected in sample F. One phylospecies was represented by clones and isolates (P20), three phylospecies were represented by isolates, and 10 phylospecies were represented only by clones.

## DISCUSSION

***Pseudomonas* diversity.** The RFLP method for discriminating 16S rRNA genes of members of the genus *Pseudomonas* is useful for the characterization of bacterial isolates. Seventy-eight percent of the *Pseudomonas* isolates screened by 16S rRNA gene RFLP (67/86) belonged to a single AluI/CfoI group (1.1). This pattern was not observed for any of the more than 343 isolates obtained in total, which belonged to several bacterial genera (data not shown). Moreover, all isolates having a type 1 pattern for AluI belonged to the *Pseudomonas* genus. The opposite, i.e., isolates having a type 1 CfoI pattern and different AluI patterns, could not be unequivocally identified as *Pseudomonas* species by RFLP analysis, because this pattern was shared by isolates belonging to several genera. The addition of a third restriction enzyme (BamHI) allowed the direct discrimination of *P. stutzeri* from the previously selected *Pseudomonas* strains (6). To improve species discrimination, the *rpoD* gene has been selected as an informative gene for

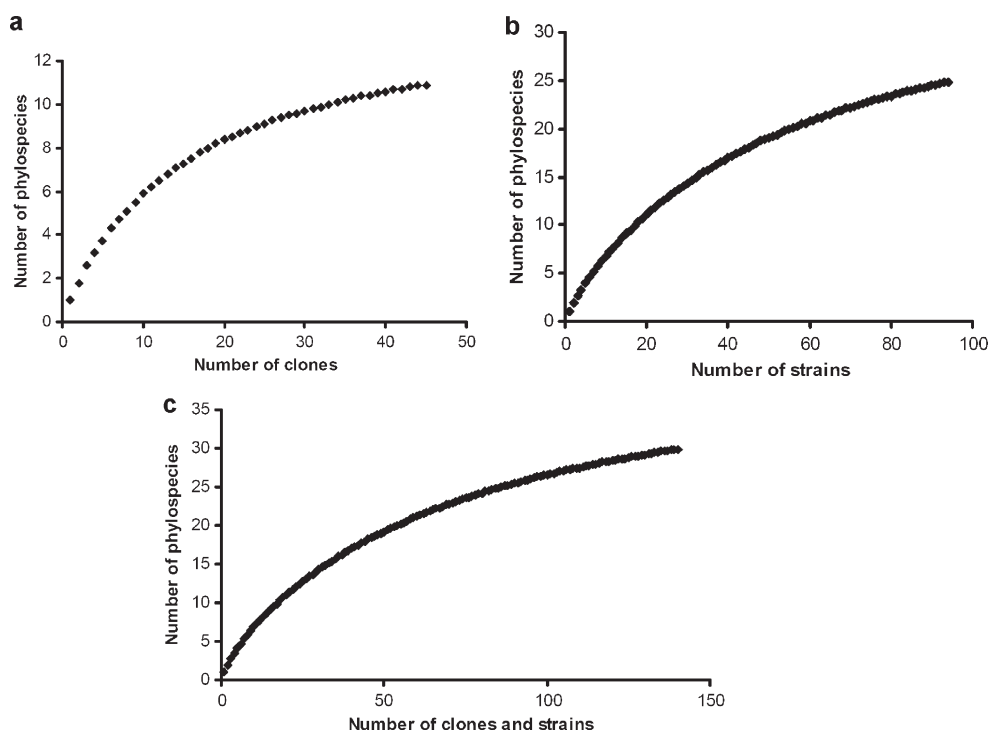


FIG. 3. Rarefaction curves for the phylospecies defined by *rpoD* gene sequences of the clones (a), the isolates (b), and the clones and isolates combined (c).

phylogenetic studies of *Pseudomonas* (9, 10, 24, 35, 36). Specific primers for *Pseudomonas* based on 16S rRNA or ITS1 (21, 33) have been tested and compared with a nested PCR of *rpoD* genes (25). The *rpoD*-based strategy used in this work generated concordant results for cloned DNA and cultured strains. Species of the genus *Pseudomonas* have long been considered a relevant group of bacteria for bioremediation purposes (27). In the present study, we demonstrated the presence of autochthonous *Pseudomonas* species in a heavily polluted area that is susceptible to fertilization to enhance the natural restoration of the sand. Most of the *Pseudomonas* isolates (92%) and all of the *rpoD* clones were assigned to only six of the 18 phylogenetic groupings described for the genus (24). The most abundant were members of the *P. stutzeri* group (45% of the isolates and 63% of the clones), the *P. putida* group (21% of the isolates and 20% of the clones), the *P. anguilliseptica* group (11% of both isolates and clones), and the *P. oleovorans* group (9% of the isolates and 4% of the clones). In contrast with soil samples, in which members of the *P. fluorescens* group are predominant (14), in the sand samples only one isolate and one clone were detected in this group. Both were in the *P. jessenii* subgroup. Of the isolates and clones that could be ascribed to phylospecies in the four main groups, 52% and 59% were in the *P. stutzeri* group, 20% and 23% were in the *P. putida* group, 18% and 13% were close to *P. anguilliseptica*, and 10% and 5% were in the *P. oleovorans* group, respectively. The highest represented genomovar in *P. stutzeri* was gv3, with 32 isolates and five clones. Many members of gv3 are of marine origin (15, 18). The other genomovars were represented by fewer isolates or clones. Six isolates and 16 clones were assigned to gv19, previously described in marine habitats (26). The *Pseudomonas*

diversity in the samples studied was almost completely determined (89% coverage of the phylospecies present) when both methods were considered together.

The correspondence between the assignment of the isolates and of the clones to *Pseudomonas* groups was not duplicated at the population level. Only a few clones were 100% identical to strains isolated in this study (clones B22, B29, B43, and B55 and isolates V112, V116, V118, V228, and V229) or strains isolated in previous studies, such as is the clone B39, which is identical in the *rpoD* gene sequence to isolate DSM 50238 (a denitrifier from a soil sample in California). This indicates that the *rpoD*-based PCR method is also adequate for microdiversity studies of populations within species in the genus. Most of the *P. stutzeri* isolates and clones could be ascribed to known genomovars, and only isolate V81 may represent a new genomovar. In contrast, few isolates of other species (10 of 94) could be ascribed undoubtedly to a species: two *P. anguilliseptica*, two *P. borbori*, and six *P. putida* isolates. Only a few clones (three of *P. monteilii*) could also be ascribed to known species (Tables 1 and 2). Overall, 40 isolates may be representatives of new species or, in the case of *P. stutzeri*, new genomovars. There is clearly enormous microdiversity found in environmental samples, even when they originate from the same site. In addition, several isolates sharing 100% similarity in the *rpoD* sequence most likely belong to the same strain. Most of the isolates (63%) were distributed close to known species from marine habitats, as indicated in the original description: *P. stutzeri* (46 isolates), *P. pachastrellae* (seven isolates), *P. anguilliseptica* (four isolates), and *P. marincola* (two isolates). Five isolates were close to *P. alcaliphila* (of marine origin) or *P. mendocina* (found in many different habitats). Others are

known inhabitants of aquatic environments, such as *P. borbori* (six isolates), which was originally isolated from sludge, and nine isolates (three *P. nitroreducens* and six *P. putida* isolates) were of species known to metabolize organic pollutants. One isolate was closely related to *P. umsongensis*, the type strain of which was isolated from farm soil, and another was closely related to *P. guineae*, originally isolated from Antarctic soil. Eight strains were close to *P. monteilii* and one was close to *P. mosseli* species, both initially described in clinical specimens but of unknown clinical significance. In the *P. stutzeri* species, genomovar 3 has the most representatives (71%). Members of this genomovar have previously been described in contaminated and uncontaminated soils, in marsh sediment, and in marine water (18). The samples analyzed here reveal the coexistence of members of different genomovars as exemplified by sample A, which contained gv1, gv3, and gv5 strains. In a previous study, Sikorski and collaborators (31) confirmed high genetic diversity in local populations of marine sediments by different techniques, such as multilocus sequence typing or multilocus enzyme electrophoresis (10, 29). Strain CCUG 46542 was isolated from a marine ascidian in the Japan Sea by Romanenko et al. (30). It is the reference and only known member of gv19. The six isolates obtained in this study are the first new strains of the genomovar since it was first described (26). Members of this genomovar were not only found in sample G but were also detected in the clone library of sample F. Additionally, one component of the recent formulation of the commercial product Putidoil belongs to *P. stutzeri* but could not be ascribed to any known genomovar. The presence of *P. stutzeri* strains in six of the seven samples studied is remarkable and indicates the importance of the species in this environment. The other groups were present in at least two samples, with the exception of members of the *P. oleovorans* group, which were found in only one sample. *P. aeruginosa* has been proposed as an abundant species in marine environments (17), and this species was the most abundant hydrocarbon-degrading bacterium found in the bioremediation of the *Nakhodka* oil spill in the Japan Sea (8). However, we did not isolate strains ascribed to this species in the samples examined, and no *rpoD* clones related to *P. aeruginosa* were detected.

**Isolation on hydrocarbons as carbon sources.** *Pseudomonas* strains were isolated on linear and aromatic hydrocarbons, from the intertidal zone affected by the *Prestige* oil spill. About half of the *Pseudomonas* species were obtained from media with hydrocarbons, and the other half were isolated on succinate or MA or as denitrifiers (see Table S1 in the supplemental material). Most of the *P. stutzeri* isolates (62%) were obtained by direct plating or after enrichment on mineral medium with the growth substrate naphthalene. Notably, the three isolates phylogenetically close to *P. borbori* have a *P. putida* C18-type naphthalene dioxygenase gene, whereas all of the *P. stutzeri* strains have the *P. stutzeri* AN10 type. About one-third (34 of 94 isolates [36%]) of the *Pseudomonas* isolates were able to grow with naphthalene or hexadecane as the only source of carbon and energy, thus demonstrating the biodegradative potential of the *Pseudomonas* populations in the affected ecosystem. *P. stutzeri* is known for its natural transformation ability (22), and naphthalene degradation genes can be horizontally transferred (23) in this species, as demonstrated in other marine naphthalene-degrading strains (10, 15). The *Prestige* oil

spill may be responsible for the spread of naphthalene-metabolizing genes in the *P. stutzeri* population, or a high number of isolates of this species may have already been present in the environment. Furthermore, at least two strains of *P. stutzeri* present in two different formulations of the commercial product Putidoil were represented by strains with similar characteristics in the samples studied, and they may play a similar role in the ecosystem when the product is used for environmental biotechnological processes.

**Denitrifiers.** None of the eight denitrifying isolates could be ascribed to any known species. All of them affiliated in distant branches to the closest type strain and none affiliated close to clones of the *rpoD* gene library. Some of these strains have been isolated without previous enrichment (VGXO14 and VGXC2), whereas others have been isolated after enrichments in naphthalene or hexadecane (Vi1, Vk2, V11, V12, Vm1, and Vn1). In both cases, several substrates were used as carbon sources under denitrifying conditions (maltose, starch, or glycerol). Only two denitrifying isolates were close to other isolates obtained under aerobic conditions (Vk2, similar to V69 and V70, and VGXC2, similar to V190 and V203). The closest type strain to isolates V12 and Vn1 was *P. marincola*, to isolate VGXC2 was *P. nitroreducens*, and to isolate Vk2 was *P. mendocina*. All these type strains are known denitrifiers. *P. stutzeri* was the species detected in the highest proportion in this study and all members of the species are recognized denitrifiers frequently found in soil and marine samples. However, no *P. stutzeri* isolates were detected in the denitrifying enrichments.

In the intertidal zone studied, members of the genus *Pseudomonas* represent a high percentage of the culturable marine bacteria isolated on hydrocarbons as growth substrates and as denitrifiers. The *rpoD* clone library used allowed the detection of environmental sequences representing *Pseudomonas* spp., some of which were not cultured by our approach. A relatively high percentage of the *Pseudomonas* isolates obtained are representatives of novel species yet to be described. In previous reports of bacterial communities in samples collected from a location geographically close to those used in this study (2), the microbial diversity detected included many *Proteobacteria* and *Actinobacteria* species, but few *Pseudomonas* species were isolated (only three), and none were detected by culture-independent methods (DGGE analysis of the 16S rRNA gene or through screening of a gene library [2]). We demonstrated alternative isolation procedures and selective primers to detect *Pseudomonas* populations, which may otherwise be underestimated.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by projects CGL 2008-03242/BOS and CTM 2008-02574/MAR and Consolider grant CSD2009-00006 from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) and FEDER funding.

#### REFERENCES

1. Aguiló-Ferretjans, M. M., R. Bosch, C. Martín-Cardona, J. Lalucat, and B. Nogales. 2008. Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain). *Syst. Appl. Microbiol.* **31**:231–240.
2. Alonso-Gutiérrez, J., et al. 2009. Bacterial communities from shoreline environments (Costa da Morte, northwestern Spain) affected by the *Prestige* oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:3407–3418.
3. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.

4. Aragno, M., and H. G. Schlegel. 1981. The hydrogen-oxidizing bacteria, p. 865–893. In M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
5. Bannasar, A., M. Mulet, J. Lalucat, and E. García-Valdés. 2010. PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiol.* **10**:118.
6. Bannasar, A., C. Guasp, M. Tesar, and J. Lalucat. 1998. Genetic relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains based on molecular typing methods. *J. Appl. Microbiol.* **85**:643–656.
7. Bannasar, A., C. Guasp, and J. Lalucat. 1998. Molecular methods for the detection and identification of *Pseudomonas stutzeri* in pure culture and environmental samples. *Microb. Ecol.* **35**:22–33.
8. Chaerun, S. K., K. Tazaki, R. Asada, and K. Kogure. 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environ. Int.* **30**:911–922.
9. Cladera, A. M., E. García-Valdés, and J. Lalucat. 2006. Genotype versus phenotype in the circumscription of bacterial species: the case of *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas chloritidismutans*. *Arch. Microbiol.* **184**:353–361.
10. Cladera, A. M., A. Bannasar, M. Barceló, J. Lalucat, and E. García-Valdés. 2004. Comparative genetic diversity of *Pseudomonas stutzeri* genomovars, clonal structure, and phylogeny of the species. *J. Bacteriol.* **186**:5239–5248.
11. Cowan, S. T., and K. J. Steel. 1974. *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
12. El Fantroussi, S., and S. N. Agathos. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:268–275.
13. Ferrero, M., et al. 2002. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:957–962.
14. Frapolli, M., M. Défago, and Y. Moëne-Loccoz. 2007. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* sp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environ. Microbiol.* **9**:1939–1955.
15. García-Valdés, E., E. Cozar, R. Rotger, J. Lalucat, and J. Ursing. 1988. New naphthalene-degrading marine *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2478–2485.
16. Holland, S. M. 2003. Analytic rarefaction user's manual, version 1.3 (available at <http://www.uga.edu/strata/software/index.html>). University of Georgia, Athens, GA.
17. Khan, N. H., et al. 2007. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb. Ecol.* **53**:173–186.
18. Lalucat, J., A. Bannasar, R. Bosch, E. García-Valdés, and N. J. Palleroni. 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:510–547.
19. Lane, D. 1991. 16S/23S sequencing, p. 115–175. In E. G. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
20. Lanfrancini, M. P., R. Bosch, and B. Nogales. 2010. Short-term changes in the composition of active marine bacterial assemblages in response to diesel oil pollution. *Microb. Biotechnol.* **3**:607–621.
21. Locatelli, L., et al. 2002. Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of 16S rDNA and the whole 16S-23S rDNA spacer. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**:220–227.
22. Lorenz, M. G., and W. Wackernagel. 1991. High frequency of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil extract supplemented with a carbon/energy and phosphorus source. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1246–1251.
23. Madsen, E. L. 2002. Horizontal transfer of naphthalene catabolic genes in a toxic waste site, p. 37–44. In M. Syvanen and C. L. Kado (ed.), *Horizontal gene transfer*. Academic Press, London, United Kingdom.
24. Mulet, M., J. Lalucat, and E. García-Valdés. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* **12**:1513–1530.
25. Mulet, M., A. Bannasar, J. Lalucat, and E. García-Valdés. 2009. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Mol. Cell. Probes* **23**:140–147.
26. Mulet, M., et al. 2008. Phylogenetic analysis and siderotyping as useful tools in the taxonomy of *Pseudomonas stutzeri*: description of a novel genomovar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:2309–2315.
27. Palleroni, N. J., D. H. Pieper, and E. R. B. Moore. 2010. Microbiology of hydrocarbon-degrading *Pseudomonas*. In K. N. Timmis, T. McGenity, J. R. van der Meer, and V. de Lorenzo (ed.), *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, vol. 3: microbes and communities utilizing hydrocarbons. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
28. Pearson, W. R., and D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:2444–2448.
29. Rius, N., M. C. Fusté, C. Guasp, J. Lalucat, and J. G. Loren. 2001. Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.* **183**:736–744.
30. Romanenko, L. A., et al. 2005. *Pseudomonas xanthomarina* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **51**:65–71.
31. Sikorski, J., M. Möhle, and W. Wackernagel. 2002. Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment and soils. *Environ. Microbiol.* **4**:465–476.
32. Smalla, K. 2004. Culture-independent microbiology, p. 88–99. In A. T. Bull (ed.), *Microbial diversity and bioprospecting*. ASM Press, Washington, DC.
33. Widmer, F., R. J. Seidler, P. M. Gillevet, L. S. Watrud, and G. D. Di Giovanni. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2545–2553.
34. Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 241–245. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York, NY.
35. Yamamoto, S., et al. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146**:2385–2394.
36. Yamamoto, S., and S. Harayama. 1998. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:813–819.



## *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., isolated from crude oil-contaminated intertidal sand samples after the Prestige oil spill<sup>☆</sup>

David Sánchez<sup>a</sup>, Magdalena Mulet<sup>a</sup>, Ana C. Rodríguez<sup>a</sup>, Zoyla David<sup>a</sup>, Jorge Lalucat<sup>a,b</sup>, Elena García-Valdés<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Microbiología, Departament de Biologia, Edifici Guillem Colom, Universitat de les Illes Balears, Campus UIB, 07122 Palma de Mallorca, Spain

<sup>b</sup> Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (IMEDEA, CSIC-UIB), Campus UIB, 07122 Palma de Mallorca, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 June 2013

Received in revised form 5 September 2013

Accepted 6 September 2013

#### Keywords:

*Pseudomonas* sp. nov.

Bacteria

Taxonomy

### ABSTRACT

Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 were isolated from the Atlantic intertidal shore from Galicia, Spain, after the Prestige oil spill. Both strains were Gram-negative rod-shaped bacteria with one polar inserted flagellum, strictly aerobic, and able to grow at 18–37 °C, pH 6–10 and 2–10% NaCl. A preliminary analysis of the 16S rRNA and the partial *rpoD* gene sequences indicated that these strains belonged to the *Pseudomonas* genus but were distinct from any known *Pseudomonas* species. A polyphasic taxonomic approach including phylogenetic, chemotaxonomic, phenotypic and genotypic data confirmed that the strains belonged to the *Pseudomonas pertucinogena* group. In a multilocus sequence analysis, the similarity of VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 to the closest type strain of the group, *Pseudomonas pachastrellae*, was 90.4%, which was lower than the threshold of 97% established to discriminate species in the *Pseudomonas* genus. The DNA–DNA hybridisation similarity between strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 was 79.6%, but below 70% with the type strains in the *P. pertucinogena* group. Therefore, the strains should be classified within the genus *Pseudomonas* as a novel species, for which the name *Pseudomonas aestusnigri* is proposed. The type strain is VGXO14<sup>T</sup> (=CCUG 64165<sup>T</sup> = CECT 8317<sup>T</sup>).

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

The bacteria of the genus *Pseudomonas* are Gram-negative, strictly oxidative rods within the *Gammaproteobacteria* that are motile by polar flagella [17]. The genus *Pseudomonas* is ubiquitous, metabolically versatile, and important for the recycling of elements in the environment. *Pseudomonas* is the genus of Gram-negative bacteria with the highest number of species, and new species are described continuously. In 2012, two novel species were added to the genus: *P. nitritireducens* [22] and *P. sagittaria* [9]. At the time of this manuscript's composition, 139 validated species were listed in Euzéby' list of prokaryotic names with standing in nomenclature (2013) (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

The characterisation of *Pseudomonas*-type strains by multilocus sequence analysis (MLSA), and concatenating the 16S rDNA,

*gyrB*, *rpoD* and *rpoB* genes permitted the establishment of two main lineages, *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*, which were divided into several groups (G) and subgroups (SG). Some type strains did not belong to any of these lineages, since they were located in an independent phylogenetic branch, including those representing the species *P. oryzihabitans*, *P. psychrotolerans*, *P. luteola*, *P. pertucinogena* and *P. pachastrellae* [14]. In 2012, five type strains were analysed by MLSA and they were shown to be phylogenetically close to *P. pertucinogena*. The strains are now considered to be members of a new group, the *P. pertucinogena* group [15], which is represented by type strains *P. bauzanensis* DSM 22558<sup>T</sup> [23], *P. litoralis* CECT 7670<sup>T</sup> [18], *P. pelagia* JCM 15562<sup>T</sup> [2], *P. sabulinigri* KCTC 22137<sup>T</sup> [5] and *P. xiamenensis* JCM 13530<sup>T</sup> [7].

A previous study [13] on the diversity of autochthonous *Pseudomonas* populations in two contaminated beaches after the Prestige oil spill (Carnota municipality, Galicia, north-western Spain) in November 2002, rendered 102 *Pseudomonas* isolates from intertidal sand contaminated with crude oil. From this analysis, several isolates were considered as possible new species. These results were confirmed by the analysis of partial sequences of the sigma 70 subunit of RNA polymerase, encoded by the *rpoD* gene. A deep taxonomic study of the characteristics of two of these strains is presented. A new *Pseudomonas* species in the *P. pertucinogena* group, with isolate VGXO14<sup>T</sup> as the type strain, is proposed. Strain

<sup>☆</sup> The GenBank/EMBL/DDJB accession numbers for the nucleotide sequences reported in this study are: HG004394 (strain *P. aestusnigri* VGXO14<sup>T</sup> 16S rRNA), HG004395 (strain *P. aestusnigri* Vi1 16S rRNA), HG004396 (strain *P. aestusnigri* VGXO14<sup>T</sup> *gyrB* gene) and HG004397 (strain *P. aestusnigri* Vi1 *gyrB* gene).

\* Corresponding author at: Microbiología, Departament de Biologia, Edifici Guillem Colom, Universitat de les Illes Balears, Ctra. de Valldemosa Km 7,5, 07122 Palma de Mallorca, Spain. Tel.: +34 971 173141; fax: +34 971 173184.

E-mail address: [elena.garciavaldes@uib.es](mailto:elena.garciavaldes@uib.es) (E. García-Valdés).

VGXO14<sup>T</sup> was deposited in two culture collections under accession numbers CCUG 64165<sup>T</sup> and CECT 8317<sup>T</sup>.

## Materials and methods

### *Pseudomonas* strains and growth conditions

Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 have been isolated from intertidal sand contaminated by Prestige crude oil from two different sites at Praia da Seda beach (Lariño municipality; Lat. 42°46′–29.27″ N, Long. 9°7′27.08″ W). VGXO14<sup>T</sup> was isolated in September 2004, after growth in marine mineral medium (MMM) [13] with 1 g L<sup>-1</sup> potassium nitrate (0.11 M) under anaerobic conditions (Gaspak; Oxoid) and with 5 g L<sup>-1</sup> glycerol as a carbon source. Vi1 was isolated in March 2004, after selection by a previous enrichment in MMM with hexadecane as the only carbon and energy source, and subsequent growth in glycerol under the same conditions as described for VGXO14<sup>T</sup> [13]. Bacteria were cultured at 30 °C and checked for purity on Luria-Bertani medium (LB) [12] or nutrient agar No. 2 (Fluka).

A list of the bacterial strains studied is provided in supplementary Table S1. The following type strains of the *P. pertucinogena* group were included in the study as representatives of closely related species: *P. bauzanensis*, *P. litoralis*, *P. pachastrellae*, *P. pelagia*, *P. pertucinogena*, *P. sabulinigri* and *P. xiamenensis*. For biomass recovery, strains were cultured routinely at 30 °C on LB medium.

### DNA extraction, PCR amplification, DNA sequencing conditions and sequence analysis

The DNA extraction, PCR amplification, primers used and DNA sequencing conditions, as well as the sequence analysis procedures, were previously described by Mulet et al. [14]. The amplified product was purified with Montage PCR filter units (Millipore).

### Individual and concatenated trees

A series of individual trees based on the 16S rRNA, *gyrB* and *rpoD* partial gene alignments was generated. A concatenated analysis of these three genes was also performed [14] and compared with the corresponding sequences of all *Pseudomonas* species type strains described up to 2012. The Jukes-Cantor [3], maximum likelihood [1] and maximum parsimony [16] algorithms were used for the comparisons.

### DNA fingerprinting

Primer sequences corresponding to enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) elements (ERIC1R: 5′-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3′ and ERIC2: 5′-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3′) [21] and BOX elements (BoxA1R: 5′-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′) [6] were used for DNA fingerprinting. The PCR conditions were as follows: DNA denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles (94 °C for 1 min, 52 °C or 53 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min), and finally 72 °C for 10 min for the ERIC-PCR or BOX-PCR respectively. The DNA fragments were analysed in a 2% agarose gel.

### DNA–DNA hybridisation (DDH)

Genomic DNA was isolated by a previously described method [10]. DNA–DNA hybridisation similarity values were calculated in duplicate using a non-radioactive method, as previously described [24]. DNA–DNA hybridisation experiments were performed using the genomic DNA of *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup> and VGXO14<sup>T</sup>

as probes against the other strains studied (Supplementary Table S1). *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup> and VGXO14<sup>T</sup> DNAs were double-labelled with DIG-11-dUTP and biotin-16-dUTP using a nick-translation kit (Roche). Colour development was monitored at 405 nm using an iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad).

### Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry

To determine the whole-cell protein profile, a matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis of strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1, and their closely related type strains, was carried out at the Scientific-Technical Services (University of Balearic Islands, Spain). Strains were cultured on LB plates at 30 °C for 24–48 h. One microlitre of the extract (these extracts were obtained based on the ethanol/formic acid extraction procedure of Bruker Daltonics) was placed onto a spot of a ground steel plate. Each sample was overlaid with 1 µL of matrix solution (saturated solution of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid) and air dried at room temperature. Measurements were performed on an Autoflex III MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Leipzig, Germany). Spectra were recorded in the linear, positive mode in the mass range 2–20 kDa (IS1 = 20 kV, IS2 = 18.7 kV, lens = 6.50 kV, and PIE = 200 ns).

For each spectrum, approximately 500 shots were collected from different positions. The profile obtained for each species was analysed and compared, and the corresponding dendrogram was generated using the MALDI BioTyper software (version 1.0; Bruker Daltonics).

### Whole-cell fatty acid methyl ester (FAME) analysis

FAME analysis was performed at the Spanish Type Culture Collection, CECT, Valencia, Spain (<http://cect.org/english>). Strains were cultured for 24 h in trypticase soy agar at 28 °C. Fatty acids were extracted and prepared according to standard protocols as described for the MIDI Microbial Identification System [20]. Cellular fatty acid content was analysed by gas chromatography with an Agilent 6850 unit, with the MIDI Microbial Identification System using the RTSBA6 method [11] and the Sherlock Microbial Identification software package version 6.1.

### Biochemical and physiological characterisation

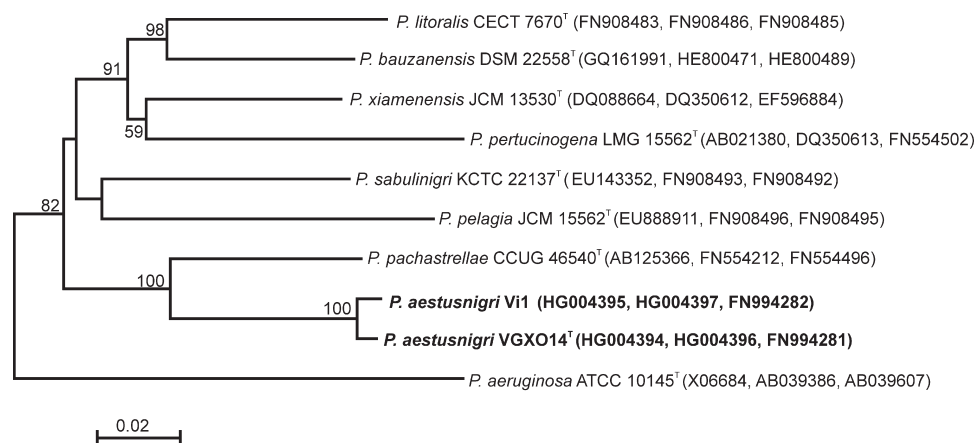
The presence of fluorescent pigments was tested on King B medium (*Pseudomonas* agar F, Difco), and pyocyanin production was tested on King A medium (*Pseudomonas* agar P, Difco). Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 were characterised phenotypically using API 20 NE strips (bioMérieux) and Biolog GN2 MicroPlates (Biolog, Hayward, CA). Growth temperatures (4, 15, 20, 30, 37 and 42 °C) were determined in LB medium, whereas growth in the presence of NaCl (0–10%, w/v) and pH ranges (3–10) were observed in nutrient broth (Merck).

Cell size, morphology and flagella insertion were determined by transmission electron microscopy of cells from the exponential growth phase in LB. A Hitachi model H600 electron microscope was used at 75 kV. The samples were negatively stained with phosphotungstic acid (1%, pH 7.0), as described by Lalucat [8].

## Results and discussion

### Phylogenetic analysis

The *P. pertucinogena* group has experienced a significant increase in the number of newly described species compared with



**Fig. 1.** Phylogenetic tree based on the concatenated 16S rRNA, *gyrB* and *rpoD* genes of *P. aestusnigri* and phylogenetically close members of *Pseudomonas*. Distance matrices were calculated by the Jukes-Cantor method. Dendrograms were generated by the neighbour-joining method. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup> was used as an outgroup. The bar indicates sequence divergence. Percentage bootstrap values of more than 50% (from 1000 replicates) are indicated at the nodes. GenBank accession numbers are given in parentheses in the following order: 16S rRNA, *gyrB* and *rpoD* genes.

the other groups in recent years. In 2004, this group contained only *P. pertucinogena* [4], whereas one year later, *P. pachastrellae* [19] was described, and in the following years, several other species were added, including *P. xiamenensis* [7], *P. pelagia* [2], *P. sabulinigri* [5], *P. bauzanensis* [23] and *P. litoralis* [18], as shown in supplementary Fig. S1.

A preliminary comparative analysis of the partial sequences of the *rpoD* gene from all the *Pseudomonas* type strains revealed that strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 could have been representatives of a new species [13]. A complete phylogenetic analysis has now been completed, with the inclusion of the sequences of the 16S rRNA (1283 nucleotides) and *gyrB* (802 nucleotides) genes, together with an enlarged *rpoD* (741 nucleotides) gene sequence comprising 2826 nt. These sequences have been aligned and compared with the 133 *Pseudomonas* type strains in the data presented by Mulet et al. [15]. In all individual and concatenated gene trees studied, VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 were located in the same branch independently from the other type strains in the *P. pertucinogena* group, with *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup> being the closest strain to the group (Fig. 1 and Supplementary Fig. S2). High bootstrap values supported these tree branches (16S rRNA 100%, *gyrB* gene 66%, *rpoD* gene 99% and concatenated 100%). The concatenated tree showed that the closest type strain to strain VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 was *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup> (90.4% similarity for both) (Supplementary Table S2). Similar results with high bootstrap values were obtained when maximum likelihood and maximum parsimony algorithms were used (Supplementary Fig. S2).

The lowest similarity in the concatenated analysis within the *P. pertucinogena* group was 81.8% between *P. pelagia* JCM 15562<sup>T</sup> and *P. pertucinogena* LMG 1874<sup>T</sup>, whereas the highest similarity was 90.3% between *P. bauzanensis* DSM 22558<sup>T</sup> and *P. xiamenensis* JCM 13530<sup>T</sup>. The intragroup average similarity value calculated for members of the *P. pertucinogena* group was 88.2%. The distance to *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup>, which is the type species of the *Pseudomonas* genus, was 81.6% (Supplementary Table S2). The 90.4% similarities between strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 and *P. pachastrellae* affiliated both strains to the *P. pertucinogena* group; however, this similarity was lower than 97%, which is the threshold established for discriminating species in the genus *Pseudomonas* by MLSA of three concatenated genes [14]. Therefore, since strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 could not be affiliated to any *Pseudomonas* species previously described they should be considered as representatives of a new species. Both strains had 99% similarity in the concatenated analysis.

### Total DNA fingerprinting

The analysis by ERIC and BOX PCRs showed that isolates VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 were representatives of two different strains (Supplementary Fig. S3). The strains shared twelve identical bands in the ERIC-PCR but each one had two additional bands (550 pb and approximately 3000 pb in VGXO14<sup>T</sup>, and 575 pb and approximately 3500 pb in Vi1). In the BOX-PCR, both strains shared six bands and one extra band was detected in strain Vi1 (350 pb). The DNA profiles were also different from that of the type strain of *P. pachastrellae*.

### DNA–DNA hybridisation experiments (DDH)

All type strains showed DDH similarity values below 40% with VGXO14<sup>T</sup>-labelled DNA, which was clearly below the 70% established for species DNA–DNA hybridisation discrimination. Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 showed 80% total DNA–DNA hybridisation similarity between them, indicating that they both belonged to the same species. Similarities with labelled DNA of *P. pachastrellae* were lower than 70% with the other strains tested in the group. These results confirmed that strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 were not members of any other previously described species (Table 1).

### Chemotaxonomic analysis

The dendrogram obtained by WC-MALDI-TOF MS analysis showed that strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 clustered together at 90% similarity and that the similarity to the other strains was less than 35%. The *P. pachastrellae* type strain was the closest strain (Supplementary Fig. S4), and the distances to the other strains in the *P. pertucinogena* group were higher than 30%. In the MALDI-TOF MS analysis, VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 showed four common *m/z* peaks (supermass values) that were not present in *P. pachastrellae*, the closest type strain: 4808 *m/z*; 6189–6191 *m/z*; 7007–7008 *m/z*; 9622 *m/z* (Supplementary Fig. S5). These data further supported the conclusion that both strains represented a distinct species that was separated from all other species of the *Pseudomonas* genus, even at the level of expression of the most abundant cellular proteins.

Fatty acid profiles were similar in strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 (Table 2). Major cell fatty acids (CFAs) for the two strains were summed feature 8 (C<sub>18:1</sub> ω6c and/or C<sub>18:1</sub> ω7c; 33.3–34.5%), summed feature 3 (C<sub>16:1</sub> ω7c and/or C<sub>16:1</sub> ω6c; 25.3–25.8%), C<sub>16:0</sub> (16.3–16.2%), C<sub>12:0</sub> (9.5–8.9%), C<sub>10:0</sub> 3-OH (5.6–5.3%) and C<sub>12:0</sub> 3-OH (4.8–4.7%), whereas all other detected CFA values were lower than

**Table 1**  
DNA–DNA hybridisation similarity values and gene sequence similarities between *P. aestusnigri* VGXO14<sup>T</sup> and closely related *Pseudomonas* species.

Bacterial strains	Reassociation (%) <sup>a</sup> with labelled DNA from		Gene sequence similarities (%) with respect to strain VGXO14 <sup>T</sup>	
	<i>P. aestusnigri</i> VGXO14 <sup>T</sup>	<i>P. pachastrellae</i> CCUG 46540 <sup>T</sup>	16S rRNA	MLSA
<i>P. aestusnigri</i> VGXO14 <sup>T</sup>	100	50.0 <sup>b</sup>	100	100
<i>P. aestusnigri</i> Vi1	79.6	66.6	100	99.0
<i>P. pachastrellae</i> CCUG 46540 <sup>T</sup>	32.0 <sup>b</sup>	100	99.1	90.4
<i>P. bauzanensis</i> DSM 22558 <sup>T</sup>	24.3	47.0	95.3	85.1
<i>P. litoralis</i> CECT 7670 <sup>T</sup>	25.2	35.7	95.3	85.0
<i>P. pertucinogena</i> LMG 1874 <sup>T</sup>	24.1	48.6	94.3	82.8
<i>P. pelagia</i> JCM 15562 <sup>T</sup>	26.6	47.8	95.1	83.2
<i>P. sabulinigri</i> KCTC 22137 <sup>T</sup>	29.4	27.7	95.9	85.9
<i>P. xiamenensis</i> JCM 13530 <sup>T</sup>	29.7	35.8	95.2	86.2

<sup>a</sup> Pooled standard deviations in DDH experiments were 0.38–0.40 and 0.69–0.82 (with labelled DNA from *P. aestusnigri* VGXO14<sup>T</sup> and *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup>, respectively). Reassociation values are means of two determinations.

<sup>b</sup> Similarity values are means of four determinations in two different experiments.

2%. The only difference detected in the fatty acid profiles between the two strains was iso-C<sub>16:0</sub> (0.4%) that was present as a low percentage in strain VGXO14<sup>T</sup> but not in strain Vi1. Both strains could be differentiated from *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup> by the fatty acid C<sub>17:1</sub> cyclo, by traces of C<sub>17:1</sub> ω8c and C<sub>11:0</sub> 3-OH, and by summed feature 3 and 8.

#### Biochemical and physiological characterisation

Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 were Gram-negative, rod-shaped bacteria (0.6–0.7 μm wide and 1.6–2.0 μm long). Cells were motile, and single polar flagella were observed under transmission electron microscopy (Supplementary Fig. S6). Strain VGXO14<sup>T</sup> was positive for catalase and oxidase activities. After incubation for 48 h at 30 °C on LB plates, colonies were round, convex, beige colour, bright and with entire margins (1–3 mm in diameter). Strain VGXO14<sup>T</sup> was able to grow in liquid LB at 18–37 °C for 24 h but showed slow growth at 42 °C after one week of incubation. No growth was detected at 4 °C. Growth was observed in nutrient broth in

the presence of 2–10% NaCl (w/v) and the pH range was 6–10. Strains VGXO14<sup>T</sup>, Vi1 and all the other strains in the *P. pertucinogena* group failed to produce either fluorescent pigments or pyocyanin when cultured for 24–48 h at 30 °C on King B or King A medium. Differential phenotypic characteristics are indicated in Table 3. Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 showed identical patterns of carbon assimilation and enzymatic activity in the API 20 NE strips. Although the sand samples were enriched with denitrifying bacteria in the early stages of isolation, neither strain in pure culture was able to reduce nitrate to nitrite or to denitrify. Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 could be differentiated from *P. pachastrellae* by the assimilation of malic acid and trisodium citrate. All type strains in the *P. pertucinogena* group, including strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1, were negative for indole production, glucose fermentation, arginine dihydrolase, urease, aesculin hydrolysis, gelatine hydrolysis, β-galactosidase, and assimilation of D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, potassium gluconate and phenylacetic acid. No phenotypic test in the API 20 NE strips was positive for all the strains tested.

**Table 2**  
Cell fatty acid (CFA) profiles of *P. aestusnigri* VGXO14<sup>T</sup>, Vi1, and all type strains of the *P. pertucinogena* group. Strains: 1. VGXO14<sup>T</sup>; 2. Vi1; 3. *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup>; 4. *P. bauzanensis* DSM 22558<sup>T</sup>; 5. *P. litoralis* CECT 7670<sup>T</sup>; 6. *P. pelagia* JCM 15562<sup>T</sup>; 7. *P. pertucinogena* LMG 1874<sup>T</sup>; 8. *P. sabulinigri* KCTC 22137<sup>T</sup>; 9. *P. xiamenensis* JCM 13530<sup>T</sup>.

Fatty acid (%)	1	2	3	4 <sup>b</sup>	5 <sup>c</sup>	6 <sup>c</sup>	7 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup>	9 <sup>c</sup>
C <sub>10:0</sub>	TR	TR	TR	TR	–	–	–	–	–
C <sub>12:0</sub>	8.9	9.5	10.1	4.5	7.9	8.1	6.1	7.6	9.3
C <sub>13:0</sub>	–	–	–	–	–	TR	1.3	–	–
C <sub>14:0</sub>	TR	1.0	1.6	TR	TR	TR	1.5	1.0	TR
C <sub>16:0</sub>	16.2	16.3	16.9	9.9	18.5	11.8	7.9	18.5	16.1
C <sub>17:0</sub>	–	–	–	TR	TR	TR	3.3	TR	3.0
C <sub>18:0</sub>	TR	TR	TR	TR	1.2	1.0	TR	1.5	1.1
C <sub>15:1</sub> ω6c	–	–	–	TR	TR	TR	1.5	TR	–
C <sub>17:1</sub> ω8c	TR	TR	–	TR	TR	1.1	5.3	TR	TR
C <sub>18:1</sub> ω9c	–	–	–	TR	–	–	–	–	–
iso-C <sub>16:0</sub>	TR	–	–	–	–	–	–	–	–
iso-C <sub>17:0</sub>	–	–	–	–	TR	TR	1.6	1.2	–
anteiso-C <sub>17:0</sub>	–	–	–	–	–	–	TR	1.4	–
C <sub>10:0</sub> 3-OH	5.3	5.6	3.9	2.0	3.0	3.1	3.7	2.5	3.5
C <sub>11:0</sub> 3-OH	TR	TR	–	TR	TR	TR	1.7	TR	–
C <sub>12:0</sub> 3-OH	4.7	4.8	5.1	1.9	4.2	4.4	3.4	4.0	4.5
C <sub>16:0</sub> 3-OH	–	–	–	TR	–	–	–	–	–
C <sub>18:0</sub> 3-OH	–	–	–	–	–	–	2.0	–	–
C <sub>17:0</sub> cyclo	1.3	1.3	–	7.4	8.9	4.4	9.0	1.2	5.1
C <sub>19:0</sub> cyclo ω8c	–	–	–	2.9	1.8	1.3	3.8	TR	–
Summed feature 3 <sup>a</sup>	25.3	25.8	34.5	10.3	18.1	24.6	14.3	20.4	12.8
Summed feature 7 <sup>a</sup>	TR	TR	TR	–	–	–	–	–	–
Summed feature 8 <sup>a</sup>	34.5	33.3	26.9	54.8	32.6	35.4	25.7	36.8	42.5

<sup>a</sup> Summed feature represents a set of more than one CFA that could not be resolved; summed feature 3 contained C<sub>16:1</sub> ω7c and/or C<sub>16:1</sub> ω6c; summed feature 7 contained unknown 18.846, C<sub>19:1</sub> ω6c and/or C<sub>19:0</sub> cyclo ω10c; summed feature 8 contained C<sub>18:1</sub> ω6c and/or C<sub>18:1</sub> ω7c; –, not detectable; TR, trace amount (<1%).

<sup>b</sup> Data from Zhang et al. [23].

<sup>c</sup> Data from Pascual et al. [18].



**Table 3**

Differential phenotypic characteristics of VGXO14<sup>T</sup> from related species of the genus *Pseudomonas*. Strains: (1) VGXO14<sup>T</sup>; (2) Vi1; (3) *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup>; (4) *P. bauzanensis* DSM 22558<sup>T</sup>; (5) *P. litoralis* CECT 7670<sup>T</sup>; (6) *P. pertucinogena* LMG 1874<sup>T</sup>; (7) *P. sabulinigri* KCTC 22137<sup>T</sup>; and (8) *P. xiamenensis* JCM 13530<sup>T</sup>.

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8
Range for growth at <sup>a</sup>								
Temperature (°C)	18–37	18–37	7–41	5–30	15–37	ND	4–37	10–45
NaCl (%) (w/v)	2–10	0–8	0–10	0–7	0–15	ND	0–10	0–8
pH	6–10	6–10	ND	7–8	ND	ND	5.5–10	ND
Assimilation of (API 20 NE test)								
Capric acid	+	+	+	–	w	–	+	+
Adipic acid	+	+	w	+	+	w	+	–
Malic acid	–	–	+	+	w	w	–	+
Trisodium citrate	–	–	+	+	–	–	–	+
Carbon sources (Biolog GN2)								
α-Cyclodextrin	–	–	+	–	–	–	–	–
Dextrin	+	–	w	–	+	+	+	+
Glycogen	–	–	–	w	–	w	+	w
L-Arabinose	–	–	+	+	+	+	+	+
α-D-Glucose	–	–	–	w	+	–	–	–
Lactulose	–	–	–	+	–	–	w	–
Methyl pyruvate	+	+	+	–	+	+	+	+
Mono-methyl-succinate	+	–	+	+	+	+	–	+
Acetic acid	+	–	–	+	+	+	w	+
Cis-aconitic acid	–	–	–	–	+	–	–	+
Citric acid	–	–	–	–	w	+	–	+
D-Galacturonic acid	–	–	–	–	+	w	–	–
D-Glucuronic acid	–	–	–	–	+	–	–	–
α-Hydroxy butyric acid	–	–	–	–	–	–	–	+
β-Hydroxy butyric acid	+	–	+	+	–	+	–	+
Itaconic acid	–	–	–	+	–	–	–	–
α-Keto butyric acid	–	–	–	–	+	–	–	+
α-Keto glutaric acid	–	–	+	+	+	–	–	w
α-Keto valeric acid	–	–	–	–	+	–	–	w
D,L-Lactic acid	+	+	+	+	+	–	+	+
Propionic acid	+	–	–	+	+	+	–	+
Quinic acid	–	–	–	–	–	–	–	+
Succinic acid	+	–	+	+	+	+	+	+
Bromo succinic acid	+	–	+	+	+	+	–	+
Succinamic acid	w	–	+	w	w	w	w	w
L-Alaninamide	w	–	–	+	+	+	–	+
D-Alanine	w	–	–	+	+	+	w	+
L-Asparagine	+	–	+	–	–	–	+	–
L-Glutamic acid	w	–	+	–	+	+	+	–
L-Leucine	–	–	–	–	+	–	–	–
L-Proline	+	–	w	–	+	–	+	+
L-Pyroglutamic acid	–	–	–	–	–	–	+	–
D-Serine	–	–	–	w	–	+	–	+
L-Serine	–	–	–	–	–	+	–	w
γ-Amino butyric acid	+	–	–	–	–	+	–	–
Thymidine	–	–	–	+	–	w	–	w
Glucose-6-phosphate	+	–	–	–	–	–	–	–

Unless otherwise indicated all data were obtained in this study. In the API 20 NE test, all strains were negative for reduction of nitrate to nitrite and denitrification, indole production, glucose fermentation, arginine dihydrolase, urease, aesculin hydrolysis, gelatine hydrolysis, β-galactosidase, and assimilation of D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, potassium gluconate and phenylacetic acid. In the oxidase and catalase tests, all the strains were positive. In the Biolog GN2 test, all strains were positive for the following characteristics: L-alanine, sebatic acid, Tween 40 and Tween 80; and were negative or weak for the utilisation of the other substrates. Positive (+), negative (–), weak (w) and not determined (ND).

<sup>a</sup> Growth at different temperatures, % (w/v) [NaCl] and pH range for other closely related *Pseudomonas* type strains were taken from Romanenko et al. [19], Lai et al. [7], Kim et al. [5], Zhang et al. [23] and Pascual et al. [18].

In the Biolog GN2 plates, all the type strains, as well as strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1, were able to oxidise the following substrates: L-alanine, sebatic acid, Tween 40 and Tween 80. A large number of the carbon sources tested were not used. All strains in this study showed a negative or weak assimilation of a high percentage of the substrates tested (75–80%). This limited carbon utilisation differentiates species in the *P. pertucinogena* group from other species in the genus *Pseudomonas* [5,19]. Strains VGXO14<sup>T</sup> and Vi1 were not able to oxidise L-arabinose, which represented a difference from the rest of the strains studied in the group.

Considering the phylogenetic, chemotaxonomic, genotypic and phenotypic characteristics presented, we propose a new species, *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov., with *P. aestusnigri* VGXO14<sup>T</sup> as the type strain.

### Description of *Pseudomonas aestusnigri* sp. nov.

*P. aestusnigri* (*aestusnigri*: a.es.tus.ni'gri. L. n. aestus, tide; L. adj. niger-gra-grum, black; N.L. gen. n. aestusnigri, of black tide).

Cells are Gram-negative, non-pigmented, rod-shaped (1.6–2.0 μm long and 0.6–0.7 μm wide) and are mobile by means of one polar flagellum. Cells are catalase-positive, oxidase-positive, strictly aerobic and non fermentative. The colonies are round, convex, colour beige, bright and with entire margins (1–3 mm diameter) on LB plates after incubation for 48 h at 30 °C. Growth occurs at 18–42 °C (optimal temperature is 25–30 °C), at a pH of 6–10 and with 2–10% (w/v) NaCl. In API 20 NE tests, the strains are positive for assimilation of capric acid and adipic acid. In Biolog GN2 Microplate tests, the strains are positive for utilisation of

Tween 40, Tween 80, pyruvic acid methyl ester, D,L-lactic acid, sebacic acid and L-alanine; and weak, negative or variable for the utilisation of the other substrates. The predominant fatty acids are summed feature 8 (C<sub>18:1</sub> ω6c and/or C<sub>18:1</sub> ω7c), summed feature 3 (C<sub>16:1</sub> ω7c and/or C<sub>16:1</sub> ω6c), C<sub>16:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, C<sub>10:0</sub> 3-OH and C<sub>12:0</sub> 3-OH. The type strain VGXO14<sup>T</sup> (CECT 8317 and CCUG 64165) was isolated from a crude oil-contaminated intertidal sand, Galicia, Spain.

### Acknowledgments

We are indebted to Dr. J. Euzèby for correcting the etymology and protologue. Financial support was obtained from the Spanish MINECO through projects CGL2011-24318 and Consolider CSD2009-00006, as well as funds for competitive research groups from the Government of the Balearic Islands (the latter two funds with FEDER cofunding). D. Sánchez was the recipient of a pre-doctoral fellowship from the Conselleria d'Interior, Direcció General de Recerca, Desenvolupament Tecnològic i Innovació del Govern de les Illes Balears (FPI09) and European Social Fund (ESF).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.09.004>.

### References

- [1] Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
- [2] Hwang, C.Y., Zhang, G.I., Kang, S.H., Kim, H.J., Cho, B.C. (2009) *Pseudomonas pelagia* sp. nov., isolated from a culture of the Antarctic green alga *Pyramimonas gelidicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 3019–3024.
- [3] Jukes, T., Cantor, C. (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, pp. 21–132.
- [4] Kawai, Y., Yabuuchi, E. (1975) *Pseudomonas pertucinogena* sp. nov., an organism previously misidentified as *Bordetella pertussis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25, 317–323.
- [5] Kim, K.H., Roh, S.W., Chang, H.W., Nam, Y.D., Yoon, J.H., Jeon, C.O., Oh, H.M., Bae, J.W. (2009) *Pseudomonas sabulinigri* sp. nov., isolated from black beach sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 38–41.
- [6] Koeuth, T., Versalovic, J., Lupski, J.R. (1995) Differential subsequence conservation supports the mosaic nature of interspersed repetitive BOX elements in bacteria. *Genome Res.* 5, 408–418.
- [7] Lai, Q., Shao, Z. (2008) *Pseudomonas xiamenensis* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1911–1915.
- [8] Lalucat, J. (1988) Analysis of Refractile (R) bodies, in: Mayer, E. (Ed.), *Methods in Microbiology – Electron Microscopy in Microbiology*, vol. 20, Academic Press, London, pp. 79–90.
- [9] Lin, S.Y., Hameed, A., Liu, Y.C., Hsu, Y.H., Lai, W.A., Chen, W.M., Shen, F.T., Young, C.C. (2012) *Pseudomonas sagittaria* sp. nov., a novel siderophore-producing bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.045567-0>.
- [10] Marmur, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208–218.
- [11] MIDI, 2008 Sherlock Microbial Identification System Operating Manual, version 6.1, MIDI Inc., Newark, DE.
- [12] Miller, J.H. 1972 *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- [13] Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2011) *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1076–1085.
- [14] Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12, 1513–1530.
- [15] Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sánchez, D., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2012) Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 455–464.
- [16] Nei, M., Kumar, S. 2000 *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York.
- [17] Palleroni, N.J. (1984) Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894, in: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, M.D., pp. 141–199.
- [18] Pascual, J., Lucena, T., Ruvira, M.A., Giordano, A., Gambacorta, A., Garay, E., Arabal, D.R., Pujalte, M.J., Macián, M.C. (2012) *Pseudomonas litoralis* sp. nov., isolated from Mediterranean seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 438–444.
- [19] Romanenko, L.A., Uchino, M., Falsen, E., Frolova, G.M., Zhukova, N.V., Mikhailov, V.V. (2005) *Pseudomonas pachastrellae* sp. nov., isolated from a marine sponge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 919–924.
- [20] Sasser, M. 1990 *Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids*, MIDI Technical Note 101, MIDI Inc., Newark, DE.
- [21] Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19, 6823–6831.
- [22] Wang, Y.N., He, W.H., He, H., Du, X., Jia, B., Zeng, Z.P., An, M.L., Chen, G.C. (2012) *Pseudomonas nitritireducens* sp. nov., a nitrite reduction bacterium isolated from wheat soil. *Arch. Microbiol.* 194, 809–813.
- [23] Zhang, D.C., Liu, H.C., Zhou, Y.G., Schinner, F., Margesin, R. (2011) *Pseudomonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2333–2337.
- [24] Ziemke, F., Hofle, M.G., Lalucat, J., Rossello-Mora, R. (1998) Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 179–186.