

**SELECCIÓN DE LOS MARCADORES CULTIVABLES Y MOLECULARES ÚTILES PARA  
DIFERENCIAR EL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL EN EL RÍO BOGOTÁ**



**ANDREA CATHERINE SÁNCHEZ ALFONSO**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BOGOTÁ D.C.  
2017**

**SELECCIÓN DE LOS MARCADORES CULTIVABLES Y MOLECULARES ÚTILES PARA  
DIFERENCIAR EL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL EN EL RÍO BOGOTÁ**



**ANDREA CATHERINE SÁNCHEZ ALFONSO**

Trabajo de grado para optar al título de  
**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Tutora

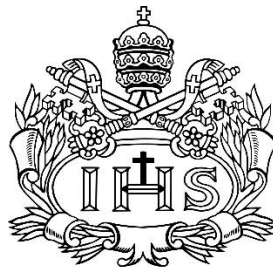
**MARÍA CLAUDIA CAMPOS PINILLA, PhD.**

Co-Tutor

**HUGO DÍEZ ORTEGA, PhD.**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BOGOTÁ D.C.  
2017**

**SELECCIÓN DE LOS MARCADORES CULTIVABLES Y MOLECULARES ÚTILES PARA  
DIFERENCIAR EL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL EN EL RÍO BOGOTÁ**



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá

**ANDREA CATHERINE SÁNCHEZ ALFONSO**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

**CLAUDIA CAMPOS, PhD.**

Tutora

**HUGO DÍEZ, PhD.**

Co - Tutor

**ANA KARINA CARRASCAL, MSc.**

Jurado

**AURA MARINA PEDROZA, PhD.**

Jurado

**CAROLINA GUZMÁN, PhD.**

Jurado

Bogotá, 19 de Julio de 2017.

**SELECCIÓN DE LOS MARCADORES CULTIVABLES Y MOLECULARES ÚTILES PARA  
DIFERENCIAR EL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL EN EL RÍO BOGOTÁ**

**ANDREA CATHERINE SÁNCHEZ ALFONSO**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

**CONCEPCIÓN J. PUERTA, PhD.**

**Decana  
Facultad de Ciencias**

---

**ALBA ALICIA TRESPALACIOS, PhD.**

**Directora de Posgrado  
Facultad de Ciencias**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946: “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

## **DEDICATORIA**

A mis padres Juan y Mercedes y a mi hermana Carolina, porque gracias a su esfuerzo, dedicación y apoyo incondicional durante todo este proceso he llegado a estas instancias, mi agradecimiento y mi amor infinito para ellos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Juan y Mercedes y a mi hermana Carolina por brindarme su apoyo incondicional en cada paso que doy, por sus consejos, enseñanzas y valores impartidos, por sus oraciones y palabras de aliento, por compartir conmigo fracasos y tristezas, éxitos, logros y alegrías y por su paciencia.

A la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Gobernación de Cundinamarca que en conjunto con la Corporación de Estudios Interdisciplinarios Básicos y Aplicados (CEIBA) me eligieron como beneficiaria de la beca del “Programa de becas de alto nivel para formación de talento humano para el Departamento de Cundinamarca” dentro del “Proyecto de Fortalecimiento del Departamento de Cundinamarca en sus Capacidades de Investigación en Ciencia, Tecnología e Innovación” del programa “Cundinamarca Innovadora con Ciencia y Tecnología” con la cual pude llevar a cabo mis estudios de maestría.

A Claudia Campos por sus enseñanzas, guía, apoyo, acompañamiento constante, paciencia y exigencia, por su confianza en mí y por su esfuerzo en la consecución de recursos económicos para llevar a cabo este trabajo.

A Hugo Díez por su colaboración y consecución de recursos para el desarrollo de las técnicas moleculares llevadas a cabo en el trabajo.

A Joan Jofre por la gestión de recursos económicos necesarios para realizar el trabajo de campo, también por toda su colaboración, aporte de conocimientos, correcciones, sugerencias y comentarios, al igual que el profesor Anicet Blanch por su aporte de conocimientos en el componente de biología molecular del trabajo de grado.

A Marylin Hidalgo por sus enseñanzas, constante guía, apoyo y aportes constructivos.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos, a Camilo Venegas y Fidson Vesga por su amistad, valiosas enseñanzas, apoyo, colaboración y disposición, por proveer un espacio y ambiente agradable de trabajo; a Luisa Riaño y Paula Castaño por su dedicación y entrega en la realización de sus respectivos trabajos de grado cuyos resultados hacen parte de este; a Juan Guillermo Martínez por su colaboración.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Bacteriología Especial, por permitirme realizar en sus instalaciones el componente de biología molecular de este trabajo y por la colaboración prestada por Paola Betancourt y Carol Colonia en la realización del mismo.

A la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR, a Néstor Franco por avalar la postulación del proyecto y a Mabel Liliana Rubio por su acompañamiento.

A los encargados de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales y de Plantas de beneficio de Bovinos y Porcinos que facilitaron la toma de muestras de aguas residuales.

A Diego Rodríguez por todo su apoyo y colaboración, por sus consejos, palabras de aliento y motivación, por compartir mis fracasos, tristezas, logros, alegrías e incertidumbres, por incentivar-me a alcanzar el éxito, lograr mis sueños y ser mejor cada día.

A mis compañeros Juliana Gil, Luis García, Stephania Parada por su apoyo y colaboración.

A mis amigas Carolina Casallas, Yuly Monroy, Mónica Monroy y Pilar Dueñas y a sus familias por su apoyo y buenos deseos.



## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	<b>16</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>1. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
1.1. Objetivo general.....	<b>21</b>
1.2. Objetivos específicos.....	<b>21</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1. Indicadores de contaminación bacteriana</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.1. Coliformes totales</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.2. <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>23</b>
<b>2.2. Indicadores de contaminación viral</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.1. Colifagos Somáticos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.2. Fagos F específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.3. Bacteriófagos que infectan cepas de <i>Bacteroides</i> spp</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3. Discriminación del origen de la contaminación</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3.1. Marcadores discriminantes cultivables</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3.2. Marcadores discriminantes moleculares</b> .....	<b>32</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1. Aislamiento de una cepa de <i>Bacteroides</i> spp. hospedera de bacteriófagos discriminantes de la contaminación por ganado bovino y porcino</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1.1. Selección de las plantas de beneficio de ganado bovino y porcino</b> .....	<b>36</b>
<b>3.1.2. Descripción de las estaciones de muestreo</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.2.1. Planta de beneficio del municipio de Zipaquirá: Empresa Frigorífico y Plaza de Ferias de Zipaquirá “EFZ”</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.2.2. Planta de beneficio del municipio de Tabio</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.2.3. Frigorífico BLE Ltda</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.3. Recolección de las muestras de contenido intestinal de origen animal</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.4. Procedimiento para el aislamiento de cepas de <i>Bacteroides</i> spp</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.4.1. Primera fase</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.4.2. Segunda fase</b> .....	<b>39</b>

3.1.4.3. Tercera fase.....	39
3.1.4.4. Cuarta fase.....	40
3.2. Evaluación de la especificidad y capacidad discriminadora de las cepas de <i>Bacteroides</i> spp. seleccionadas (Payán et al. 2005).....	41
3.3. Extracción de bacteriófagos a partir de muestras de origen humano y/o animal (Guzmán et al. 2007).....	41
3.4. Conservación de las cepas hospederas de <i>Bacteroides</i> spp. seleccionadas.....	42
3.5. Identificación de las cepas aisladas.....	42
3.6. Evaluación de indicadores de contaminación fecal cultivables.....	43
3.6.1. Descripción de las estaciones de muestreo.....	44
3.6.1.1. Plantas de tratamiento de agua residual proveniente del sacrificio de bovinos.....	46
3.6.1.2. Plantas de tratamiento de agua residual proveniente del sacrificio de porcinos.....	48
3.6.1.3. Plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas.....	50
3.6.1.4. Estaciones de muestreo en el río Bogotá.....	52
3.7. Detección y cuantificación de indicadores bacterianos no discriminantes: coliformes totales y <i>E. coli</i> (ISO 9308 - 1, 2014).....	58
3.8. Detección y cuantificación de indicadores virales no discriminantes: colifagos somáticos y bacteriófagos que infectan <i>Bacteroides fragilis</i> cepa RYC2056 e indicadores discriminantes: bacteriófagos que infectan <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> cepa GA17 y <i>Bacteroides fragilis</i> cepa PZ8 (ISO 10705 - 2 2000, ISO 10705 - 4 2001, Araujo et al. 2001).....	58
3.9. Evaluación de marcadores moleculares de <i>Bacteroidetes</i> y <i>Bifidobacterium adolescentis</i> y <i>Bifidobacterium dentium</i> .....	60
3.9.1. Procedimiento de extracción de ADN de bacterias a partir de muestras de agua residual y de materia fecal animal.....	60
3.9.2. Verificación de pureza y calidad del ADN.....	61
3.9.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para los marcadores de origen humano <i>Bacteroidetes</i> HF183F, Bact708R (Bernhard & Field 2000a, Bernhard & Field 2000b).....	61
3.9.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional para los marcadores de origen animal <i>Bacteroidetes</i> CF128F, Bact708R (Bernhard & Field 2000a, Bernhard & Field 2000b).....	61
3.9.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada para la detección e identificación molecular de <i>Bifidobacterium</i> spp. (Kaufmann et al. 1997, Matsuki et al. 1999, Bonjoch et al. 2004).....	61
3.9.6. Visualización de los productos de la PCR.....	65
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
4.1. Aislamiento de cepas de <i>Bacteroides</i> spp. indicadoras de contaminación fecal animal.....	66

4.1.1. Cepas provenientes de contenido intestinal de ganado bovino.....	66
4.1.2. Cepas provenientes de contenido intestinal de ganado porcino.....	69
4.1.3. Evaluación de la especificidad de las cepas de <i>Bacteroides</i> spp. aisladas de contenido intestinal de ganado porcino.....	71
4.2. Evaluación de marcadores no discriminantes y discriminantes de contaminación fecal en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos.....	74
4.3. Evaluación de marcadores no discriminantes y discriminantes de contaminación fecal en aguas residuales de plantas de beneficio de porcinos.....	80
4.4. Evaluación de marcadores no discriminantes y discriminantes de contaminación fecal en aguas de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas.....	88
4.5. Indicadores de contaminación fecal en aguas del río Bogotá.....	97
4.5.1. Evaluación de los indicadores de contaminación fecal cultivables no discriminantes y discriminantes en el río Bogotá.....	97
4.5.2. Evaluación de los indicadores cultivables y moleculares útiles para discriminar el origen de la contaminación fecal en el río Bogotá.....	108
5. CONCLUSIONES.....	118
6. RECOMENDACIONES.....	119
COMPLEMENTARIOS.....	120
BIBLIOGRAFÍA.....	120
ANEXOS.....	137

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Componentes de la técnica de doble capa de agar para el recuento de indicadores virales no discriminantes: colifagos somáticos (ISO 10705 - 2, 2000) y bacteriófagos que infectan la cepa de <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (ISO 10705 - 4, 2001).....	59
<b>Tabla 2.</b> Componentes de la técnica de doble capa de agar para el recuento de indicadores virales discriminantes: bacteriófagos que infectan las cepas de <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 y <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (ISO 10705 - 4, 2001).....	59
<b>Tabla 3.</b> Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, anidada y multiplex.....	63
<b>Tabla 4.</b> Cepas aisladas de muestras de contenido intestinal de ganado bovino.....	67
<b>Tabla 5.</b> Cepas aisladas de muestras de contenido intestinal de ganado porcino.....	69
<b>Tabla 6.</b> Recuento de la infección con bacteriófagos de origen porcino e identificación bioquímica y genotípica de cepas aisladas a partir del contenido intestinal de porcinos.....	71
<b>Tabla 7.</b> Evaluación de las cepas de <i>Bacteroides</i> spp. aisladas de contenido intestinal de porcino en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos, de porcinos y en agua residual doméstica.....	72
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de beneficio de bovinos del municipio de La Calera.....	75
<b>Tabla 9.</b> Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de beneficio de bovinos del municipio de Tabio.....	76
<b>Tabla 10.</b> Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales del Frigorífico de Zipaquirá.....	82

<b>Tabla 11.</b> Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales del Frigorífico BLE de Bogotá.....	<b>84</b>
<b>Tabla 12.</b> Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Guasca.....	<b>89</b>
<b>Tabla 13.</b> Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas El Salitre de la ciudad de Bogotá.....	<b>91</b>
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Cajicá.....	<b>92</b>
<b>Tabla 15.</b> Marcadores de contaminación fecal humana y animal en la cuenca alta del río Bogotá.....	<b>108</b>
<b>Tabla 16.</b> Marcadores de contaminación fecal humana y animal en la cuenca media del río Bogotá.....	<b>110</b>
<b>Tabla 17.</b> Marcadores de contaminación fecal humana y animal en la cuenca baja del río Bogotá.....	<b>112</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Área de estudio: ubicación geográfica de las plantas de beneficio animal y plantas de tratamiento de agua residual doméstica en el área de la cuenca del río Bogotá.....	45
<b>Figura 2.</b> Planta de tratamiento de agua residual de la planta de beneficio del municipio de La Calera. A. Sección de cribado. B. Tanque de aireación.....	46
<b>Figura 3.</b> Planta de tratamiento de agua residual de la planta de beneficio del municipio de Tabio. A. Sección de cribado. B. Tanque de aireación.....	47
<b>Figura 4.</b> Frigorífico de Zipaquirá.....	48
<b>Figura 5.</b> Frigorífico BLE. Zona de lavado de vísceras.....	49
<b>Figura 6.</b> Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Guasca. Sección de tanques de sedimentación.....	50
<b>Figura 7.</b> Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Cajicá. Sección de rejillas de gruesos y finos, desarenador, trampa de grasas y lagunas anaerobia, facultativa y aerobia.....	51
<b>Figura 8.</b> Área de estudio: ubicación geográfica de las estaciones de muestreo sobre el río Bogotá.....	57
<b>Figura 9.</b> Fases del proceso de aislamiento de <i>Bacteroides</i> spp. a partir de contenido intestinal de ganado bovino o porcino.....	67
<b>Figura 10.</b> Indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en la cuenca alta del río Bogotá.....	98
<b>Figura 11.</b> Indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en la cuenca media del río Bogotá.....	99
<b>Figura 12.</b> Indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en la cuenca baja del río Bogotá.....	100

## ÍNDICE DE ANEXOS

Pág.

<b>Anexo A.</b> Cadena de custodia Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos.....	<b>137</b>
<b>Anexo B.</b> Registro de la cepa <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 al GenBank: Número de acceso KY196191. <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY196191">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY196191</a> .....	<b>138</b>
<b>Anexo C.</b> Visualización de los productos de PCR de la evaluación de los marcadores moleculares discriminantes de contaminación fecal en gel de agarosa.....	<b>140</b>

## RESUMEN

La detección de microorganismos patógenos intestinales en el agua se dificulta debido al alto costo de las pruebas y al tiempo de análisis. Como alternativa, se utilizan microorganismos indicadores, los cuales no diferencian si la contaminación es de origen fecal humano o animal, ya que hacen parte del tracto digestivo de ambos. Para discriminar el origen de la contaminación fecal, se ha propuesto el uso de marcadores dependientes de cultivo y moleculares que pueden presentar especificidad geográfica, por lo que es necesario identificar aquellos aplicables en nuestro medio. El objetivo de este trabajo fue seleccionar los marcadores cultivables y moleculares para diferenciar el origen de la contaminación fecal en el río Bogotá. Para diferenciar la contaminación de origen porcino, se aisló una cepa a partir de contenido intestinal de porcino identificada como *Bacteroides fragilis* PZ8. Se evaluaron indicadores no discriminantes: coliformes totales, *E. coli*, colifagos somáticos y fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056, indicadores discriminantes: fagos que infectan las cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y *Bacteroides fragilis* PZ8 y marcadores moleculares discriminantes: *Bacteroidetes* HF183F y CF128F, *Bifidobacterium adolescentis* (ADO) y *Bifidobacterium dentium* (DEN), mediante PCR, en agua residual proveniente de plantas de beneficio de ganado bovino y porcino, de Plantas de Tratamiento de Agua Residual Doméstica (PTARD) y del río Bogotá. Se evidenció que las cepas de *Bacteroides* GA17 y PZ8 tienen potencial para discriminar la contaminación fecal humana y de porcino respectivamente, en las aguas evaluadas. Con la relación entre colifagos somáticos y fagos que infectan la cepa GA17, de dos unidades, se evidenció que la contaminación del río Bogotá es principalmente de origen humano. Los marcadores moleculares HF183F, ADO y DEN indicaron la presencia de contaminación humana y el marcador CF128F, la presencia de contaminación bovina en las aguas evaluadas. Los resultados obtenidos permiten concluir que los marcadores seleccionados son potencialmente útiles para discriminar el origen de la contaminación fecal en el río Bogotá.

**Palabras clave:** agua residual animal, agua residual municipal, *Bacteroides* spp., discriminación de la contaminación fecal, marcadores cultivables, marcadores moleculares, río Bogotá.



## ABSTRACT

The detection of intestinal pathogenic microorganisms in water is difficult due to the high cost of testing and the time of analysis. As an alternative, indicator microorganisms are used, which do not differentiate if the contamination is of human or animal fecal origin. To discriminate the origin of fecal contamination, it has been proposed the use of culture-dependent and molecular markers that may present geographic specificity, so it is necessary to identify those applicable in our environment. The objective of this work was to select the cultivable and molecular markers to differentiate the origin of the fecal contamination in the Bogotá river. For this a strain was isolated from porcine intestinal contents identified as *Bacteroides fragilis* PZ8. Non-discriminatory indicators as: total coliforms, *E. coli*, somatic coliphages and *Bacteroides fragilis* phages strain RYC2056, discriminant indicators: *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17 and *Bacteroides fragilis* PZ8 phages, and molecular markers: HF183F, CF128F and *Bifidobacterium adolescentis* (ADO) and *Bifidobacterium dentium* (DEN), by PCR, in wastewater from bovine and porcine abattoir, wastewater treatment plants (WWTP) and Bogotá river. It was evidenced that strains GA17 and PZ8 have the potential to discriminate human and porcine fecal contamination, respectively, in the evaluated waters. The relationship between somatic coliphages and phage strain GA17 of two units, showed that the contamination of the Bogotá river is mainly of human origin. The molecular markers HF183F, ADO and DEN indicated the presence of human contamination and the marker CF128F, the presence of bovine contamination in the evaluated waters. The selected markers are potentially useful to discriminate the origin of fecal contamination in the Bogotá river.

**Key words:** *Bacteroides* spp., Bogotá river, culture-dependent markers, Microbial Source Tracking, molecular markers, municipal wastewater, slaughterhouse wastewater.

## INTRODUCCIÓN

El río Bogotá es considerado el más contaminado del país y uno de los más contaminados del planeta, generando efectos negativos a nivel ambiental y de salud pública. Este río recibe aguas residuales domésticas, agrícolas e industriales tratadas y sin tratar provenientes de las zonas rurales y urbanas de 24 municipios del Departamento de Cundinamarca por los que circula, también recibe aguas de ríos de los 21 municipios restantes que conforman la cuenca y de la ciudad de Bogotá, de donde proviene el 80 por ciento de la contaminación del río, debido a las descargas de los más de ocho millones de habitantes de la capital del país (Campos & Guerrero 2002, Lucena et al. 2003).

Dentro de las labores de recuperación del río Bogotá, establecidas por el Consejo de Estado en el fallo 01-479 del 25 de agosto del año 2014; se indica que se las autoridades gubernamentales y ambientales con injerencia en el río deben identificar las fuentes que lo contaminan, estableciendo cuáles comunidades o empresas generan los desechos contaminantes, para así poder actualizar los regímenes de las tasas retributivas, que son los tributos que se cobran a quienes generan contaminación buscando disminuir la producción y vertimiento de desechos en los cuerpos de agua. En Colombia, los parámetros para realizar el cobro de las tasas retributivas y compensatorias son: la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>) y Sólidos Suspendidos Totales (SST) (Resolución 0273 de 1997, Decreto 901 de 2007), sin tener en cuenta parámetros microbiológicos y sin discriminar el origen de la contaminación fecal, ni la causada por industrias, lo que le impide a las autoridades ambientales ejercer un adecuado control sobre los diferentes tipos de agua residual que llegan a los ríos (Alarcón et al. 2005).

Por décadas se ha evaluado la calidad microbiológica del agua del río Bogotá a través de estudios realizados en su zona de influencia, evidenciado la presencia de contaminación fecal, lo que ha representado un problema de salud pública debido a los patógenos que transmite y que son los causantes de enfermedades de origen hídrico (OMS 1987, Tallon et al. 2005, Campos et al. 2009).

El proceso de detección de los patógenos presentes en el agua se dificulta debido al alto costo de las pruebas y al tiempo necesario para su análisis, por lo que la evaluación de la calidad del agua del río se ha realizado haciendo uso de indicadores microbiológicos de contaminación fecal (Ferguson et al. 1996, Tallon et al. 2005). Se ha evaluado la presencia de bacterias, virus y parásitos y se cuenta con información acerca de las concentraciones y comportamiento de los indicadores tradicionales de contaminación obtenida mediante investigaciones realizadas durante más de 15 años, para bacterias los coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*; en el caso de los virus los colifagos somáticos, fagos F+ específicos y fagos que infectan *Bacteroides fragilis* RYC2056 y parásitos como huevos de helminto y quistes de *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum* (Campos et al. 2009).

Los indicadores tradicionales se han incluido en las normativas para poder evaluar la calidad del agua y controlar los causantes de la contaminación, sin tener en cuenta que estos no son solo de origen humano o municipal, sino que también provienen de plantas de beneficio o sitios de crianza de animales. Los indicadores reflejan la calidad microbiológica del agua, pero no permiten diferenciar el origen de la contaminación fecal, si es humana o animal, ya que estos hacen parte del tracto digestivo de humanos y de animales que son los generadores de la contaminación fecal, lo cual dificulta relacionar la presencia de alguno de estos con un tipo de contaminación puntual (EPA 2005, Yates 2007, Roslev & Bukh 2011).

En los cuerpos de agua el mayor volumen de contaminación está representado por las aguas de origen humano o doméstico, estas se caracterizan por contener abundante materia orgánica y microorganismos de origen fecal, si bien se considera que dicha contaminación es más relevante que la de otros orígenes, es necesario discriminar el origen de la contaminación fecal debido a que es fundamental evaluar la presencia de contaminación animal ya que esta también puede tener un impacto significativo en la salud humana porque genera el riesgo de transmisión y contagio de zoonosis, que son enfermedades que se transmiten de animales al humano, así como daños en el ambiente (Acha 2001, EPA 2005).

Por estas razones se requiere disponer de indicadores o marcadores que permitan cuantificar la carga de contaminación fecal y diferenciar su fuente de origen como instrumentos para poder evaluar la calidad del agua, para así poder determinar los riesgos para la salud de la población, direccionar o seleccionar los sistemas de saneamiento y de tratamiento de aguas residuales más indicados y detectar que fuentes generan los desechos contaminantes que llegan a los cuerpos de agua para poder controlarlos mediante el cobro de las tasas retributivas de acuerdo a la normativa y aplicación de sanciones y demás decisiones a nivel legal que deben tomar las autoridades ambientales (Scott et al. 2002, Blanch et al. 2004, EPA 2005, Hagerdon et al. 2011).

Para diferenciar el origen de la contaminación fecal en el agua se ha propuesto el uso de marcadores dependientes de cultivo y moleculares relacionados con la microbiota intestinal de humanos y de animales, causantes de dicha contaminación. El tema se ha venido desarrollando en varios países y estos marcadores han sido evaluados en Estados Unidos y en varios países de la Unión Europea, encontrando que los marcadores utilizados presentan especificidad geográfica y su sensibilidad varía dependiendo de la región, por lo que es necesario evaluar los marcadores existentes para conocer su sensibilidad en cada zona y buscar y seleccionar aquellos particulares para cada país y evaluarlos bajo las condiciones geográficas y ambientales de cada región. En la última década, los estudios se han centrado en buscar nuevos marcadores con los que se logre diferenciar el origen de la contaminación fecal en diferentes países, por lo que también es necesario evaluar los marcadores ya existentes en nuestras condiciones. Se sabe que con un único marcador o método no se logra la diferenciación y la identificación de la fuente de contaminación; por lo que se requiere de un grupo de marcadores complementarios. Se ha propuesto la creación de una “bolsa de marcadores” con un número variable de marcadores o métodos, ya que muchos

de los métodos disponibles varían en su sensibilidad y especificidad entre áreas geográficas diferentes (Simpson et al. 2002, Field & Samadpour 2007, Hagedorn et al. 2011).

El presente estudio se realizó dando continuidad a la búsqueda, selección y evaluación de marcadores discriminantes en Colombia que se inició hace cuatro años, ya que no se contaba con este tipo de herramientas en el país ni en Latinoamérica; evaluando en una cuenca de tanta importancia como la del río Bogotá indicadores tradicionales no discriminantes como coliformes totales, *E. coli*, colifagos somáticos y bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056, de igual forma se evaluaron marcadores discriminantes evaluados en otros países como la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y la diferencia entre la concentración de colifagos somáticos y fagos que infectan *B. thetaiotaomicron* cepa GA17 (CS-GA17 unidades log<sub>10</sub>), que permiten diferenciar la contaminación de origen humano y dan mejores resultados que la cepa *Bacteroides* CA8 aislada a partir de aguas residuales provenientes de la zona de influencia del río Bogotá (Venegas et al. 2015). También se evaluaron marcadores propios de la cuenca del río, como la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 que discrimina la contaminación fecal porcina y fue aislada en la misma zona, teniendo en cuenta que en nuestro medio es necesario evaluar cepas para la detección de bacteriófagos que ayuden en la diferenciación de la contaminación de origen animal, puesto que en la cuenca del río Bogotá hay una gran cantidad de sitios de crianza y plantas de beneficio de ganado bovino y porcino que generan desechos contaminantes que pueden ser vertidos sin tratar al río, las plantas y sus desechos han aumentado debido al aumento en el consumo de carne de estos animales en el país (Asoporcicultores 2016, Fedegan 2017). En el caso de los marcadores moleculares se evaluaron *Bacteroidetes* HF183F (origen humano) y CF128F (origen bovino) y *Bifidobacterium adolescentis* (ADO) y *Bifidobacterium dentium* (DEN). Con los resultados obtenidos con los marcadores no discriminantes se evidenció la presencia de contaminación fecal en el río, los marcadores cultivables y moleculares discriminantes evaluados permiten discriminar la contaminación de origen fecal humano y animal en el río Bogotá.

El uso de los marcadores discriminantes permitirá a futuro enfocar las medidas para realizar el control y seguimiento de las aguas residuales de origen doméstico y agrícola que llegan al río Bogotá causando su deterioro. Un adecuado control del origen de la contaminación fecal por medio de nuevas normativas, permitirá la aplicación de las tasas retributivas y demás medidas correctivas a los causantes de la contaminación así como establecer las debidas responsabilidades económicas y legales y de esta manera evitar el vertimiento de aguas sin tratar al río y así lograr reducir los niveles de contaminación como parte importante del proceso para su posterior recuperación y protección, lo que permitirá mejorar la gestión de los recursos hídricos logrando aguas de mejor calidad para diferentes usos (agua potable, riego, recuperación de flora y fauna y uso pecuario entre otros), disminución de los porcentajes de morbi-mortalidad causados por las enfermedades de origen hídrico y los daños a nivel ambiental que se han generado por la pérdida de las características de las aguas del río.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. Objetivo general

Seleccionar los marcadores cultivables y moleculares útiles para diferenciar el origen de la contaminación fecal en el río Bogotá.

### 1.2. Objetivos específicos

Aislar una cepa de *Bacteroides* spp. hospedera de bacteriófagos, a partir de contenido intestinal y heces de bovinos y porcinos para diferenciar la contaminación fecal de origen animal en aguas.

Evaluar el uso de marcadores cultivables no discriminantes (Coliformes totales, *E. coli*, colifagos somáticos, *Bacteroides fragilis* RYC2056), discriminantes como bacteriófagos que infectan *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 y la diferencia entre la concentración de colifagos somáticos y bacteriófagos que infectan *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 (CS-GA17 unidades  $\log_{10}$ ) en aguas provenientes de plantas de beneficio de ganado bovino y porcino, Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas (PTARD) y en aguas del río Bogotá.

Evaluar el uso de los marcadores moleculares discriminantes (*Bacteroidetes*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium dentium*) por medio de PCR, para discriminar el origen de la contaminación en aguas provenientes de plantas de beneficio de ganado bovino y porcino, PTARD y en aguas del río Bogotá.

## 2. MARCO TEÓRICO

La contaminación del agua se genera por el vertimiento de residuos provenientes de efluentes industriales, domésticos y agrícolas, que generan alteraciones de tipo físico, químico y biológico en el agua. Las aguas residuales de origen doméstico y agrícola, aportan contaminantes químicos y microorganismos de origen fecal al agua que generan efectos negativos en el medio ambiente y la salud humana (Benka-Coker & Ojior 1995, Blanch et al. 2004, Girones et al. 2010). La contaminación fecal es una de las principales causas del deterioro de la calidad del agua debido a que aporta gran cantidad y variedad de microorganismos patógenos intestinales como bacterias entre las que se encuentran *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, virus como los Enterovirus, Hepatitis A y E, Polio, Rotavirus y parásitos como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* y huevos de helminto que contaminan los cuerpos de agua causando su deterioro y degradación ecológica y dando origen a enfermedades de origen hídrico (OMS 1987, Baker & Herson 1999, Tallon et al. 2005, Campos et al. 2009).

La identificación de los patógenos presentes en el agua requiere de técnicas de alto costo y de tiempos prolongados en su realización y análisis. Por estas razones, como alternativa a la detección directa de patógenos, se evalúan indicadores de contaminación fecal. Dentro de estos se encuentran los indicadores bacterianos como coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*; indicadores virales como colifagos somáticos, bacteriófagos F específicos y bacteriófagos que infectan cepas del género *Bacteroides* spp. y parásitos como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* y huevos de helminto (Ferguson et al. 1996, Baker & Herson 1999, Edberg et al. 2000, Tallon et al. 2005, Yates 2007, Roslev & Bukh 2011).

### 2.1. Indicadores de contaminación bacteriana

#### 2.1.1. Coliformes totales

Los coliformes totales son de origen intestinal y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*; son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, oxidasa negativos, fermentadores de lactosa con producción de gas incubándolos a 35°C por 48 horas, son  $\beta$ -galactosidasa positivo y pueden vivir como saprófitos independientes o como bacterias intestinales (Stevens et al. 2001, APHA 2012). Este grupo incluye los géneros *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Cronobacter* spp., *Raoutella* spp., *Edwardsiella* spp. y *Citrobacter* spp; que en su mayoría son de origen fecal y que conforman aproximadamente el 10 % de los microorganismos intestinales del hombre y otros animales de sangre caliente (Madigan et al. 2009), si bien se considera que el origen de este grupo de indicadores es fecal, también se ha reportado que algunos géneros son capaces de crecer en el ambiente y en sistemas de distribución de agua potable

(LeChevallier 1990, Camper et al. 1991, Szewzyk et al. 1994, Leclerc et al. 2001, Tallon et al. 2005).

En aguas potables, el grupo de coliformes totales funciona como alerta de contaminación fecal no específica y por lo tanto de la posible presencia de patógenos entéricos, esto puede deberse a que se realiza un tratamiento deficiente, debido a presencia de fuentes de contaminación en la red de distribución o en los puntos de llegada domiciliarios o pueden indicar fallas en el sistema de tratamiento, recrecimiento bacteriano o infiltración en el sistema de distribución, por lo cual los coliformes totales continúan considerándose como indicadores aceptables de la eficacia de los tratamientos de potabilización de agua (OMS 2003, Harwood et al. 2005, Tallon et al. 2005). La detección de coliformes totales en aguas residuales crudas indica el estado del agua, la concentración se encuentra en un rango entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC/100 mL (Benka-Coker & Ojior 1995, Tallon et al. 2005, Servais et al. 2007, Zhang & Farahbakhsh 2007), algunos países evalúan coliformes totales para monitorear algunos cambios en la calidad del agua, ya que un incremento en su concentración puede indicar la necesidad de modificar los tratamientos, en el caso del tratamiento de aguas residuales. Otras concentraciones de coliformes totales son  $10^9$  UFC/100 mL en agua residual sin tratar y en efluentes primarios y  $10^4 - 10^5$  UFC/100 mL en ríos (Savichtcheva et al. 2007).

### **2.1.2. *Escherichia coli***

Esta bacteria es considerada el mejor indicador de contaminación fecal en agua potable y en agua residual, por habitar en el intestino grueso del hombre y animales de sangre caliente y prevalecer en sus heces (McLellan et al. 2001); hace parte del grupo de los coliformes fecales o termotolerantes representando el 90% del total de estos en las heces y el 1% del total de la biomasa bacteriana (Leclerc et al. 2001, Tallon et al. 2005, Yates 2007).

Los reportes de *E. coli* en materia fecal se remontan a 1887, su uso como indicador de la posible presencia de patógenos entéricos en agua fue introducido de forma independiente en Estados Unidos en 1895 y de forma oficial en 1914 cuando el Servicio de Salud Pública (US Public Health Service) estableció un estándar de detección: una de cada cinco muestras de 10 mL podía contener *E. coli* (Ashbolt et al. 2001, Tallon et al. 2005). La ventaja de *E. coli* sobre otros indicadores como coliformes totales y fecales, es que esta no crece en aguas no contaminadas (Baudizsova D. 1997), en diversos estudios se encuentra que los demás coliformes son capaces de multiplicarse en aguas de río no contaminadas mientras que *E. coli* no se multiplica, lo que fundamenta que dicha bacteria puede ser utilizada como indicador de contaminación fecal reciente (Tallon et al. 2005).

Algunos estudios muestran que las concentraciones de *E. coli* en aguas residuales domésticas no tratadas se encuentran en un rango entre  $10^5$  y  $10^8$  UFC/100 mL (Servais et al. 2007, Venegas et al. 2015), en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/100 mL (Venegas et al. 2015) y en aguas de río entre  $10^2$  y  $10^6$  UFC/100 mL (Contreras-Coll et al. 2002, Venegas et al. 2015).

## **2.2. Indicadores de contaminación viral**

Los virus son un variado grupo de organismos acelulares parásitos obligados, no cuentan con metabolismo y no son capaces de crecer y replicarse fuera de una célula hospedera, sin embargo, pueden persistir en el medio ambiente en forma de viriones infecciosos (Baker & Herson 1999). Los virus utilizados como indicadores de calidad del agua son los bacteriófagos, que son aquellos virus capaces de infectar bacterias y multiplicarse en estas, normalmente los fagos infectan específicamente un género particular de bacterias o determinadas especies. Estos fueron descritos como habitantes del tracto intestinal del hombre y de animales de sangre caliente; sus características varían en cuanto a su morfología y genoma, el cual puede ser ADN o ARN (Tartera et al 1989, Lasobras et al. 1997, Baker & Herson 1999, Jofre & Lucena 2006, Jofre 2007, Lucena & Jofre 2010).

Los bacteriófagos se han propuesto como buenos indicadores de contaminación fecal en el agua debido a que tienen propiedades, características y comportamiento similares a los virus entéricos como estructura, composición, tamaño y la forma de replicación (Grabow et al. 1984, Grabow 2001) por lo que diversos estudios han planteado el uso de bacteriófagos como indicadores de virus entéricos (Kott et al. 1974, Grabow et al. 1984, Funderburg & Sorber 1985, IAWPRC 1991, Armon & Kott 1996, Grabow et al. 2000, Grabow 2001). Las características que tienen los bacteriófagos para ser indicadores virales son: no son patógenos, no están directamente relacionados con enfermedades humanas, están presentes siempre que existan virus entéricos, su concentración y resistencia en ambientes acuáticos es igual o mayor que la de los virus entéricos, son específicos de contaminación fecal, no tienden a replicarse en el agua debido a que las condiciones ambientales para su multiplicación son difíciles de encontrar en ambientes acuáticos y son relativamente fáciles de detectar (IAWPRC 1991, Armon & Kott 1995, Grabow et al. 1995, Lasobras et al. 1997, Gantzer et al. 1998, Aranha-Creado & Brandwein 1999, Baker & Herson 1999, Grabow 2001, Jofre 2002, Muniesa & Jofre 2004, Skrabber et al. 2004, Jofre 2007, Lucena & Jofre 2010)

Los indicadores virales son utilizados cada vez más en la evaluación de la calidad microbiológica del agua debido a que los protocolos para su detección son rápidos, confiables y sencillos comparados con los utilizados para la detección de virus patógenos, los cuales, debido a que no pueden crecer fuera de una célula hospedera, requieren para su detección la realización de técnicas complejas de cultivo celular que son llevadas a cabo durante varios días en laboratorios especializados o mediante métodos moleculares para la detección del material genético viral como la PCR, lo que aumenta su costo debido a que se requiere de personal capacitado y entrenado para llevar a cabo dichas técnicas. De igual forma es importante tener en cuenta que en el caso de los métodos moleculares actualmente no existen protocolos disponibles para identificar todos los virus patógenos; por estas razones no es factible contar con dichas herramientas para evaluar la presencia de patógenos en cuerpos de agua en laboratorios de rutina. Así mismo se sabe que debido a que la dosis mínima infecciosa de los virus en agua es extremadamente baja, se requiere concentrar una gran cantidad de muestra del agua a evaluar, 100 litros o más para la



realización de las técnicas mencionadas (Kott et al. 1974, IAWPRC 1991, Armon 1993, Aranha-Creado & Brandwein 1999, Baker & Herson 1999, Puig et al. 1999, Grabow 2001, Muniesa & Jofre 2004, Lucena & Jofre 2010).

Los bacteriófagos que se han propuesto como indicadores virales son de tres tipos: los colifagos somáticos, los fagos ARN F específicos y los fagos que infectan cepas de *Bacteroides fragilis*; la diferencia entre los dos primeros grupos radica en la vía utilizada para infectar la bacteria hospedera que en el caso de los colifagos somáticos es por la pared y en el caso de los F específicos por el pili (Hayes 1968, Havelaar & Nieuwstad 1985, Jofre et al. 1989, Morinigo et al. 1992, ISO 1995).

### **2.2.1. Colifagos Somáticos**

Los colifagos somáticos infectan las células de *E. coli* a través de la membrana celular. Incluyen gran variedad de fagos pertenecientes a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae* (Jofre & Lucena 2006). Son los bacteriófagos más evaluados como indicadores de la presencia de enterovirus (Stetler 1984), se han detectado en aguas con contaminación fecal (Kott et al. 1978, Wentzel et al. 1982, Grabow et al. 1984, Borrego et al. 1987, IAWPRC 1991, Grabow et al. 1995, Grabow 2001, Jofre et al. 2016) y se encuentran en mayor concentración en aguas residuales, con valores que oscilan entre  $10^4$  y  $10^7$  UFP/100 mL (Yahya et al. 2015).

Los colifagos somáticos se encuentran en concentraciones de  $10^5$  y  $10^7$  UFP/100 mL en aguas residuales domésticas no tratadas (Grabow et al. 1984, Lucena et al. 2003, Blanch et al. 2004, Zhang & Farahbakhsh 2007), en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos en concentraciones de  $10^6$  (Blanch et al. 2004, Gómez-Doñate et al. 2011), en aguas residuales de plantas de beneficio de porcinos entre  $10^7$  y  $10^8$  UFP/100 mL (Gómez-Doñate et al. 2011) y en aguas de río en un rango entre  $10^4$  y  $10^5$  UFP/100 mL (Lucena et al. 2003).

### **2.2.2. Fagos F específicos**

Los fagos F específicos han sido utilizados como indicadores de contaminación viral fecal en diferentes tipos de agua (Hot et al. 2003), debido a que su comportamiento, tamaño, estructura y persistencia en ambientes acuáticos es similar a la de los virus entéricos patógenos de origen humano, causantes de enfermedades de origen hídrico (IAWPRC 1991, Muniesa & Jofre 2004). En el caso de los fagos F específicos estos también pueden infectar la cepa de *Salmonella* WG5, además de *E. coli*.

Los bacteriófagos ARN F específicos se han sugerido como marcadores útiles para el seguimiento del origen de la contaminación fecal o Microbial Source Tracking (MST) por sus siglas en inglés, ya que habitualmente se encuentran relacionados con la microbiota intestinal de los humanos o animales, causantes de la contaminación fecal (Yahya et al. 2015).

### **2.2.3. Bacteriófagos que infectan cepas de *Bacteroides* spp.**

Desde el final de la década de los 80, se estableció que los bacteriófagos que infectan cepas del género *Bacteroides* spp. podrían utilizarse como indicadores de virus entéricos humanos para monitorear la calidad microbiológica del agua, debido a que comparten características como mayor resistencia a los tratamientos que se aplican en el agua (Booth et al. 1979, Tartera et al. 1989, Grabow et al. 1995) y debido a que el género bacteriano que infectan hace parte de la microbiota intestinal del humano y de animales de sangre caliente, siendo este un grupo predominante en las heces humanas y representando un 30% de la microbiota total que se encuentra en un orden entre  $10^8$  y  $10^{10}$  UFC/g de heces (Bernhard & Field 2000a). Es así que los bacteriófagos de *Bacteroides* spp. se probaron como una posible opción para establecerlos como sustitutos para determinar la presencia de virus debido a que no existe un único indicador universal para la evaluación de la contaminación viral en el agua (Simpson et al. 2002, Field & Samadpour 2007, Hagedorn et al. 2011).

Se ha trabajado en la búsqueda de cepas de *Bacteroides* spp. que recuperen un buen número de bacteriófagos; una de ellas es la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056, la cual tiene capacidad para recuperar un alto número bacteriófagos de origen humano y animal, de forma permanente en el tiempo y en diferentes áreas geográficas (Armon & Kott 1995, Puig et al. 1999, Lucena & Jofre 2010). Sin embargo, se encontró que esta cepa no discriminaba entre fuentes de contaminación fecal (Tartera & Jofre 1987, IWAPRC 1991). Los bacteriófagos que infectan la cepa RYC2056 se encuentran en aguas residuales domésticas no tratadas en concentraciones de  $10^2$  y  $10^5$  UFP/100 mL (Puig et al. 1999, Contreras-Coll et al. 2002, Payán et al. 2005, Gómez-Doñate et al. 2011) en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos entre  $10^1$  y  $10^4$  UFP/100 mL (Puig et al. 1999, Payán et al. 2005) y en aguas residuales de plantas de beneficio de porcinos entre  $10^4$  y  $10^5$  UFP/100 mL (Sun et al. 1997, Payán et al. 2005, Gómez-Doñate et al. 2011).

### **2.3. Discriminación del origen de la contaminación**

Los indicadores de calidad microbiológica del agua mencionados tienen una limitante y es que estos no proporcionan información acerca de la fuente de origen de la contaminación, ya que no diferencian si esta es de origen fecal humano o animal, debido a que estos microorganismos hacen parte de la microbiota del tracto digestivo de humanos y de animales de sangre caliente por lo cual no es posible diferenciar su origen (Sinton et al. 1998, Blanch et al. 2004, Yates 2007, Roslev & Bukh 2011).

En los últimos años se han buscado diferentes tipos de indicadores que permitan cuantificar la carga de contaminación fecal presente en el agua y que a su vez discriminen el origen; sí es humano o animal, ya que la presencia de este tipo de contaminación fecal tiene un impacto negativo en la calidad microbiológica del agua. Normalmente se evalúa la presencia de contaminación fecal humana en los cuerpos de agua debido a su contenido de microorganismos patógenos que generan las enfermedades de origen hídrico causando

gran impacto en la salud pública, sin embargo, es importante detectar la presencia de contaminación de origen animal debido al riesgo que representa para la población por la transmisión de zoonosis, que son aquellas enfermedades transmitidas de los animales al humano (Acha & Szyfres 2001).

La contaminación fecal animal en los cuerpos de agua se debe a los vertimientos provenientes de las actividades agropecuarias de crianza y sacrificio de animales, ya que el sector productor y procesador de carnes genera grandes volúmenes de aguas residuales contaminantes. El agua utilizada en la industria cárnica se contamina con materia orgánica de origen animal, esta industria es una de las mayores consumidoras de agua potable en el planeta, ya que para producir una tonelada métrica de carne se requieren entre 1.5 a 40 m<sup>3</sup> de agua, de 1.5 a 10 m<sup>3</sup> por tonelada de carne de cerdo y de 2.5 a 40 m<sup>3</sup> por tonelada de carne de bovinos (Bull et al. 1982, Banco Mundial 2007, De Sena et al. 2009); la industria cárnica utiliza el 24% del total del agua potable consumida por la industria de alimentos y más del 29% de la consumida por el sector agrícola en el planeta (Mekonnen & Hoekstra 2012, Gerbens-Leenes et al. 2013). El volumen de agua residual generado por esta industria ha aumentado en los últimos años debido al continuo aumento en la producción y consumo de carne, que se ha doblado en las últimas tres décadas de acuerdo al crecimiento de la población (EPA 2004, Mekonnen & Hoekstra 2012, FAO 2013, FoodDrinkEurope 2013) y principalmente en los países donde la carne es parte importante de la dieta (Pingali 2007). De 2002 a 2007 la producción de carne se incrementó hasta 14x10<sup>6</sup> toneladas métricas, representando un incremento del 29% en ocho años (FAO 2013), se estima que para 2050 el crecimiento que ha tenido la industria productora de carne se duplicará (Bouwman et al. 2013) y como resultado de esta actividad, aumentará el número de plantas de beneficio de animales, generando un gran volumen de agua residual para ser tratada.

El agua residual generada por la industria cárnica varía significativamente en su composición y en la cantidad de contaminantes dependiendo del proceso industrial, de la demanda específica de agua y el número de animales sacrificados, pero básicamente contiene partes y tejidos de animales no comestibles (órganos, tegumentos, ligamentos, tendones, huesos), sangre proteínas, huesos, grasas, fibras y pelos provenientes del proceso de sacrificio o faenado, que en conjunto pueden comprender el 45% o más del animal sacrificado, así mismo puede contener detergentes y desinfectantes utilizados para las actividades de limpieza, compuestos farmacéuticos veterinarios, entre otros. La mayor parte de la contaminación es causada por la sangre, el moco estomacal e intestinal y el estiércol, que contienen altos niveles de microorganismos patógenos y no patógenos (Tritt & Schuchardt 1992, Johns 1995, Ruiz et al. 1997, Massé & Masse 2000, Banks & Wang 2004, Mittal 2004, Lawrence 2006, Matsumura & Mierzwa 2008, Wu & Mittal 2012, Franke-Whittle & Insam 2013, Bustillo-Lecompte & Mehrvar 2015, Multilateral Investment Guarantee Agency 2015) como bacterias, virus, priones y parásitos que generan las zoonosis (Acha & Szyfres 2001, Franke-Whittle & Insam 2013), lo que clasifica a las aguas residuales de las plantas de beneficio como un residuo industrial dentro de la categoría de residuos de

la agricultura e industria de alimentos, catalogada como una de las aguas residuales más peligrosas para la salud y el ambiente, ya que su descarga además de generar el riesgo de transmisión de zoonosis, también causa pérdida de oxígeno en los ríos y contaminación del agua subterránea (EPA 2004). Por estas razones es absolutamente necesario diferenciar la contaminación microbiana humana de la de origen animal, para poder determinar el riesgo de transmisión de zoonosis, direccionar los sistemas de saneamiento y de tratamiento de aguas residuales, establecer que fuentes generan los vertimientos contaminantes y poder controlarlos mediante la aplicación de las tasas retributivas por parte de las autoridades ambientales (Acha & Szyfres 2001, Scott et al. 2002, EPA 2005, Hagedorn et al. 2011).

La diferenciación de la contaminación fecal en el agua se realiza mediante el uso de indicadores discriminantes, la búsqueda de estos indicadores dio origen a la disciplina que se conoce como “Microbial Source Tracking” (MST) por sus siglas en inglés, o discriminación del origen de la contaminación microbiana, aunque no existe una traducción oficial; esta tiene como objetivo diferenciar el origen de la contaminación mediante la detección de indicadores químicos o microbiológicos cultivables y moleculares relacionados con la microbiota intestinal de humanos o de animales, causantes de contaminación fecal. Este término ha sido utilizado para definir una diversidad de métodos fenotípicos y genotípicos que se utilizan para determinar las fuentes de contaminación fecal en diferentes cuerpos de agua; la idea de discriminar entre la contaminación proveniente del tracto gastrointestinal humano o animal se remonta a los años 60 (Santo Domingo & Sadowsky, 2007), época en la que se evaluaron como indicadores de la contaminación diferentes géneros de bacterias como *Bacteroides* spp. y *Bifidobacterium* spp. por hacer parte de la microbiota intestinal de humanos y por la distribución que presentan algunas de las especies de estos géneros (Bonjoch et al. 2005). En el caso del género *Bifidobacterium* algunas son exclusivamente de origen humano y otras son de origen animal. Por ejemplo, la especie *B. thermophilum* se ha descrito como indicador de contaminación fecal de origen animal (Gavini & Beerens 1999) y las especies *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. dentium*, *B. angulatum*, *B. catenulatum* están asociadas a la microbiota de humano (Nebra & Blanch 1999, Field et al. 2003, Bonjoch et al. 2005, EPA 2005, Hagedorn et al. 2011).

Un indicador utilizado para la discriminación del origen de la contaminación debe tener ciertas características; debe ser específico del intestino humano o animal, debe estar distribuido en los miembros de la población hospedera y debe tener una concentración uniforme; es decir debe presentar una cantidad similar en las heces, la frecuencia y concentración en el hospedero no debe cambiar en el tiempo ni en poblaciones separadas geográficamente, servir para evaluar el riesgo sanitario y sobrevivir en el ambiente el tiempo suficiente para ser identificado y cuantificado para poder realizar el seguimiento y la evaluación del origen de la contaminación (Simpson et al. 2002, Hagedorn et al. 2011).

Para lograr la detección de los indicadores discriminantes propuestos, se han desarrollado diferentes metodologías y se ha encontrado que los indicadores microbiológicos son los

más apropiados debido a los resultados obtenidos en los diferentes estudios en los que se han evaluado y a las ventajas que estos presentan con respecto a otro tipo de indicadores como los químicos, ya que las sustancias químicas de origen humano no tienen la sensibilidad deseada para ser considerados como indicadores universales de contaminación fecal humana, adicionalmente, no permanecen por largo tiempo en el agua y su detección tiene cierta dificultad por las metodologías requeridas para tal fin, que se caracterizan por tener un mayor grado de complejidad y duración en comparación a las técnicas microbiológicas, ya que requieren de reactivos específicos y equipos especializados. Así mismo no se ha encontrado una relación directa entre la presencia de sustancias químicas indicadoras y los microorganismos patógenos que generan riesgo para la salud humana (Scott et al. 2002, Simpson et al. 2002, Hagedorn et al. 2011).

Se han desarrollado una gran variedad de métodos y técnicas moleculares y bioquímicas para el seguimiento de la fuente de contaminación fecal en el agua; dentro de estas se encuentran la ribotipificación, la electroforesis de gel en campo pulsado (PFGE), secuencias de ADN repetitivo (Rep-PCR), 16S rRNA, marcadores genéticos, análisis de resistencia a los antibióticos, entre otras. Para saber qué técnica elegir se deben tener en cuenta una gran cantidad de variables ya que no existe un método estándar para rastrear la fuente de la contaminación, para elegir el método a utilizar o la combinación de métodos, se deben tener en cuenta varios elementos como, qué pregunta se quiere responder o qué solución se quiere dar con el uso de estos indicadores; igualmente tener en cuenta a que nivel de especificidad se quiere llegar; es decir, si se desea establecer si la fuente de contaminación es humana o no humana y si es de origen animal específicamente de qué tipo de animal proviene, si es doméstico o silvestre, el tamaño de la cuenca a analizar, la disponibilidad de los recursos con los que se cuenta tanto económicos como recurso humano, personal de laboratorio con experiencia en el tema, tiempo disponible, acceso a instalaciones físicas, entre otros factores (Meays et al. 2004, Stoeckel & Harwood 2007).

Los indicadores de tipo microbiológico presentan la ventaja de ser específicos del tracto gastrointestinal de humanos o de animales. En el concepto de MST se tiene en cuenta las diferencias en las condiciones del intestino humano y animal y algunas condiciones como la dieta; ya que algunas comunidades microbianas presentan especificidad de huésped. Teniendo en cuenta el concepto de especificidad se han desarrollado los métodos de seguimiento del origen de la contaminación fecal. En este campo ha predominado la biología molecular y los avances en esta área han acelerado el desarrollo de métodos de tipificación más rápidos y sensibles que pueden ser utilizados para clasificar la microbiota de origen fecal (Santo Domingo & Sadowsky 2007).

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency por sus siglas en inglés EPA) hay diferentes metodologías para la detección e identificación de los indicadores microbiológicos que diferencian el origen de la contaminación fecal; estas se dividen en dependientes de cultivo y de bases de datos,

dependientes de cultivo e independientes de bases de datos y finalmente los independientes de cultivo y de base de datos (Stewart et al. 2003, EPA 2005).

Los métodos dependientes de cultivo y de bases de datos se basan en el desarrollo de bases de datos que integran información fenotípica y genotípica de las bacterias asociadas con las fuentes generadoras de contaminación fecal. La información se obtiene de las cepas que se aíslan a partir de agua contaminada, estas se caracterizan fenotípicamente mediante cultivo, analizando las fuentes de carbono que utilizan, su resistencia a los antibióticos disponibles (Harwood et al. 2000), entre otras características y genotípicamente se analiza su material genético mediante técnicas moleculares como la PCR, la información obtenida se compara con bases de datos que permiten la identificación y clasificación de las cepas.

En los métodos dependientes de cultivo e independientes de base de datos se busca la detección y cuantificación de la concentración de microorganismos específicos de contaminación fecal presentes en muestras de agua por medio de cultivo, así como detectar diferencias en sus concentraciones o a través de la presencia/ausencia de estos indicadores en muestras específicas de origen humano o animal, sin obtener información genotípica que requiera del uso de bases de datos. Se ha propuesto el uso de bacterias del género *Bifidobacterium* spp. y bacteriófagos que infectan *Bacteroides* spp. por ser géneros abundantes en la microbiota intestinal humana y de algunos animales (Puig et al. 1999, Bonjoch et al. 2005, Jofre et al. 2014).

Con los métodos independientes de medios de cultivo e independientes de bases de datos, la detección se realiza mediante la amplificación de un marcador genético por medio de técnicas de biología molecular como la PCR convencional, PCR cuantitativa q-PCR, Southern Blot, entre otros, sin depender del aislamiento de los microorganismos contaminantes (Simpson et al. 2002, Field et al. 2003, EPA 2005, Harwood et al. 2009, Hagedorn et al. 2011).

### **2.3.1. Marcadores discriminantes cultivables**

Como posibles indicadores discriminantes del origen de la contaminación fecal se han sugerido las bacterias del género *Bifidobacterium* spp. presentes en la microbiota intestinal de humanos y de algunos animales de sangre caliente. Algunas de las especies de este género se encuentran exclusivamente en el intestino humano y otras sólo en el intestino animal; las especies *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantaria*, *B. dentium* (Mara & Oragui 1983, Nebra & Blanch 1999, Nebra et al. 2003), *B. angulatum*, *B. catenulatum* son de origen humano y la especie *B. thermophilum* de origen animal (Gavini & Beerens 1999); con las cuales se determina y diferencia el origen de la contaminación fecal.

Como ya se ha mencionado, también se han propuesto como indicadores discriminantes las bacterias del filo *Bacteroidetes*, género *Bacteroides* spp. por hacer parte de la microbiota intestinal humana, por ser predominantes en las heces y por presentar una baja

supervivencia en el ambiente debido a que son microorganismos anaerobios estrictos. (Bernhard & Field 2000a). Las especies *B. vulgatus*, *B. distasonis* y *B. thetaiotaomicron* son exclusivas del tracto gastrointestinal humano con las cuales se lograría diferenciar el origen de la contaminación fecal (Bernhard & Field 2000b). Algunos trabajos como el de Ebdon et al. (2007) sugieren que los bacteriófagos que infectan *Bacteroides* spp. son una herramienta potencial para el seguimiento de las fuentes de contaminación fecal, pero que pueden ser necesarias diferentes cepas huésped para utilizarlas en diferentes áreas geográficas.

Algunas cepas del género *Bacteroides* spp. presentan una posible especificidad geográfica y baja recuperación de fagos de origen humano o animal, por lo cual en la última década los estudios se han centrado en buscar nuevas cepas con las que se logre diferenciar el origen de la contaminación fecal en diferentes países (Sinton et al. 1998, Puig et al. 1999, Scott et al. 2002, Stewart et al. 2003, Payán et al. 2005, Vijayavel et al. 2010, Jofre et al. 2014). En Europa se han aislado cepas como *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 que indica la presencia de contaminación fecal humana y presenta una amplia distribución geográfica, esta ha sido evaluada en países como España, Reino Unido, Francia, Suecia y Chipre confirmado su especificidad como indicadora estrictamente de contaminación fecal humana (Payán et al. 2005, Blanch et al. 2006), también cepas como HB13 aislada en Europa a partir de una muestra proveniente del río Cauca en Colombia, GB124 en Inglaterra (Ebdon et al. 2007), HB73 en Hawái (Vijayavel et al. 2010), ARABA84 en Suiza (Wicki et al. 2011) y la cepa CA8 en Colombia (Venegas et al. 2015), todas aisladas por medio de la metodología propuesta por Payán et al. (2005), basada en el uso de medios enriquecidos y altamente selectivos para cepas del género *Bacteroides* spp. e incubación en condiciones de anaerobiosis.

Por otra parte, se sabe que existe una relación entre la diferencia de la concentración de colifagos somáticos y la concentración de bacteriófagos que infectan *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 (CS-GA17 unidades  $\log_{10}$ ), que ayuda en la discriminación del origen de la contaminación. Esta relación da una buena aproximación para identificar la procedencia de la contaminación disminuyendo las variaciones debidas al tratamiento, tiempo de la contaminación o vejez de la muestra. La aplicación de esta relación en aguas residuales no tratadas y efluentes secundarios y terciarios, agua de río y residual con contaminación animal, muestra que si arroja valores entre 1.4 a 2.2 ( $\log_{10}$ ), se considera que la contaminación fecal presente es de origen humano y un valor mayor a 4 indica que la contaminación presente es de origen no humano (Muniesa et al. 2012) proporcionando un método robusto para la discriminación de la contaminación. La relación también genera datos numéricos que pueden ser aplicados en los modelos de predicción. Este indicador se desarrolló debido a que en los estudios realizados en los últimos años se ha detectado que en muestras diluidas y/o envejecidas es conveniente utilizar un marcador general y uno discriminante que se inactiven frente a los agentes inactivantes naturales (radiación solar, temperatura, etc.) y antropogénicos de forma parecida (Blanch et al. 2006, Jofre et al. 2014).

Los métodos cultivables de detección de microorganismos indicadores de calidad del agua son relativamente fáciles y como ya se ha mencionado facilitan la evaluación de la calidad microbiológica de cuerpos de agua; sin embargo, existen algunos microorganismos de difícil crecimiento o que por sus características metabólicas se dificulta su cultivo, como el caso de las bacterias anaerobias estrictas que deben cultivarse en condiciones especiales. Debido a esto se han buscado métodos alternativos que permitan detectarlos; es así como en la constante búsqueda de microorganismos indicadores discriminantes se han desarrollado y modificado diferentes técnicas para su detección. En los últimos años la búsqueda se ha realizado mediante técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que es rápida y sencilla y puede ser aplicada para la detección de microorganismos no cultivables en el laboratorio, así como de los presentes en muestras ambientales (Girones et al. 2010).

### **2.3.2. Marcadores discriminantes moleculares**

Las técnicas moleculares han permitido la detección de marcadores de bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides* spp. para diferenciar entre la contaminación fecal humana y animal, utilizando genes que codifican para la subunidad 16S rRNA de bacterias fecales anaerobias estrictas (Bernhard & Field 2000a). Algunos ejemplos de los marcadores de *Bacteroidetes* son HF183F, HF8, HF10 y HF134 para humanos y los marcadores CF123, CF128, CF151 y CF193 para bovinos (Haugland et al. 2010), estos han mostrado resultados positivos en la mayoría de los estudios permitiendo diferenciar el origen de la contaminación; los marcadores HF183F y CF128F han presentado una mayor sensibilidad en comparación a HF134 y CF193 (Bernhard & Field 2000a, 2000b, Field et al. 2003, Lamendella et al. 2007, Ahmed et al. 2008, Siobhán et al. 2009)

Estos marcadores pueden ser detectados mediante PCR convencional que permite determinar la presencia o ausencia de determinado marcador o mediante PCR anidada que permite mejorar la detección de los marcadores mediante un proceso previo de anidación, en el que se obtienen fragmentos de secuencias más cortos para luego detectar los marcadores en dichas secuencias, aumentando la especificidad de la técnica y mediante PCR múltiplex en la que se detectan dos marcadores en una misma reacción de PCR. Un método más sensible es la qPCR en la que se cuantifican los productos de la PCR, en este caso de manera absoluta. (Bernhard & Field 2000a, Field et al. 2003, Lamendella et al. 2007, Ahmed et al. 2008, Siobhán et al. 2009, Gómez-Doñate et al. 2012). Técnicas que han presentado una sensibilidad del 91-100% y una especificidad del 94% para muestras de rumiantes y del 100% y 87% respectivamente, en aguas con materia fecal humana (Siobhán et al. 2009).

En el caso de la detección de *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium dentium*, ambas especies de origen humano, se ha utilizado la PCR multiplex 16S rRNA con los iniciadores ADO y DEN, para la detección simultánea de estos dos marcadores que indican



sí la contaminación fecal presente es de origen humano (Kaufmann et al. 1997, Matsuki et al. 1999, Bonjoch et al. 2004).

Los marcadores anteriormente mencionados se han probado en diferentes estudios evaluando diversos tipos de agua y se ha encontrado que utilizando un único marcador no se logra la diferenciación de la contaminación por lo cual los estudios han concluido que se requiere de un amplio grupo de marcadores y se ha propuesto la creación de una “bolsa de marcadores” que estén disponibles para lograr la discriminación del origen de la contaminación fecal (Simpson et al. 2002, Field & Samadpour 2007, Hagedorn et al. 2011). Tal es el caso del trabajo realizado en Europa por Blanch et al. (2004) en el que probaron genotipos de F RNA específicos, bacteriófagos de *Bacteroides fragilis*, fenotipos de coliformes fecales, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y esteroides. Los indicadores con mejores resultados fueron las Bifidobacterias fermentadoras de sorbitol, algunas especies de *Bifidobacterium* y fagos de *Bacteroides thetaiotaomicron*. El estudio concluye que se deben usar varios tipos de indicadores para predecir el origen de la contaminación.

Para analizar los datos proporcionados por el uso de los indicadores microbianos o químicos asociados a diferentes huéspedes que dan como resultado la identificación y clasificación de la procedencia de la contaminación fecal en el agua se utilizan diferentes métodos estadísticos como redes neuronales artificiales (Brion et al. 2002), el algoritmo del vecino más cercano (Ritter et al. 2003) y los análisis discriminantes (Blanch et al. 2006). Estos métodos presentan limitaciones cuando el número de muestras es bajo, por lo cual en la literatura se ha propuesto el aprendizaje inductivo de computadores (Inductive Machine Learning). Este método permite obtener algoritmos capaces de aprender a partir de adquisición de experiencia (Mitchell 1997). Los métodos inductivos de aprendizaje (Quinlan 1993) o posteriormente los llamados support vector machines (Vapnik 1998) se han aplicado en distintas disciplinas como en la determinación del origen de la contaminación fecal en aguas, mediante un programa informático que permite realizar predicciones acerca de los puntos de origen de la contaminación. En dicho programa el usuario entrena el sistema ingresando las variables (indicadores) seleccionadas, y acepta valores procedentes de muestras diluidas y/o degradadas por envejecimiento o tratamiento de la contaminación (Belanche & Blanch 2008). Dichos métodos pueden complementarse con técnicas de selección de subgrupos de variables que permiten una selección de las variables que proporcionen el desarrollo de modelos de predicción más precisos con el menor número de variables (Liu & Motoda 1998, Belanche & Blanch 2011, Sánchez et al. 2011).

A nivel internacional se ha buscado, seleccionado y evaluado diferentes marcadores como potenciales indicadores discriminantes de la contaminación fecal. En Europa, en un estudio realizado por Blanch et al. (2004), se realizó el seguimiento del origen de la contaminación fecal en aguas superficiales en cinco diferentes áreas geográficas de Europa, cada una con diferentes condiciones. Se evaluaron indicadores tradicionales como bacteriófagos específicos F+, bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis*, coliformes fecales y *Enterococcus* y esteroides, *Clostridium* sulfito reductor y colifagos somáticos. También se

evaluaron indicadores discriminantes entre estos Bifidobacterias fermentadoras de sorbitol: *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium dentium*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y patrones de resistencia a antibióticos, entre otros indicadores. Los resultados de dicho estudio indican que un solo tipo de indicador no diferencia las fuentes de contaminación fecal humana y animal por lo cual se deben utilizar un grupo de 4 o 5 parámetros que además permitirán la construcción de modelos predictivos y la realización de análisis estadísticos adecuados.

En Norteamérica se han llevado a cabo varios estudios en los que se evalúan los indicadores discriminantes, un ejemplo es el realizado en Canadá, por Lee et al. (2014), quienes realizaron una caracterización de las fuentes de contaminación fecal en las zonas urbanas y rurales de la cuenca del río Grande, al suroeste de Ontario. Mediante qPCR se evaluaron marcadores genéticos de Bacteroidetes de origen humano y animal; se hallaron niveles altos de contaminación fecal bovina mediante el uso del marcador bovino específico BacBovine, en zonas agrícolas. En las zonas urbanas la contaminación de origen humano es generada por efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas; este tipo de contaminación se evaluó con el marcador BacHuman, el cual confirmó que las pruebas realizadas con marcadores Bacteroidales son útiles en la determinación y seguimiento de la fuente de contaminación fecal; igualmente en este estudio se tuvieron en cuenta variables como la lluvia en la zona, demostrando que esta tiene una influencia importante en la carga de *Bacteroidetes* específicos.

En Suramérica se está iniciado la búsqueda y selección de indicadores que diferencien el origen de la contaminación fecal en aguas. En Colombia se inició la búsqueda y selección de indicadores que diferencien el origen de la contaminación fecal en aguas mediante el trabajo realizado por Venegas et al. (2015) en el que se buscaba seleccionar los marcadores útiles en el río Bogotá y en su área de influencia. En este se evaluó la presencia y concentración de Bifidobacterias fermentadoras y no fermentadoras de sorbitol, se aisló una cepa nativa hospedera de bacteriófagos de *Bacteroides* spp. para diferenciar la contaminación de origen humano denominada CA8; dicha cepa fue comparada con la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 para determinar cuál de estas recuperaba una mayor cantidad de fagos en aguas contaminadas. En dicho trabajo también se realizó la extracción de ADN para la detección de *Bifidobacterium adolescentis* (ADO) y *Bifidobacterium dentium* (DEN) por medio de una PCR multiplex, así mismo la detección de *Bacteroidetes* de origen humano y animal con el primer CF128 para ganado vacuno y HF183 para humano en aguas provenientes de PTARD, plantas de beneficio de ganado bovino y agua del río Bogotá. Se encontró que la cepa de *Bacteroides* CA8, recuperaba fagos en muestras de origen humano y se determinó que su rendimiento es menor comparada con la cepa GA-17, por lo cual se infiere que esta última se debe seguir utilizando como una cepa que discrimina la contaminación fecal humana en nuestro medio. En cuanto a los resultados obtenidos con la diferencia entre la concentración de Bifidobacterias fermentadoras y no fermentadoras de sorbitol se halló que este no es un buen indicador de la contaminación fecal humana en el área geográfica del estudio. En cuanto a los marcadores moleculares HF183 y ADO fueron

detectados en la totalidad de las muestras evaluadas, mientras que el marcador DEN se encontró en 60% de aguas municipales y CF128 en 25% de las muestras provenientes de plantas de beneficio de ganado bovino.

El estudio concluyó que los marcadores evaluados discriminan el origen de la contaminación fecal, pero que es necesario recolectar un mayor número de muestras para obtener más datos en diferentes zonas del río, así como de plantas de beneficio o zonas de explotación de ganado vacuno ya que el consumo de carne de este ganado ha aumentado y es la segunda más consumida en el país después de la carne de pollo, así como la carne de cerdo que se ubica en el tercer lugar (Asoporcicultores 2016, Fedegan 2017, Fenavi 2017), por lo que se cuenta con una gran cantidad de plantas de beneficio y procesamiento de estos tipos de ganado que generan desechos contaminantes con materia fecal que pueden ser vertidos sin tratar a los cuerpos de agua, por lo que se recomendó aislar y evaluar una cepa de *Bacteroides* spp. para la detección de bacteriófagos que diferencien la contaminación fecal de origen animal, los cuales se deben controlar mediante la aplicación de medidas sancionatorias. Por otra parte, es necesario avanzar en marcadores de tipo molecular que son más específicos y proporcionan un rango más amplio de herramientas que ayudan a discriminar el origen de la contaminación, así como utilizar protocolos más específicos como la q-PCR.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos planteados se desarrolló la siguiente metodología: Inicialmente se llevó a cabo el aislamiento de cepas de *Bacteroides* spp. hospedadas de bacteriófagos, que permiten realizar la discriminación del origen de la contaminación fecal animal, de ganado bovino y porcino.

Posteriormente se realizó la evaluación de los indicadores de contaminación fecal, bacterianos y virales no discriminantes mediante cultivo: coliformes totales, *Escherichia coli*, colifagos somáticos y bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056, así como marcadores discriminantes, aquellos que diferencian el origen de la contaminación fecal, mediante la infección de *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 y la cepa aislada de contenido intestinal de porcino *Bacteroides fragilis* PZ8. Estos indicadores se evaluaron en agua residual con contaminación fecal animal, en plantas de beneficio de ganado bovino y porcino y en aguas con contaminación humana, en afluente de PTARD, para luego ser evaluados en aguas del río Bogotá.

Simultáneamente se evaluaron los marcadores moleculares discriminantes mediante PCR convencional para los marcadores de *Bacteroidetes* HF183F y CF128F y mediante PCR anidada para los marcadores de *Bifidobacterium adolescentis* (ADO) y *Bifidobacterium dentium* (DEN), en las mismas muestras de agua en las que se evaluaron los marcadores cultivables.

#### **3.1. Aislamiento de una cepa de *Bacteroides* spp. hospedada de bacteriófagos discriminantes de la contaminación por ganado bovino y porcino**

##### **3.1.1. Selección de las plantas de beneficio de ganado bovino y porcino**

Para seleccionar las plantas de beneficio de ganado bovino y porcino los criterios que se tuvieron en cuenta fueron los siguientes: primero que se encontraran ubicadas en la cuenca del río Bogotá; segundo que sacrificaran un solo tipo de ganado para evitar la mezcla de contaminación fecal o si se sacrificaban los dos, verificar que el proceso y la infraestructura para el manejo de los residuos fecales y las aguas residuales provenientes del sacrificio estuvieran totalmente separadas; tercero que las plantas de beneficio contaran con planta de tratamiento de aguas residuales y cuarto que se encontraran ubicadas cerca de la ciudad de Bogotá por aspectos de logística y presupuesto

Con base en estos criterios, para ganado porcino, se seleccionó la Empresa Frigorífico y Plaza de Ferias de Zipaquirá “EFZ” y para ganado bovino el mismo Frigorífico de Zipaquirá, la planta de beneficio del municipio de Tabio y el Frigorífico BLE de Bogotá.

### **3.1.2. Descripción de las estaciones de muestreo**

#### **3.1.2.1. Planta de beneficio del municipio de Zipaquirá: Empresa Frigorífico y Plaza de Ferias de Zipaquirá “EFZ”**

Localizado en el municipio de Zipaquirá, a 47 kilómetros al norte de la ciudad de Bogotá. En esta planta de beneficio se sacrifican diariamente un promedio de 200 ejemplares de ganado bovino y un promedio de 50 ejemplares de ganado porcino, provenientes del municipio de Zipaquirá y de otros municipios de la región Sabana Centro del Departamento de Cundinamarca.

#### **3.1.2.2. Planta de beneficio del municipio de Tabio**

Localizada en el municipio de Tabio, a 30 kilómetros al noroccidente de la ciudad de Bogotá. En esta planta de beneficio se sacrifican diariamente un promedio de 40 ejemplares de ganado bovino provenientes del mismo municipio.

#### **3.1.2.3. Frigorífico BLE Ltda**

Localizado en el occidente de la ciudad de Bogotá. En esta planta de beneficio se sacrifican diariamente un promedio de 1200 ejemplares de ganado bovino y un promedio de 200 ejemplares de ganado porcino, provenientes de diferentes departamentos del país como Meta, Arauca y Cundinamarca.

### **3.1.3. Recolección de las muestras de contenido intestinal de origen animal**

La toma de muestras de contenido intestinal de ganado bovino y porcino para el aislamiento de una cepa de *Bacteroides* spp. hospedera de bacteriófagos para discriminar la contaminación fecal de estos animales, se realizó en el frigorífico del municipio de Zipaquirá en el caso de bovinos y porcinos y en la planta de beneficio del municipio de Tabio y en el Frigorífico BLE de Bogotá únicamente para bovinos.

Se realizó un muestreo por conveniencia, las muestras se recolectaron hasta que se logró el aislamiento y selección de las cepas de *Bacteroides* spp. de origen porcino y en el caso del ganado bovino hasta que se decidió no continuar con el procedimiento debido a que se logró el aislamiento de algunas cepas, pero estas no cumplieron con todos los criterios de selección.

El muestreo fue compuesto, se tomaron muestras del contenido intestinal de cinco animales simultáneamente y se mezclaron, con el fin de obtener una muestra más representativa, esto en el caso del frigorífico de Zipaquirá y en la planta de beneficio de Tabio en donde se pudo ingresar en el momento del sacrificio; en el caso del Frigorífico BLE la muestra correspondió al desecho que sale del sacrificio del ganado vacuno que va por una tolva y se reúne antes de ser procesado como compostaje, ya que no se autorizó la entrada a las salas de sacrificio.

Se recolectaron 250 g de contenido intestinal presente en la porción final del intestino grueso, en el momento inmediato del sacrificio de los animales, cuando se retira la víscera blanca y se separa del resto del animal. Las muestras se tomaron en frascos de polipropileno de 250 g estériles; estos se llenaron completamente con el fin de reducir la disponibilidad de oxígeno ya que los microorganismos que se buscaba aislar son anaerobios (Payan et al. 2005). Las muestras recolectadas se transportaron a una temperatura de 4 - 6 °C y en condiciones de anaerobiosis, se llevaron al Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos de la Pontificia Universidad Javeriana y se procesaron dentro de las 4 horas siguientes a su recolección.

Las muestras se tomaron en diferentes días durante tres meses y medio, iniciando en la última semana de noviembre de 2015 y finalizando a mediados de marzo de 2016, dejando un espacio de dos semanas entre cada muestreo, que era el tiempo destinado al procedimiento de aislamiento y conservación de las cepas aisladas. En el caso de ganado porcino se tomaron en total cuatro muestras y en el caso de ganado bovino se tomaron siete muestras. En el frigorífico del municipio de Zipaquirá se tomaron tres muestras de contenido intestinal de ganado bovino y cuatro de ganado porcino, en la planta de beneficio del municipio de Tabio tres muestras de contenido intestinal de bovino y en el frigorífico BLE una muestra.

#### **3.1.4. Procedimiento para el aislamiento de cepas de *Bacteroides* spp.**

El aislamiento de las cepas bacterianas se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Payán et al. (2005).

##### **3.1.4.1. Primera fase**

Se mezcló cada muestra de contenido intestinal, se tomaron 20 g y se mezclaron con 180 mL de agua peptonada 1% (v/v) para una dilución 1 en 10, se llevó a agitación magnética en plancha de agitación por 20 minutos. Posteriormente se tomó 1 mL de la mezcla y se suspendió en 9 mL de solución peptonada para hacer diluciones seriadas 1 en 10 hasta  $10^{-4}$ , luego se tomaron 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones realizadas y se sembraron cada una en una caja con agar BBEA (Agar *Bacteroides* Bilis Esculina - *Bacteroides* Bilis Esculin Agar, Livingston 1978) difundiendo la muestra en el medio de cultivo con ayuda de un rastrillo de vidrio estéril. El volumen de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  se dividió a la mitad (50  $\mu$ L) y se sembró cada mitad por separado en diferentes cajas, para obtener colonias más separadas entre sí, permitiendo una mejor observación de cada una de las colonias y de esta forma facilitar el aislamiento. Estas cajas se llevaron a incubar a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , en jarras con sobres que generaron las condiciones de anaerobiosis por 48 horas.

Pasado el tiempo de incubación, se seleccionaron las cajas con agar BBEA en las que crecieron colonias con características típicas de *Bacteroides* spp., colonias negras con o sin

halo o precipitado oscuro, teniendo en cuenta que debían estar separadas lo más posible una de la otra (Livingston 1978). De cada colonia seleccionada se tomó la mitad y se sembró en una caja con agar BBEA dividida en 16 secciones mediante el uso de una cuadrícula, haciendo una línea en el primer cuadrante, luego la otra mitad de la colonia se sembró en otra caja con el mismo agar, teniendo cuidado de sembrar la misma colonia en la misma posición de la cuadrícula de las cajas; este proceso se repitió hasta sembrar todas las colonias aisladas en las siguientes secciones de la cuadrícula. Estas cajas se llevaron a incubar a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 48 horas, una caja en condiciones de anaerobiosis y una caja en condiciones de aerobiosis.

#### **3.1.4.2. Segunda fase**

Al terminar el proceso de incubación se evaluó el crecimiento en condiciones aerobias y anaerobias y se seleccionaron las colonias de color negro con o sin halo o precipitado negro que crecieron únicamente en condiciones de anaerobiosis, se descartaron aquellos aislamientos que crecieron en condiciones aerobias. Se tomó una fracción de dichas colonias y se realizó una coloración de Gram, se seleccionaron aquellas que se observaron cómo bacilos Gram negativos.

Se eligieron los aislamientos que cumplieron con las siguientes dos condiciones: colonias negras con o sin halo o precipitado oscuro y que fueran bacilos Gram negativos anaerobios. Los aislamientos que cumplieron con estas características se sembraron en cajas con agar BBEA divididas en 8 secciones para tener un mayor espacio para el crecimiento y así obtener mayor biomasa. Estas cajas se llevaron a incubar a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 48 horas en condiciones de anaerobiosis. Pasado el tiempo de incubación, las colonias crecidas en agar BBEA se repicaron en cajas con agar BPRMA (Medio para la recuperación de fagos de *Bacteroides* spp. – *Bacteroides* spp. Phages Recovery Medium Agar) divididas en 8 secciones y se llevaron a incubar a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

#### **3.1.4.3. Tercera fase**

Con los aislamientos seleccionados en la fase anterior se realizó el procedimiento de infección con fagos extraídos de las mismas muestras de donde se logró el aislamiento. Para esto se pasaron cada una de las colonias crecidas en agar BPRMA a caldo BPRMB (Caldo para la recuperación de fagos de *Bacteroides* spp. – *Bacteroides* spp. Phages Recovery Medium Broth) en tubos de vidrio, con ayuda de un hisopo estéril, llenando los tubos con caldo completamente para generar anaerobiosis; se incubaron por  $14 \pm 2$  horas a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ . Pasado el tiempo de incubación se tomaron 2 mL de cada uno de los caldos con crecimiento y se pasaron a tubos con 10 mL de caldo BPRMB, se colmaron para lograr condiciones de anaerobiosis, se incubaron por aproximadamente 3 horas a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , hasta que la bacteria llegó a la fase logarítmica alcanzando una densidad óptica de 0.3 a 0.5, esta densidad se midió a una absorbancia de 620 nm. Los valores de absorbancia, densidad óptica y el tiempo de incubación, fueron seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento realizadas previamente con cepas de *Bacteroides* spp. del mismo origen,

utilizadas para discriminar el origen de la contaminación fecal que fueron donadas por el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona.

En estos dos procedimientos se observó el crecimiento de los aislamientos en caldo BPRMB, ya que en algunos casos no se lograba el crecimiento en el caldo, por lo que eran descartados en este filtro del procedimiento de selección; por esta razón el número de aislamientos reportados en la tercera fase corresponde a aquellos que crecieron en el caldo BPRMB confirmando su viabilidad y que lograron la absorbancia necesaria para realizar la prueba de doble capa de agar.

#### **3.1.4.4. Cuarta fase**

Se realizó el procedimiento de infección mediante la técnica de doble capa de agar (ISO 10705 - 4 2001, Araujo et al. 2001). Para esto se tomó 1 mL del crecimiento bacteriano de la fase anterior, 1 mL de los fagos extraídos de las mismas muestras de donde se logró el aislamiento, conservados con glicerol al 10% (v/v) y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Méndez et al. 2002) y 2.5 mL de agar BPRMA semi sólido; se mezclaron y se vertieron sobre una caja con una capa de agar BPRMA. Las cajas se llevaron a incubar a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas en condiciones de anaerobiosis. Pasado el tiempo de incubación se verificó el control positivo realizado con la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 y su respectivo fago y el control negativo de cada una de las cepas aisladas, consistente en el césped bacteriano lo que confirmaba la viabilidad y crecimiento de las cepas. Se seleccionaron aquellos aislamientos en los que se observaron Unidades Formadoras de Placa (UFP)/100 mL (Payán et al. 2005).

La capacidad de las cepas hospederas aisladas de recuperar bacteriófagos de su propio origen de aislamiento, ya sean de origen humano o animal, se evalúa de acuerdo al número de bacteriófagos de diferente origen recuperados por la cepa de referencia para este método, *Bacteroides fragilis* RYC2056.

El criterio de selección de las cepas aisladas es: aquellas que fueron infectadas por bacteriófagos extraídos de las muestras de contenido intestinal o materia fecal en las que se presentó el mayor número de Unidades Formadoras de Placa/mL, el protocolo establece un recuento mayor a 50 UFP/mL o aquellas que mostraron concentraciones de bacteriófagos recuperados similares a las reportadas con la cepa *Bacteroides fragilis* RYC2056, es decir entre 50 y 300 UFP/mL (Payán et al. 2005). Los recuentos obtenidos con los fagos que infectan las cepas de *Bacteroides* spp. y la cepa *B. fragilis* RYC2056 directamente en contenido intestinal o materia fecal deben encontrarse en el rango mencionado, teniendo en cuenta que al evaluar las cepas en muestras de agua los recuentos son menores, debido a que la carga de contaminación fecal es menor por el efecto de dilución, por lo que se debe estar seguros que las cepas seleccionadas recuperan un alto número de fagos para que en el momento de hallar bajas concentraciones también sea posible hacer el recuento.



### **3.2. Evaluación de la especificidad y capacidad discriminadora de las cepas de *Bacteroides* spp. seleccionadas (Payán et al. 2005).**

Las cepas que cumplieron con todas las fases de aislamiento y criterios de selección fueron de origen porcino; para comprobar su especificidad se llevó a cabo el procedimiento de infección con bacteriófagos obtenidos de muestras de su mismo origen fecal y para probar su capacidad discriminadora se llevó a cabo la infección con bacteriófagos extraídos de muestras de otros orígenes (bovino y humano) diferentes al de las cepas, mediante la técnica de doble capa de agar (ISO 10705 - 4 2001, Araujo et al. 2001) descrita en el numeral 3.1.4.4. y 3.8., con el fin de verificar que las cepas seleccionadas recuperaran únicamente bacteriófagos de su propio origen fecal.

Este procedimiento se realizó con suspensiones de bacteriófagos extraídos de muestras de origen fecal bovino, porcino y humano, con fagos de contenido intestinal de ganado porcino del mismo lugar de donde se lograron los aislamientos (Zipaquirá), pero de diferentes fechas. Igualmente se infectaron con fagos provenientes de muestras de materia fecal de ganado porcino de diferente lugar (Guasca). Para probar la capacidad de las cepas de diferenciar la contaminación fecal de origen animal diferente a la de porcinos, se realizó la infección con fagos extraídos de contenido intestinal de bovinos tomada en la planta de beneficio del municipio de Tabio y en el frigorífico de Zipaquirá y BLE en Bogotá. Finalmente, para confirmar que las cepas aisladas diferenciaban entre la contaminación fecal animal y humana se realizó la infección de las bacterias con suspensiones de bacteriófagos extraídos de muestras de agua residual doméstica de PTARD, de una muestra de la planta de tratamiento del municipio de Guasca y otra de El Salitre en Bogotá, de las que se tenía certeza que presentaban contaminación fecal exclusivamente de origen humano.

Las cepas aisladas de contenido intestinal de origen porcino que no recuperaron bacteriófagos de origen fecal humano o bovino, se seleccionaron como cepas con capacidad para discriminar el origen de la contaminación fecal en aguas.

### **3.3. Extracción de bacteriófagos a partir de muestras de origen humano y/o animal (Guzmán et al. 2007).**

De todas las muestras recolectadas en los sitios mencionados anteriormente, se realizó la extracción de bacteriófagos. Para esto se tomó la muestra con una jeringa estéril y se pasó a través de un filtro capsula de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  x 33 mm de PES (Poliestersulfona) que permite la retención de bacterias y por lo tanto la obtención de una suspensión de bacteriófagos.

En el caso de las muestras de contenido intestinal o materia fecal por ser de consistencia sólida se realizó un proceso de elusión para obtener las partículas virales presentes en la muestra. Para esto, las muestras se homogenizaron manualmente por 3 minutos, luego se

pesaron 20 g y se mezclaron en 180 mL de extracto de carne al 10% a pH 7,2 (relación 1:10 (g/mL) y se mezclaron por 30 minutos mediante agitador magnético para lograr la elusión de los bacteriófagos. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 10000  $xg$  durante 30 min a 4°C (centrifuga refrigerada); seguidamente se recuperó el sobrenadante con una jeringa estéril en condiciones asépticas y se pasó a través de un filtro de capsula de tamaño de poro de 0.22  $\mu m$  x 33 mm de PES o mediante la ayuda de un sistema de filtración al vacío utilizando membranas del mismo tamaño de poro, recuperando la suspensión de bacteriófagos en tubo de vidrio estéril. A partir de esta suspensión de bacteriófagos se realizaron diluciones seriadas 1 en 10 hasta  $10^{-3}$  o hasta la dilución requerida dependiendo del grado de contaminación de la muestra.

En el procedimiento de aislamiento y posterior infección de las cepas de *Bacteroides* spp. se utilizó la suspensión de bacteriófagos al final del proceso, por lo cual fue necesario conservarla. Para esto se hizo una mezcla de dicha suspensión con glicerol al 10%, se distribuyó en crioviales y se almacenó a -70 ( $\pm 10$ ) °C (Méndez et al. 2002).

#### **3.4. Conservación de las cepas hospederas de *Bacteroides* spp. seleccionadas**

Las cepas aisladas que cumplieron con las características para ser seleccionadas como indicadores discriminantes del origen de la contaminación fecal, se conservaron siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

Se realizó una siembra de forma masiva de cada una de las cepas aisladas seleccionadas en cajas con agar BPRMA; estas se incubaron por 48 horas a 37 ( $\pm 2$ ) °C en condiciones de anaerobiosis y pasado el tiempo de incubación se tomó parte del crecimiento de las cepas y se sembró en caldo BPRMB; los tubos se llenaron con caldo y la cantidad de caldo se definió de acuerdo a la cantidad de viales de la cepa que se iban a conservar. Estos tubos se incubaron por 24 horas a 37 ( $\pm 2$ ) °C en condiciones de anaerobiosis; después de este tiempo se tomó la bacteria y se mezcló en partes iguales 1:1 (v/v), con el crio-protector- BSA (Albumina de suero bovino) + Sacarosa, la mezcla se distribuyó en crioviales estériles en alícuotas de 1.5 – 2 mL. Estos se llevaron a congelación para ser conservadas a -70 ( $\pm 10$ ) °C. Este procedimiento de conservación se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad tipo II (Payán 2006).

#### **3.5. Identificación de las cepas aisladas**

El método de aislamiento de Payán et al. (2005) está diseñado para aislar exclusivamente cepas del género *Bacteroides* spp. debido a que los medios de cultivo utilizados son altamente selectivos para recuperar este género y la incubación en condiciones de anaerobiosis limita el crecimiento a bacterias anaerobias estrictas. En la segunda fase del procedimiento de aislamiento se realizó tinción de Gram para clasificar las bacterias; no se realizó una prueba de identificación de las cepas aisladas antes de realizar la infección con bacteriófagos, debido a que hasta la tercera fase de aislamiento se obtienen un gran

número de aislamientos por lo que no fue viable identificarlas mediante pruebas bioquímicas o moleculares, ya en la cuarta fase disminuyó drásticamente el conteo y fueron pocos los aislamientos que se dejaron infectar con los fagos. Después de verificar la especificidad y capacidad discriminatoria de las cepas, se confirmó que hacían parte del género *Bacteroides* spp. por medio de pruebas bioquímicas y moleculares.

Las cepas aisladas se identificaron bioquímicamente por medio del kit comercial API 20A (Biomérieux. Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la producción de indol y urea y la fermentación de los azúcares disponibles en el kit, glucosa, maltosa, lactosa, rafinosa, sacarosa, xilosa, manosa, arabinosa, sorbitol, trealosa y salicina.

Adicional a la caracterización bioquímica se realizó genotipificación mediante amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA. El ADN cromosómico de las cepas bacterianas se extrajo con el kit comercial “QIAamp DNA Mini kit” (QIAGEN©) siguiendo las instrucciones del fabricante, como se indica en la sección de marcadores moleculares, en el numeral 3.9.1.

Para la detección del gen 16S rRNA, se utilizaron los siguientes cebadores: Upper GCTACCTTCTTACGACTT Bact16S y Lower Bact16S AGCCAGAATCAAAC (Weisburg et al. 1991). La banda de 1488 pb se analiza por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Syber safe y visualizado por medio de fotodocumentador (Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System Bio-Rad).

El producto de la PCR se secuenció en el Laboratorio de Secuenciación de ADN de la Universidad de Los Andes. La secuencia de nucleótidos obtenida se comparó con la base de datos “nucleotide collection nr/nt” mediante un análisis BLASTn y se registró en el Gen Bank (Anexo B: Registro de la cepa *Bacteroides fragilis* PZ8 al GenBank: Número de acceso KY196191).

### **3.6. Evaluación de indicadores de contaminación fecal cultivables**

Se evaluaron indicadores de contaminación fecal bacterianos y virales, no discriminantes mediante cultivo: coliformes totales, *Escherichia coli*, colifagos somáticos y fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 y marcadores discriminantes, aquellos que diferencian el origen de la contaminación fecal, mediante la infección de cepas de *Bacteroides* spp. con bacteriófagos extraídos de las muestras de agua residual, las cepas utilizadas fueron: *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 (origen humano) y la cepa aislada de contenido intestinal de porcino *Bacteroides fragilis* que se denominó PZ8; estos indicadores se evaluaron en 20 muestras de agua residual proveniente de plantas de tratamiento de aguas residuales de plantas de beneficio de ganado; de estas, 10 muestras provenían de plantas de beneficio de ganado bovino y 10 de plantas de beneficio de ganado porcino. También se evaluaron en 18 muestras de agua residual doméstica provenientes de

tres plantas de tratamiento de agua residual doméstica y finalmente se evaluaron en 54 muestras de agua del río Bogotá.

Este número de muestras se debe a que en el trabajo previo realizado por la Línea de Investigación en Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos y publicado por Venegas et al. (2015), se concluyó que era necesario recolectar y evaluar un mayor número de muestras que las evaluadas en dicho estudio (4 de plantas de beneficio animal, 5 de PTARD y 15 del río Bogotá) para hacer más robusto el análisis estadístico y realizar el análisis de los indicadores cultivables no discriminantes y discriminantes y los marcadores moleculares mediante el software Ichanea®, que fue diseñado y desarrollado en la Universidad de Barcelona en asocio con la Universidad Politécnica de Catalunya específicamente para diferenciar el origen de la contaminación, permitiendo realizar predicciones certeras en estudios de determinación de la contaminación fecal en aguas mediante el entrenamiento del sistema que se realiza ingresando las concentraciones de los indicadores evaluados en muestras con contaminación conocida, ya que está basado en sistemas inductivos de aprendizaje. Por esta razón en el presente estudio se estableció el número de muestras de acuerdo a los parámetros del software, sin embargo, no se realizó el análisis informático debido a que se necesitan más datos como los provenientes de la qPCR que se llevara a cabo más adelante, como se indica en el apartado de recomendaciones. Se estableció que era necesario evaluar mínimo 10 muestras de aguas con contaminación conocida, es decir aquellas provenientes de las plantas de beneficio animal y de las PTARD que presentaban contaminación fecal exclusivamente animal y humana, respectivamente, para evaluar el comportamiento de las cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y *Bacteroides fragilis* PZ8 en aguas contaminación de un origen fecal y posteriormente evaluarlas en 54 muestras del río Bogotá.

### **3.6.1. Descripción de las estaciones de muestreo**

Se seleccionaron cuatro plantas de beneficio: dos que sacrifican ganado bovino, una ubicada en el municipio de La Calera y otra en el municipio de Tabio y dos que sacrifican ganado porcino; una ubicada en el municipio de Zipaquirá y otra en la ciudad de Bogotá. La ubicación de estas plantas de tratamiento se observa en la Figura 1.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas seleccionadas fueron las de los municipios de Guasca y Cajicá y la PTARD El Salitre de Bogotá. La ubicación de estas plantas de tratamiento se observa en la Figura 1.

En el río Bogotá se seleccionaron tres estaciones de muestreo por cada una de las tres cuencas para un total de nueve. La ubicación de estas estaciones de muestreo se observa en la Figura 8.



[http://solar.physics.montana.edu/munoz/AboutMe/ColombianMusic/Intro/Espanol\\_Don\\_de.html](http://solar.physics.montana.edu/munoz/AboutMe/ColombianMusic/Intro/Espanol_Don_de.html),  
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Republic\\_of\\_Colombia\\_-\\_Cundinamarca.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Republic_of_Colombia_-_Cundinamarca.png), [www.google.maps.com](http://www.google.maps.com) y modificado por la autora.

### 3.6.1.1. Plantas de tratamiento de agua residual proveniente del sacrificio de bovinos

#### - Planta de tratamiento de la planta de beneficio del municipio de La Calera

Localizada en el municipio de La Calera, a 18 kilómetros al nororiente de la ciudad de Bogotá. En esta planta de beneficio sacrifican diariamente un promedio de 30 ejemplares de ganado bovino, provenientes del mismo municipio y de otros municipios aledaños de la región del Guavio en el Departamento de Cundinamarca. La planta de beneficio cuenta con una planta para tratar las aguas residuales provenientes del proceso de faenado y sacrificio, el tratamiento consiste en cribado y lodos activos como se observa en la Figura 2, para luego ser vertida al alcantarillado y llevada a la PTARD del municipio. La planta de tratamiento se pone en funcionamiento cada 24 horas, después del sacrificio de los animales y durante el tiempo que se considere necesario. La muestra de agua residual se tomó después del cribado y antes del proceso de aireación, esto con el fin de tomar la menor cantidad de sólidos posibles para facilitar la filtración en el momento del procesamiento y para evitar la oxigenación de las muestras que afecta la concentración de los microorganismos de interés que son anaerobios.



**Figura 2.** Planta de tratamiento de agua residual de la planta de beneficio del municipio de La Calera. **A.** Sección de cribado. **B.** Tanque de aireación. **Fuente:** Autora.



- **Planta de tratamiento de la planta de beneficio del municipio de Tabio**

Localizada en el municipio de Tabio, a 30 kilómetros al noroccidente de la ciudad de Bogotá. En esta planta sacrifican diariamente un promedio de 40 ejemplares de ganado bovino provenientes del mismo municipio y de otros municipios aledaños de la región Sabana Centro en el Departamento de Cundinamarca. La planta de beneficio cuenta con una planta de tratamiento que consiste en cribado y bombeo hasta un módulo en el que se realiza la adición de hipoclorito de sodio a 150 ppm, como se muestra en la Figura 3, para luego verter el efluente al alcantarillado y posteriormente a la PTARD del municipio. La planta de tratamiento se pone en funcionamiento cada 24 horas el tiempo que se considere necesario. La muestra se tomó después del sacrificio de los animales cuando la planta ya se encontraba en funcionamiento, se tomó después del cribado y antes de entrar al tanque de cloración, para no tomar sólidos de gran tamaño que impidieran la filtración y para evitar la acción del cloro sobre la población microbiana de interés para el estudio.



**Figura 3.** Planta de tratamiento de agua residual de la planta de beneficio del municipio de Tabio. **A.** Sección de cribado. **B.** Tanque de aireación. **Fuente:** Autora.

### 3.6.1.2. Plantas de tratamiento de agua residual proveniente del sacrificio de porcinos

- **Planta de tratamiento de la Empresa Frigorífico y Plaza de Ferias de Zipaquirá “EFZ”**

Localizada en el municipio de Zipaquirá, a 47 kilómetros al norte de la ciudad de Bogotá, en la provincia de Sabana Centro. En esta planta de beneficio sacrifican diariamente un promedio de 200 ejemplares de ganado bovino y un promedio de 50 ejemplares de ganado porcino en días y horarios diferentes, provenientes del municipio de Zipaquirá y de otros municipios de la región Sabana Centro en el Departamento de Cundinamarca. La muestra se tomó el día de sacrificio del ganado porcino de la caja de recolección del agua de lavado del contenido intestinal y del lavado de la sala de vísceras blancas antes de entrar al sistema de tratamiento del cual no dieron información ni permitieron la entrada (Figura 4).



**Figura 4.** Frigorífico de Zipaquirá (no permitieron tomar fotografías en las áreas del frigorífico). **Fuente:** Autora.

- **Planta de tratamiento del Frigorífico BLE Ltda.**

Localizada en el occidente de la ciudad de Bogotá, en el barrio el Tintal de la localidad de Kennedy. En esta planta de beneficio sacrifican diariamente un promedio de 1200 ejemplares de ganado bovino y un promedio de 200 ejemplares de ganado porcino en diferentes horarios, provenientes de diferentes departamentos del país, como ya se ha



mencionado del Meta, Arauca, Cundinamarca, entre otros. La muestra de agua es la proveniente del lavado de los intestinos de cerdo que se realiza en las salas de sacrificio, antes de que el agua entre al sistema de tratamiento del cual no dieron información ni permitieron la entrada (Figura 5).



**Figura 5.** Frigorífico BLE. Zona de lavado de vísceras (no permitieron tomar fotografías en otras áreas del frigorífico). **Fuente:** Autora.

Como se observa en la descripción de los sitios de toma de muestra, en las dos últimas estaciones de muestreo el punto de la toma de muestra fue distinto, ya que no autorizaron la toma de muestras de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Las muestras recolectadas hacen parte del afluente de las plantas de tratamiento.

De cada planta de beneficio se recolectaron cinco muestras puntuales de agua, no compuestas, para un total de 20 muestras, las cuales fueron recolectadas en días diferentes. Las cinco muestras de cada planta de beneficio se tomaron en las condiciones mencionadas y se procesaron bajo los mismos parámetros, son replicas exactamente iguales por lo que se calculó el promedio de los resultados obtenidos con los indicadores de contaminación fecal cultivables. El muestreo se realizó durante tres meses iniciando en mayo y finalizando en julio de 2016.

### 3.6.1.3. Plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas

La ubicación de las plantas de tratamiento de agua residual doméstica se observa en la Figura 1.

- **Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Guasca**

Localizada en el municipio de Guasca, a 45 kilómetros al nororiente de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron del afluente de la planta de tratamiento, después de la rejilla de gruesos y finos, para evitar tomar sólidos de gran tamaño y así facilitar la posterior filtración de la muestra en el momento del procesamiento. La PTARD cuenta con pretratamiento (rejillas de gruesos y finos) y adición de cloruro de aluminio para terminar en tanque de sedimentación, como se observa en la Figura 6. Esta planta trata aguas residuales domésticas del municipio el cual no tiene planta de beneficio de animales.



**Figura 6.** Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Guasca. Sección de tanques de sedimentación. **Fuente:** Autora.

- **Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas El Salitre de Bogotá**

Localizada al noroccidente de la ciudad de Bogotá, trata 4 m<sup>3</sup>/s, que corresponden la tercera parte del total de agua residual producida por los ocho millones de habitantes de la ciudad. Las muestras se tomaron en la entrada de la planta de tratamiento a donde llega el río

Salitre y el sistema de alcantarillado de la ciudad, a partir del cual se toma el agua para tratamiento (No fue posible el ingreso ni la toma de fotografías de la planta de tratamiento).

- **Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Cajicá**

Localizada en el municipio de Cajicá, a 17 kilómetros al norte de la ciudad de Bogotá. El tratamiento consiste en pretratamiento con rejillas de gruesos y finos, paso por desarenador y trampa de grasas y finalmente paso a laguna anaerobia, facultativa y aerobia, como se muestra en la Figura 7. Las muestras se tomaron después de la trampa de grasas cuando ya se han retenido los sólidos de gran tamaño en las rejillas para facilitar la filtración en el procesamiento de la muestra. Esta planta trata aguas residuales del municipio, el cual no cuenta con planta de beneficio de animales.



**Figura 7.** Planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Cajicá. Sección de rejillas de gruesos y finos, desarenador, trampa de grasas y lagunas anaerobia, facultativa y aerobia. **Fuente:** Autora.

De cada PTARD se recolectaron seis muestras puntuales de agua, no compuestas, para un total de 18 muestras. En la planta de tratamiento del municipio de Guasca y El Salitre de Bogotá, se tomaron las seis muestras en diferentes días; en la planta de tratamiento del municipio de Cajicá se tomaron las muestras en tres días, tomando cada día dos muestras con una hora de diferencia entre estas. Las seis muestras de cada PTARD se tomaron en las condiciones mencionadas y se procesaron bajo los mismos parámetros, son replicas exactamente iguales por lo que se calculó el promedio de los resultados obtenidos con los indicadores de contaminación fecal cultivables. El muestreo se realizó durante dos meses iniciando en julio y finalizando en agosto de 2016.

#### **3.6.1.4. Estaciones de muestreo en el río Bogotá**

Las estaciones de muestreo se seleccionaron teniendo en cuenta que eran puntos conocidos en los que ya se habían tomado muestras para trabajos de investigación realizados por la Línea de Investigación en Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos, se muestrearon los sitios evaluados en el trabajo de Venegas et al. (2015) en el que se inició la búsqueda de indicadores que discriminan el origen de la contaminación fecal en la cuenca del río Bogotá.

Se seleccionaron nueve estaciones de muestreo en todo el río Bogotá, tres por cada una de las tres cuencas; de cada estación se recolectaron seis muestras puntuales de agua, no compuestas y en diferentes días, iniciando en la cuenca alta hasta realizar todos los muestreos de dicha cuenca, luego se pasó a la cuenca media y finalmente a la cuenca baja, se tomaron 18 muestras por cada cuenca para un total de 54 muestras del río. La ubicación de las estaciones de muestreo se muestra en la Figura 8.

##### **- Cuenca alta del río Bogotá**

Comprende el recorrido del río desde su nacimiento en el páramo de Guacheneque en el municipio de Villapinzón hasta la estación hidrometeorológica ubicada en el Puente La Virgen en el municipio de Cota. Las estaciones seleccionadas para esta parte de la cuenca fueron:

- **Estación de muestreo Villapinzón** (N 05°14'05.2" W 073°35'28.7". Altura: 2617 msnm).

Localizada en el municipio de Villapinzón, a 80 kilómetros al norte de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron cerca del nacimiento del río Bogotá; en este punto el río no ha pasado por el casco urbano de ningún municipio, pero se encuentran algunos asentamientos donde se llevan a cabo actividades agropecuarias, entre estas, cría de ganado porcino y bovino en pequeña escala y producción de leche.

- **Estación de muestreo Saucio** (N 05°12'0.96" W 073°36'19". Altura: 2722 msnm).

Localizada en la vereda Reatova del municipio de Villapinzón. Las muestras se tomaron en un punto localizado después del casco urbano del municipio de Villapinzón, a su paso por este municipio el río recibe las aguas residuales domésticas provenientes del alcantarillado y las aguas residuales de la planta de beneficio de bovinos del municipio, sin tratamiento previo. De igual forma recibe aguas residuales provenientes de aproximadamente 200 curtiembres. Entre la estación Villapinzón y la estación Saucio hay 6.4 kilómetros.

- **Estación de muestreo Puente Florencia** (N 05°03'43.1" W 073°48'12.6".  
Altura: 2598 msnm).

Localizada en el municipio de Sesquilé, a 60 kilómetros al norte de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron en el puente Florencia. En este punto el río ha recorrido las provincias de Almeidas y Sabana Centro del norte del Departamento de Cundinamarca; a su paso recibe las aguas residuales domésticas de los municipios de dichas provincias y las aguas residuales de algunas plantas de beneficio de ganado bovino de la región. Entre la estación Saucio y la estación Puente Florencia hay 30.4 kilómetros.

Para las estaciones de muestreo de la cuenca alta se recolectó y analizó un mayor volumen de agua del río debido a que los niveles de contaminación de esta cuenca son bajos, se tomó un litro de agua en cada una de estas estaciones por cada cepa de *Bacteroides* spp. a analizar y se realizó el procedimiento de concentración descrito por Méndez et al. (2004), lo que permitió aumentar la posibilidad de detección de los indicadores de interés en este tipo de muestra.

De cada estación de muestreo se recolectaron 6 muestras de agua para un total de 18 muestras de la cuenca alta del río; estas se tomaron en diferentes días. El muestreo se realizó durante un mes y medio iniciando a mediados de agosto y finalizando en septiembre de 2016.

#### - **Cuenca media del río Bogotá**

Comprende el recorrido del río desde la estación hidrometeorológica Puente La Virgen hasta las compuertas de Alicachín, en inmediaciones del embalse del Muña en el municipio de Soacha. Las estaciones seleccionadas para esta parte de la cuenca fueron:

- **Estación de muestreo Puente Bavaria** (N 05°03'43.1" W 073°48'12.5".  
Altura: 2441 msnm).

Localizada en el municipio de Tocancipá, a 29 kilómetros al norte de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron en el puente que actualmente es llamado Puente Bavaria; en este punto el río ha pasado por la zona rural y urbana de 8 municipios de las provincias de Almeidas y Sabana Centro del norte del Departamento de Cundinamarca. En este trayecto recibe agua residual doméstica con y sin tratamiento y descargas de aguas residuales provenientes de plantas de beneficio de bovinos de algunos municipios de la zona. En la región se llevan a cabo actividades agropecuarias de forma intensiva como cría de ganado bovino y producción de leche y en menor escala cría de ganado porcino.

- **Estación de muestreo Puente La Virgen** (N 04°47'57.5" W 074°05'45.5".  
Altura: 2559 msnm).

Localizada en el municipio de Cota, a 10 kilómetros al occidente de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron en el Puente La Virgen localizado en la vía que conduce del municipio

de Cota a la ciudad de Bogotá. Entre la estación de muestreo Puente Bavaria y esta estación, el río ha recibido las aguas residuales domésticas tratadas de los municipios de Zipaquirá, Cajicá y Chía y a su paso por el municipio de Cota recibe aguas residuales domésticas sin tratamiento, así como aguas residuales de las plantas de beneficio de bovinos y porcinos localizadas en municipios de la región, como el frigorífico del municipio de Zipaquirá. (En los días de muestreo en el momento de tomar la muestra se observó en esta estación el vertimiento directo de las aguas residuales domésticas del municipio de Cota). Entre la estación Puente Bavaria y la estación Puente La Virgen hay 26 kilómetros.

- **Estación de muestreo El Cortijo** (N 04°43'44.0" W 074°07'36.2". Altura: 2519 msnm).

Localizada en el occidente de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron en el denominado Puente de Guadua en el sector de la calle 80 de la ciudad de Bogotá. En este punto el río ha recorrido las provincias de Almeidas y Sabana Centro del norte del Departamento de Cundinamarca y el norte de la ciudad de Bogotá; a su paso ha recibido las aguas residuales domésticas de algunos de los municipios de dichas provincias y las aguas residuales de las plantas de beneficio de ganado bovino de la región; de igual forma cerca a esta estación recibe el efluente de la PTARD El Salitre que trata las aguas residuales domésticas del norte de la ciudad de Bogotá. Entre la estación Puente La Virgen y la estación El Cortijo hay 8.6 kilómetros.

De cada estación de muestreo se recolectaron 6 muestras de agua para un total de 18 muestras de la cuenca media, recolectadas en diferentes días. El muestreo se realizó durante el mes de octubre de 2016.

- **Cuenca baja del río Bogotá**

Comprende el recorrido del río desde el Embalse del Muña hasta la desembocadura del río Bogotá en el río Magdalena. Las estaciones seleccionadas para esta parte de la cuenca fueron:

- **Estación de muestreo Peaje El Nuevo Salto** (N 04°32'42.5" W 074°16'32.0". Altura: 2424 msnm).

Localizada en el kilómetro 2.4 Vía Chusacá – El Triunfo en la vereda El Charquito del municipio de Soacha, un kilómetro adelante del peaje El Nuevo Salto y del Embalse del Muña localizado al sur de la ciudad de Bogotá. En este punto el río ha pasado por la zona rural y urbana de los municipios de las provincias de Almeidas y Sabana Centro del norte y centro del Departamento de Cundinamarca, por la ciudad de Bogotá y el municipio de Soacha. En este trayecto el río ha recibido agua residual doméstica con y sin tratamiento, agua residual industrial y descargas de aguas residuales provenientes de las grandes plantas de beneficio de bovinos y porcinos de la ciudad de Bogotá y los demás municipios.



- **Estación de muestreo Hidroeléctrica Darío Valencia “La Guaca”** (N 04°35′56.4” W 074°26′0.90”. Altura: 775 msnm).

Localizada en el municipio de El Colegio, a 61 kilómetros al suroccidente de la ciudad de Bogotá. Las muestras se tomaron en el puente sobre el río Bogotá localizado en la vía que conduce del municipio de El Colegio al municipio de La Mesa, cuando el afluente ya ha pasado por la hidroeléctrica Darío Valencia “La Guaca”. Entre la estación de muestreo Peaje El Nuevo Salto y esta estación, el río ha recibido aguas residuales domésticas, así como también ha pasado por El Salto del Tequendama. Entre la estación Peaje El Nuevo Salto y la estación Hidroeléctrica Darío Valencia “La Guaca” hay 34.7 kilómetros.

- **Estación de muestreo Quebrada Santa Marta** (N 04°34′36.5” W 074°26′35.7”. Altura: 1028 msnm).

Localizada en el municipio de El Colegio. Las muestras se tomaron en el Puente sobre la Quebrada Santa Marta en la vía que conduce del municipio de El Colegio al municipio de Viotá; la quebrada es un afluente del río Bogotá que en su trayecto recibe principalmente aguas residuales de origen agropecuario provenientes de las actividades de cría de ganado porcino y en menor proporción de ganado bovino; de igual forma recibe aguas residuales domésticas de algunas veredas y sectores poblados que se encuentran aguas arriba; sin embargo, en el punto en el que se tomaron las muestras, la quebrada aún no recibe la descarga del agua residual doméstica del municipio de El Colegio que es uno de los municipios más grandes de esta zona. Entre la estación Hidroeléctrica Darío Valencia “La Guaca” y la estación Quebrada Santa Marta hay 5.2 kilómetros.

En el caso de la estación de muestreo Quebrada Santa Marta se analizó un mayor volumen de agua debido a que los niveles de contaminación de este afluente son bajos, al igual que en las estaciones de la cuenca alta del río Bogotá, se tomó un litro de agua en esta estación, por cada cepa de *Bacteroides* spp. a analizar y se realizó el procedimiento de concentración descrito por Méndez et al. (2004), lo que permitió aumentar la posibilidad de detección de los indicadores de interés en este tipo de muestra.

De cada estación de muestreo se recolectaron 6 muestras de agua para un total de 18 muestras de la cuenca baja del río, recolectadas en diferentes días. El muestreo se realizó durante el mes de noviembre de 2016.

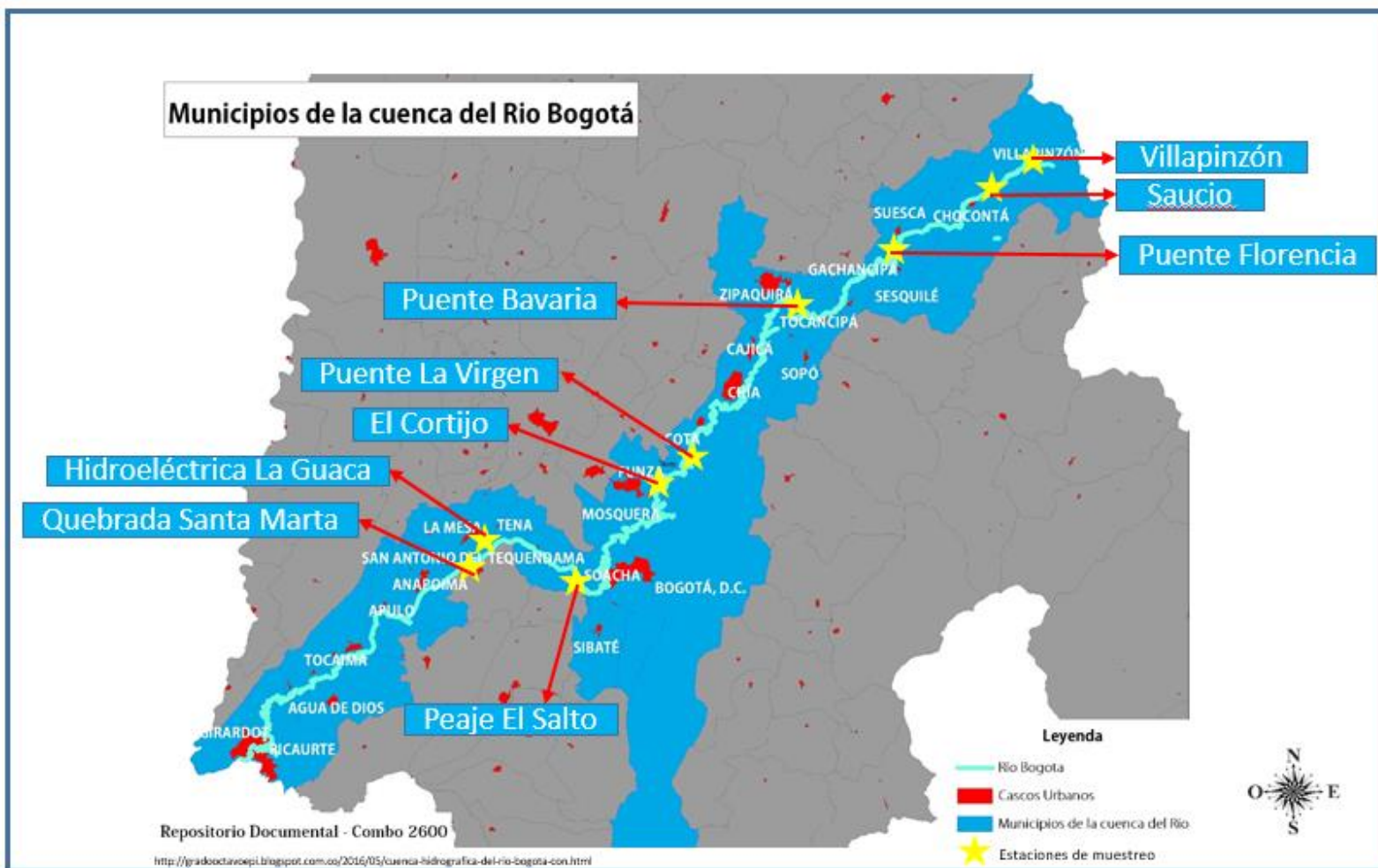
Todas las muestras de agua del río Bogotá se tomaron en horas de la mañana, en frascos de polipropileno estériles y se preservaron en condiciones de refrigeración (4 - 6 °C) según el protocolo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 9006 A- 3 (APHA, 2012). Se transportaron al Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos de la Pontificia Universidad Javeriana en donde se procesaron dentro de las 24 horas siguientes a su recolección. En cada una de las estaciones de muestreo se diligenciaron las cadenas de custodia que permitieron recolectar datos del lugar, conocer las principales características del sitio de muestreo y confirmar el tipo de contaminación registrando las características

del agua y sí se observaban vertimientos cercanos a la estación de muestreo; el modelo de la cadena de custodia utilizada se observa en el Anexo A.

Las muestras provenientes de cada estación de muestreo de las tres cuencas del río Bogotá se tomaron en las condiciones mencionadas y se procesaron bajo los mismos parámetros, son replicas exactamente iguales por lo que se calculó el promedio de los resultados obtenidos con los indicadores de contaminación fecal cultivables por cada estación de muestreo y por cada cuenca.

En algunos casos se llevaron a cabo repeticiones en el procesamiento de las muestras para confirmar los recuentos, debido a que se encontraban resultados inconsistentes de acuerdo a lo hallado en las demás replicas; en el apartado de resultados estas repeticiones se encuentran identificadas con un asterisco (\*).





**Figura 8.** Área de estudio: ubicación geográfica de las estaciones de muestreo sobre el río Bogotá. **Fuente:** Tomado de <http://gradooctavoepi.blogspot.com.co/2016/05/cuenca-hidrografica-del-rio-bogota-con.html> y modificado por la autora.

### **3.7. Detección y cuantificación de indicadores bacterianos no discriminantes: coliformes totales y *E. coli* (ISO 9308 - 1, 2014).**

Para la evaluación de coliformes totales y *E. coli*, se realizó una homogenización de la muestra; luego se hicieron diluciones seriadas 1 en 10 en peptona salina hasta la dilución  $10^{-3}$  o hasta una dilución mayor o menor dependiendo del grado de contaminación de las muestras que se analizaron. En el caso de las muestras con baja contaminación se filtró más volumen como ya se mencionó en la descripción de las estaciones de muestreo que presentaron baja contaminación. Posteriormente se hizo el montaje de la técnica de filtración por membrana, que consiste en el uso de un equipo de filtración en el que se acopla una membrana de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de  $0.45 \mu\text{m}$  de  $47 \text{ mm}$ ; por medio de dicho sistema se filtró la muestra con  $20 \text{ mL}$  de peptona salina estéril; posteriormente la membrana se colocó sobre el medio de cultivo agar Chromocult (Merck), las cajas del medio se llevaron a incubación a  $37 (\pm 2) ^\circ\text{C}$  por  $24 (\pm 2)$  horas (ISO 2014). Se incluyó como control positivo *E. coli* ATCC 25922 y como control negativo *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Se realizó el recuento del número de colonias que presentaron una coloración violeta que corresponden a *E. coli*, la coloración violeta se da por la degradación enzimática de los dos sustratos cromógenos presentes en el medio de cultivo, el Salmón-Gal y el X-Glu, degradados por las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucoronidasa. Aquellas colonias que presentaron color rojo por la degradación del sustrato Salmon-Gal únicamente, corresponden a coliformes totales sumando el recuento de *E. coli*; se informó el resultado Coliformes totales y *E. coli* como Unidades Formadoras de Colonia UFC/100 mL de muestra analizada.

### **3.8. Detección y cuantificación de indicadores virales no discriminantes: colifagos somáticos y bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 e indicadores discriminantes: bacteriófagos que infectan *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 y *Bacteroides fragilis* cepa PZ8 (ISO 10705 - 2 2000, ISO 10705 - 4 2001, Araujo et al. 2001).**

La detección y cuantificación de indicadores virales no discriminantes: colifagos somáticos y bacteriófagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 y los indicadores discriminantes: bacteriófagos que infectan *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 y *Bacteroides fragilis* PZ8, se realizó mediante la técnica de doble capa de agar. Esta se realiza para lograr que los bacteriófagos extraídos de las diferentes muestras infecten cepas de *Bacteroides* spp. hospedadoras. Lo que cambia en esta técnica es la cepa hospedera según el fago a identificar. La técnica se realiza mezclando el crecimiento bacteriano en caldo de la cepa hospedera que se debe encontrar en fase logarítmica a una densidad óptica de 0.3 a 0.5 y densidad celular de  $10^8$  UFC/mL, según la curva de crecimiento de la bacteria, con suspensión de bacteriófagos extraídos de las muestras de agua, contenido intestinal o materia fecal o el volumen de las diluciones de dicha suspensión y medio semi sólido. Esta mezcla se agita y finalmente se vierte sobre la superficie de una caja con una capa de agar

sólido, se distribuye uniformemente y se deja solidificar sobre una superficie horizontal; posteriormente se incuba a 37 ( $\pm 2$ ) °C por 18 ( $\pm 2$ ) h en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis según corresponda. Pasado el tiempo de incubación se cuentan el número de calvas o placas de lisis formadas sobre el césped bacteriano en cada caja de Petri usando luz oblicua indirecta y se informa el resultado como Unidades Formadoras de Placa (UFP/100 mL de muestra). Las especificaciones de esta técnica se describen en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1. Componentes de la técnica de doble capa de agar para el recuento de indicadores virales no discriminantes: colifagos somáticos (ISO 10705 - 2, 2000) y bacteriófagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 (ISO 10705 - 4, 2001).**

BACTERIA HOSPEDADORA	CONTROL POSITIVO (Bacteria + bacteriófago)	CONTROL NEGATIVO (Césped bacteriano)	MEDIO DE CULTIVO	INCUBACIÓN
<i>Escherichia coli</i> WG5	<i>E. coli</i> WG5 ATCC 700078 + Fago Ø174 ATCC 13706 B-1	<i>E. coli</i> WG5 ATCC 700078	Agar Scholtens Modificado MSA	18 ( $\pm 2$ ) horas en aerobiosis
<i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056	<i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 + Fago B56-3	<i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056	<i>Bacteroides</i> Phages Recovery Medium Agar BPRMA	22 ( $\pm 2$ ) horas en anaerobiosis

**Tabla 2. Componentes de la técnica de doble capa de agar para el recuento de indicadores virales discriminantes: bacteriófagos que infectan las cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y *Bacteroides fragilis* PZ8 (ISO 10705 - 4, 2001).**

BACTERIA HOSPEDADORA	CONTROL POSITIVO (Bacteria + bacteriófago)	CONTROL NEGATIVO (Césped bacteriano)	MEDIO DE CULTIVO	INCUBACIÓN
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 + Fago GA17	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17	BPRMA	22 ( $\pm 2$ ) horas en anaerobiosis
<i>Bacteroides fragilis</i> PZ8	<i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 + Fago PZ8	<i>Bacteroides fragilis</i> PZ8	BPRMA	22 ( $\pm 2$ ) horas en anaerobiosis

### **3.9. Evaluación de marcadores moleculares de *Bacteroidetes* y *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium dentium*.**

Se evaluaron los marcadores moleculares mediante PCR convencional para los marcadores *Bacteroidetes* HF183F y CF128F y mediante PCR anidada para los marcadores de *Bifidobacterium adolescentis* (ADO) y *B. dentium* (DEN).

#### **3.9.1. Procedimiento de extracción de ADN de bacterias a partir de muestras de agua residual y de materia fecal animal**

La extracción y purificación del ADN de las muestras de agua o materia fecal se realizó utilizando el kit comercial QIAmp DNA mini Kit®, DNeasy Blood & Tissue Kit® (QIAGEN GmbH group, Hilden, Alemania) utilizando 6 mL de muestra y siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Posteriormente se realizó un procedimiento de concentración de la muestra, como se indica a continuación:

Se tomaron 2 mL de heces o de agua y se vertió en un tubo eppendorf de 1.5 - 2 mL estéril; este se centrifugó por 10 min a 7.500 rpm, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet. Este paso se repitió tres veces para lograr la concentración de la muestra. Al tubo que contenía el pellet se adicionaron 200 µl de solución tampón fosfato, PBS por sus siglas en inglés (Phosphate Buffered Saline), 200 µl de buffer AL, 20 µl de Proteinasa K del kit y 20 µl de Lisozima; se mezcló con vórtex, posteriormente se incubó el tubo eppendorf que contiene la muestra en baño serológico a 56°C durante 10 minutos.

Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 200µl de etanol (96 – 100 %) y se mezcló; luego se pasó todo el contenido del tubo a una columna Dneasy Mini y se colocó la columna dentro de un tubo de colección de 2mL; se centrifugó la columna Dneasy Mini a 8000 rpm durante 1 minuto y se descartó el tubo de colección que contenía el sobrenadante. Luego se colocó la columna Dneasy Mini en un nuevo tubo de colección y se adicionaron 500 µl de buffer AW1; este tubo se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto; en este paso se descartó el tubo de colección que contenía el sobrenadante.

La columna se colocó en un nuevo tubo de colección y se adicionaron 500 µl de buffer AW2, centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Esta columna se depositó en un nuevo tubo eppendorf; en esta se adicionaron 200 µL de Buffer AE a temperatura ambiente para eluir el DNA. Finalmente se incubó el tubo por 1 minuto a temperatura ambiente (15 - 25°C) y luego se centrifugó a 8.000 rpm por 1 minuto; se descartó la columna y se conservó el tubo eppendorf que contenía el ADN extraído. Después de la extracción el ADN se cuantificó y se almacenó a -20°C hasta el momento en el que se utilizó para la PCR. La extracción de ADN se realizó dentro de las 6 horas posteriores a la recolección de la muestra.

De igual forma se realizó la extracción de ADN de cepas de *Bacteroidetes* de las cepas *Bacteroides fragilis* RYC 2056 y *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y de las cepas *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083) y *Bifidobacterium dentium* (DSM 20084) para

utilizarlas como controles positivos de las PCR que se realizaron. Para esta extracción se utilizaron viales de trabajo de cada una de las cepas mencionadas, que estaban conservados a -70°C.

Las cepas de *B. adolescentis* (DSM 20083) y *B. dentium* (DSM 20084) utilizadas como controles positivos para la PCR Múltiplex ADO-DEN provienen de la colección alemana de cultivos tipo (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) las cuales fueron donados por la Universidad de Barcelona.

### **3.9.2. Verificación de pureza y calidad del ADN**

La cuantificación del ADN se realiza por espectrofotometría mediante la relación de las lecturas de las absorbancias a 260 y 280 nm. Las preparaciones de ADN a 260 y 280 nm tienen una relación de 1.80 a 2.0.

### **3.9.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para los marcadores de origen humano *Bacteroidetes* HF183F, Bact708R (Bernhard & Field 2000a, Bernhard & Field 2000b).**

Se efectuó la identificación de especies *Bacteroidales* por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional cualitativa que identifica la región V2 de la subunidad 16S rRNA mediante los cebadores o iniciadores (primers) específicos HF183 (5'ATCATGAGTTCACATGTCCG3') forward (Bernhard & Field 2000a) y Bac708R (5'CAATCGGAGTTCTTCGTG 3') reverse (Bernhard & Field 2000b). La mezcla de componentes se realizó siguiendo las indicaciones y los parámetros de corrida que se muestran en la Tabla 3.

### **3.9.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional para los marcadores de origen animal *Bacteroidetes* CF128F, Bact708R (Bernhard & Field 2000a, Bernhard & Field 2000b).**

Se efectuó la identificación de especies *Bacteroidales* por medio de PCR convencional cualitativa que identifica la región V2 de la subunidad 16S rRNA mediante los cebadores (primers) específicos CF128F (5'CCAACYTTCCCGWTAATC 3') forward (Bernhard & Field 2000a) y Bac708R (5'CAATCGGAGTTCTTCGTG 3') reverse (Bernhard & Field 2000b). La mezcla de componentes se realizó siguiendo las indicaciones y los parámetros de corrida que se observan en la Tabla 3.

### **3.9.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada para la detección e identificación molecular de *Bifidobacterium* spp. (Kaufmann et al. 1997, Matsuki et al. 1999, Bonjoch et al. 2004).**

Se efectuó la identificación de especies de *Bifidobacterium* por medio de PCR anidada. Inicialmente se realizó la amplificación de la subunidad 16S rRNA utilizando los primers Lm26 (5'GATTCTGGCTCAGGATGAACG 3') forward y Lm3 (5'CGGGTGCTICCACTTTCATG)

reverse (Kaufmann et al. 1997). La mezcla de componentes se realizó siguiendo las indicaciones y los parámetros de corrida que se muestran en la Tabla 3.

Con los productos de la PCR anidada se realizó la segunda PCR del tipo múltiplex, con los iniciadores BI ADO 1 (5'CTCCAGTTGGATGCATGTC 3'); BI ADO 2 (5'CGAAGGCTTGCTCCCAGT 3') y BI DEN 1 (5'ATCCCGGGGGTTGCGCT 3'); BI DEN 2 (5'GAAGGGCTTGCTCCCGA 3') (Matsuki et al. 1999) y realizando la mezcla de componentes y los parámetros de corrida que se observan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Componentes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, anidada y múltiplex**

MARCADOR	INICIADORES (10 $\mu$ M) CANTIDAD ( $\mu$ L)	GoTaq <sup>®</sup> Green Master Mix ( $\mu$ L)	AGUA ( $\mu$ L)	ADN ( $\mu$ L)	VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN ( $\mu$ L)	PARÁMETROS DE CORRIDA	CONTROL POSITIVO	LECTURA. Banda de amplificación (pb)
<b>HF183F</b>	Forward 0.5	5	2	2	10	Temperatura de denaturación: 94°C - 5 min. 94°C - 1 minuto Temperatura de anillamiento: 55°C - 1 minuto* 72°C - 1 minuto y 30 segundos (35 ciclos) Fase de extensión final: 72°C - 7 minutos.	ADN de <i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i> cepa GA17.	520 pb
<b>Bact708R</b>	Reverse 0.5							
<b>CF128F</b>	Forward 0.5	5	2	2	10	Temperatura de denaturación: 94°C - 5 min. 94°C - 1 minuto Temperatura de anillamiento: 52°C - 1 minuto* 72°C - 1 minuto y 30 segundos (35 ciclos) Fase de extensión final: 72°C - 7 minutos.	ADN de la cepa de <i>Bacteroides</i> <i>fragilis</i> RYC2056.	580 – 590 pb
<b>Bact708R</b>	Reverse 0.5							

Tabla 3. (Continuación)

MARCADOR	INICIADORES (10 $\mu$ M) CANTIDAD ( $\mu$ L)	GoTaq® Green Master Mix ( $\mu$ L)	AGUA ( $\mu$ L)	ADN ( $\mu$ L)	VOLUMEN FINAL DE REACCIÓN ( $\mu$ L)	PARÁMETROS DE CORRIDA	CONTROL POSITIVO	LECTURA. Banda de amplificación (pb)
Lm3 – Lm26 para ADO y DEN	Forward 0.6	5	1.8	2 (1 $\mu$ L c/u)	10	Temperatura de denaturación: 94°C - 5 min. 94°C - 1 minuto Temperatura de anillamiento: 59°C - 3 minutos* 72°C – 4 minutos (35 ciclos) Fase de extensión final: 72°C - 7 minutos.	ADN extraído de <i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> y <i>Bifidobacterium</i> <i>dentium</i>	1.35 kb.
	Reverse 0.6							
ADO y DEN	Bi-ADO1 Forward 0.6	5	0.6	2	10	Temperatura de denaturación: 94°C - 5 min. 94°C – 20 seg. Temperatura de anillamiento: 59°C – 20 seg. * 72°C - 30 seg. (35 ciclos) Fase de extensión final: 72°C - 5 minutos.	ADN extraído de <i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> y <i>Bifidobacterium</i> <i>dentium</i> .	279 pb para <i>B.</i> <i>adolescentis</i> y 387 pb para <i>B. dentium</i> .
	Bi-ADO2 Reverse 0.6							
	Bi-DEN1 Forward 0.6							
	Bi-DEN2 Reverse 0.6							

\*Se debe tener en cuenta que la temperatura de anillamiento varía de acuerdo a la temperatura de fusión (melting) de cada iniciador, esta se obtiene en el momento de la síntesis de los iniciadores.



### 3.9.6. Visualización de los productos de la PCR

Los productos de la PCR obtenidos se visualizaron mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa con una concentración de 2,5%, utilizando buffer TBE (Tris - Base, EDTA, ácido bórico) a una concentración de 1X. El gel fue marcado con el fluorocromo Syber Safe® y se usó un marcador de peso molecular TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen. USA), se utilizó el fluorocromo Syber Safe® evitando el uso del agente fluorescente Bromuro de Etidio que se utilizaba anteriormente en el proceso de marcación del ADN y que en la actualidad no es comúnmente usado debido a que es un potente agente mutagénico. Posteriormente se realizó el corrido electroforético a 60V durante 90 minutos en cámara de electroforesis horizontal y por último se visualizó en un analizador de imagen, fotodocumentador Bio-Rad (Gel Doc™ XR) (**Anexo C:** Visualización de los productos de PCR de la evaluación de los marcadores moleculares discriminantes de contaminación fecal).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

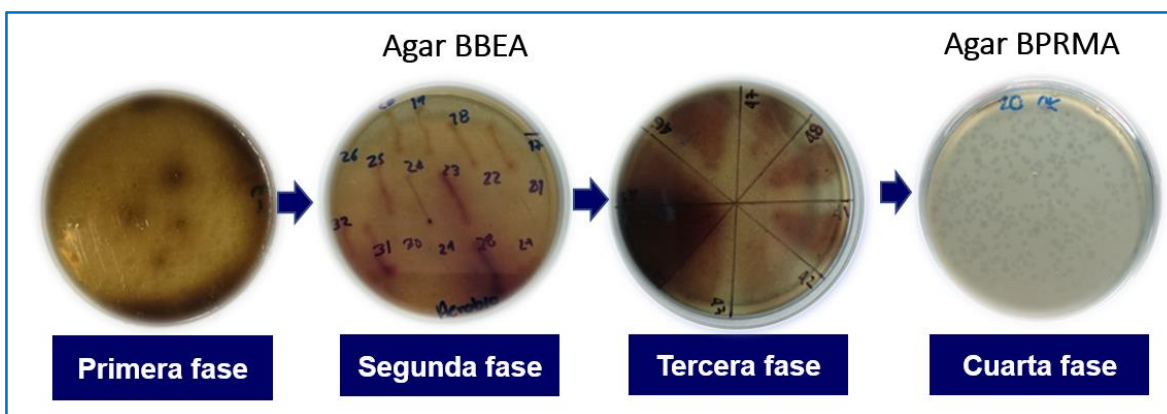
### 4.1. Aislamiento de cepas de *Bacteroides* spp. indicadoras de contaminación fecal animal

#### 4.1.1. Cepas provenientes de contenido intestinal de ganado bovino

Se realizaron seis muestreos de contenido intestinal de bovinos; inicialmente se tomaron tres muestras en el frigorífico del municipio de Zipaquirá, al no lograr el aislamiento se cambió de sitio de tomas de muestra a la planta de beneficio del municipio de Tabio en donde se tomaron dos muestras y finalmente una en el Frigorífico BLE de la ciudad de Bogotá.

Como se mencionó en el numeral 3.1.3. de materiales y métodos, se realizó un muestreo por conveniencia para la recolección de las muestras de contenido intestinal, estas se tomaron hasta que se logró el aislamiento y selección de las cepas de *Bacteroides* spp. de origen porcino y en el caso del ganado bovino hasta que se decidió no continuar con el procedimiento debido a que se logró el aislamiento de algunas cepas, pero estas no cumplieron con todos los criterios de selección.

En la primera fase del procedimiento se obtuvieron un total de 248 colonias negras características para cepas de *Bacteroides* spp. en agar BBEA, como se observa en la Figura 9; en la segunda fase se obtuvieron 203 colonias que crecieron en condiciones de anaerobiosis; en la tercera fase se obtuvieron 170 aislamientos que crecieron en agar BPRMA y en el caldo BPRMB (Tabla 4). Dichos aislamientos bacterianos se infectaron con los bacteriófagos extraídos de las mismas muestras de donde se realizó el aislamiento; es decir, las recolectadas en la planta de beneficio del municipio de Tabio y en los frigoríficos de Zipaquirá y BLE. Después de pasar por todas las fases del procedimiento, solo una cepa cumplió con todos los requerimientos, como se observa en la Tabla 4; sin embargo, esta no cumplió con el criterio de inclusión relacionado con el recuento, que debe ser mayor a 50 UFP/100 mL o superior al obtenido con la cepa de referencia para este método *Bacteroides fragilis* RYC2056, como lo indica el protocolo de Payán et al. (2005), por lo que no se logró la selección de la cepa que discrimina la contaminación fecal de origen bovino.



**Figura 9.** Fases del proceso de aislamiento de *Bacteroides* spp. a partir de contenido intestinal de ganado bovino o porcino. **Fuente:** Autora.

**Tabla 4.** Cepas aisladas de muestras de contenido intestinal de ganado bovino

FASE DEL PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO	Primer muestreo Zipaquirá Nº de colonias	Segundo muestreo Zipaquirá Nº de colonias	Tercer muestreo Zipaquirá Nº de colonias	Cuarto muestreo Tabio Nº de colonias	Quinto muestreo Tabio Nº de colonias	Sexto muestreo BLE Nº de colonias	Total
Primera fase	64	26	3	191	16	48	248
Segunda fase	64	26	3	80	12	42	203
Tercera fase	43	26	3	46	12	40	170
Cuarta fase (infección)	0	0	0	1	0	0	1

El procedimiento de aislamiento no fue eficiente en el caso de las cepas de origen bovino debido a que no se logró el aislamiento de una cepa que cumpliera todos los criterios de selección, esto se pudo deber a la diferencia en el tipo de muestra recolectada, ya que en el frigorífico de Zipaquirá y en la planta de beneficio de Tabio se tomó contenido intestinal y en el Frigorífico BLE la mezcla de residuos fecales de bovino que son reunidos y mezclados antes de ser procesados como compostaje, mientras que en el aislamiento de cepas de origen porcino siempre se tomó el mismo tipo de muestra, correspondiente al contenido intestinal.

Otro aspecto que interfirió en el aislamiento fue el número de animales sacrificados en cada planta de beneficio, ya que en Zipaquirá y Tabio se tomaba contenido intestinal siempre de cinco animales simultáneamente, que eran los que abarcaban la sala de sacrificio; mientras que en el Frigorífico BLE se tomó la muestra a partir de residuos fecales de una gran cantidad de animales que se mezclan, como ya se ha mencionado, para ser procesados como

compostaje. Es importante tener en cuenta que las condiciones de muestreo, transporte, procesamiento e incubación de las muestras de bovinos fueron las mismas de las de origen porcino. Otro aspecto que pudo interferir en el procedimiento de aislamiento fue la diferencia en la textura y consistencia de la muestra, ya que las muestras de contenido intestinal de bovino eran menos compactas que la observada en las heces de porcinos, lo que pudo afectar la pérdida de las condiciones de anaerobiosis en el momento del transporte de la muestra.

Se observó que las concentraciones de bacterias en las muestras de origen bovino fueron superiores a las halladas en muestras de origen porcino y las de fagos menores, estas se detectaron mediante los recuentos de fagos que infectan la cepa *Bacteroides fragilis* RYC2056; por lo que se infiere que los recuentos no fueron suficientes para lograr el aislamiento de cepas de contenido intestinal de bovino. Las variaciones en las concentraciones de microorganismos de la microbiota intestinal de animales destinados al sacrificio, se atribuyen a la disminución de los sistemas de defensa inmunológica debido a los niveles de estrés a los que son sometidos en el momento del traslado de una región a otra y al alistamiento previo al sacrificio, como lo reporta el trabajo de Baer et al. (2013).

En la literatura se encuentra un reporte de aislamiento de cepas de *Bacteroides* spp. de origen bovino, el trabajo de Wicki et al. (2011), en el que reporta el hallazgo de una cepa aislada en plantas de beneficio de ganado bovino y caballos en Suiza; la cepa de origen bovino fue denominada ARABA KBA60 y presentó un recuento de  $1 \times 10^2$  UFP/100 mL. En el estudio citado se reporta que para la selección de cepas de origen bovino, se logró el aislamiento de aproximadamente 100 cepas en las fases iniciales del procedimiento, mientras que en el presente estudio se superaron los 250 aislamientos, considerándose una población alta con respecto al estudio, sin embargo, sólo una cepa llegó a la etapa de infección, esto indica que en las primeras fases no se presentaron errores en el procedimiento, en cuanto a factores como pérdida de las características de los medios altamente selectivos para *Bacteroides* spp. o pérdida de las condiciones de anaerobiosis.

En el estudio citado se llevó a cabo el aislamiento a partir de muestras de materia fecal de bovinos y en el presente estudio se tomaron muestras del contenido intestinal en el momento del sacrificio, se recomienda para futuros estudios evaluar la toma de muestra del líquido ruminal de los bovinos, teniendo en cuenta que este mantiene condiciones de anaerobiosis, lo que facilitaría la supervivencia de las bacterias de interés que son anaerobias estrictas. Para esta toma de muestra se recomienda establecer un mejor punto de muestreo, incluso contemplar la posibilidad de extraer la muestra en el animal en pie y no en el momento del sacrificio.

Por estas razones y debido a aspectos relacionados con los recursos económicos del proyecto, no se continuó el aislamiento de cepas de origen bovino y se pasó al aislamiento de cepas a partir de contenido intestinal de porcino.

#### 4.1.2. Cepas provenientes de contenido intestinal de ganado porcino

Se realizaron cuatro muestreos de contenido intestinal de porcinos en el frigorífico del municipio de Zipaquirá; en la primera fase se aislaron 120 colonias características para *Bacteroides* spp., de color negro en el agar BBEA como se observa en la Figura 9, en la segunda fase 75 colonias que crecieron en condiciones de anaerobiosis, en la tercera fase 53 aislamientos que crecieron en el agar BPRMA y en el caldo BPRMB (Tabla 5); a estos aislamientos bacterianos se les infectó con los bacteriófagos extraídos de las mismas muestras de donde se obtuvo el aislamiento. En el cuarto muestreo se seleccionaron 25 aislamientos que cumplieron con todas las fases del procedimiento y criterios de selección, como se observa en la Tabla 5; a estos se les realizaron pruebas de especificidad y evaluación de la capacidad para discriminar la contaminación fecal de origen porcino.

Tabla 5. Cepas aisladas de muestras de contenido intestinal de ganado porcino

FASE DEL PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO	Primer muestreo Zipaquirá N° de colonias	Segundo muestreo Zipaquirá N° de colonias	Tercer muestreo Zipaquirá N° de colonias	Cuarto muestreo Zipaquirá N° de colonias	Total
Primera fase	48	24	16	32	120
Segunda fase	16	24	3	32	75
Tercera fase	10	14	1	28	53
Cuarta fase (infección)	0	0	0	25	25

Para probar la capacidad discriminadora de los 25 aislamientos seleccionados, que consiste en discriminar la contaminación fecal de un origen diferente al propio (porcino), se llevó a cabo el procedimiento de infección con suspensiones de bacteriófagos extraídos de muestras de origen fecal bovino y humano.

En el caso de los fagos de origen bovino se utilizó una muestra de contenido intestinal tomada en la planta de beneficio del municipio de Tabio y en los frigoríficos de Zipaquirá y BLE en Bogotá, ninguna de las cepas recuperó fagos de origen bovino. Para confirmar que las cepas aisladas diferenciaban entre la contaminación fecal animal y humana se realizó la infección con fagos extraídos de agua residual doméstica de PTARD, de una muestra de la planta de tratamiento del municipio de Guasca y otra de El Salitre de Bogotá, que presentaban exclusivamente contaminación fecal humana; estos bacteriófagos no infectaron las 25 cepas aisladas, lo que confirma que recuperan únicamente bacteriófagos de su propio origen fecal.

En cuanto a la evaluación de la especificidad, se realizó la infección con bacteriófagos extraídos de muestras de su mismo origen fecal, provenientes de dos muestras de heces obtenidas de granjas porcícolas ubicadas en el municipio de Guasca y con fagos de contenido intestinal de porcino obtenidos del mismo lugar de donde se lograron los aislamientos (Frigorífico de Zipaquirá) pero de diferentes fechas, 19 de las 25 cepas aisladas no recuperaron bacteriófagos.

Las seis cepas restantes presentaron recuentos del orden de  $10^5$  UFP/100 mL como se observa en la Tabla 6; estos fueron superiores a 50 UFP/100 mL, que es lo establecido en el protocolo de Payán et al. (2005) con la cepa de referencia para este método *Bacteroides fragilis* RYC2056. Estos recuentos coinciden con lo reportado por Gómez-Doñate et al. (2011), en el que aislaron y evaluaron dos cepas en agua con contaminación porcina obteniendo recuentos de  $10^5$  UFP/mL.

Las seis cepas aisladas de contenido intestinal de origen porcino que cumplieron con todos los criterios de especificidad y capacidad discriminatoria, que no recuperaron bacteriófagos de origen humano o bovino, se seleccionaron como cepas con capacidad para diferenciar la contaminación fecal de origen porcino en aguas; las cepas se denominaron PZ8, PZ13, PZ15, PZ26, PZ32 y PZ35.

Las pruebas bioquímicas realizadas mediante el kit comercial API20A muestran que las cepas evaluadas son indol negativo y urea negativa, fermentaron los azúcares glucosa, maltosa, lactosa, rafinosa, sacarosa y xilosa y no utilizaron los sustratos manosa, arabinosa, sorbitol, trealosa y salicina, el porcentaje de coincidencia obtenido indica que bioquímicamente las cepas aisladas corresponden a especies del género *Bacteroides* spp, como se muestra en la Tabla 6.

La PCR 16S rRNA llevada a cabo para identificar las cepas aisladas dio como resultado productos de aproximadamente 780 pb. Al secuenciar los productos y realizar el análisis en bases de datos, se obtuvo que cinco de los seis aislamientos correspondieron a *Bacteroides fragilis* con más del 90% de semejanza entre las secuencias obtenidas y las secuencias de ADN ribosomal de la región V2 de la subunidad ribosomal de la especie *Bacteroides fragilis*, como se observa en la Tabla 6. La identificación de las cepas aisladas coincide con el trabajo de Gómez-Doñate et al. (2011) en el que se reporta que los aislamientos de cepas de *Bacteroides* spp. de origen fecal porcino, fueron identificados como *Bacteroides fragilis*.

**Tabla 6. Recuento de la infección con bacteriófagos de origen porcino e identificación bioquímica y genotípica de cepas aisladas a partir del contenido intestinal de porcinos**

CEPA	Recuento (UFP/100 mL)	API 20A % ID	16S rRNA % ID	IDENTIFICACIÓN
PZ8	5.6 x 10 <sup>5</sup>	99.7	99	<i>Bacteroides fragilis</i> (S14)
PZ13	5.1 x 10 <sup>5</sup>	80.1	93	<i>Bacteroides fragilis</i> (1202)
PZ15	4.4 x 10 <sup>5</sup>	80.1	93	Bacterium NLAE-zl-P776 **
PZ26	2.2 x 10 <sup>5</sup>	89.1	98	<i>Bacteroides fragilis</i> (S14)
PZ32	2.6 x 10 <sup>5</sup>	80.1	93	<i>Bacteroides fragilis</i> (GB-307)
PZ35	2.2 x 10 <sup>5</sup>	90.0	97	<i>Bacteroides fragilis</i> (98-3X)

\*\**Bacterium* de origen porcino.

El presente trabajo constituye el tercer reporte de aislamiento de cepas de *Bacteroides* spp. que tienen potencial para indicar la presencia de contaminación fecal de origen animal, específicamente de porcino, ya que en la literatura sólo se encuentra el trabajo de Gómez-Doñate et al. (2011) en el que lograron dos aislamientos a partir de agua con contaminación de origen porcino en España, las cepas denominadas PG76 y PG1226 que presentaron recuentos en un rango entre 1x10<sup>5</sup> y 1x10<sup>6</sup> UFP/100 mL, coincidiendo con los reportados en el presente estudio y el trabajo de Wicki et al. (2011) en el que reportan el hallazgo de una cepa aislada en plantas de beneficio de ganado bovino y caballos en Suiza denominada ARABA KBA60.

Se ha observado que el método de aislamiento es más eficiente para aislar cepas de *Bacteroides* spp. de origen humano que de origen animal; por esta razón, la búsqueda de indicadores que diferencian el origen de la contaminación se ha centrado en el aislamiento de cepas indicadoras de contaminación fecal humana, ejemplos de los reportes de estas cepas son: *B. tethaioataomicron* GA17 y *B. fragilis* HB13 (Payán et al. 2005), *B. fragilis* GB124 (Ebdon et al. 2007), *B. fragilis* ARABA 84 (Wicki et al. 2011) y *B. fragilis* CA8 (Venegas et al. 2015).

#### **4.1.3. Evaluación de la especificidad de las cepas de *Bacteroides* spp. aisladas de contenido intestinal de ganado porcino**

Las seis cepas de *Bacteroides* spp. que cumplieron con los criterios para ser seleccionadas como potenciales indicadores de la presencia de contaminación fecal de porcino, fueron evaluadas en agua residual de plantas de beneficio de bovino, de porcinos y en agua residual doméstica.

Cuatro de los seis aislamientos seleccionados PZ8, PZ13, PZ32 y PZ35, presentaron concentraciones por debajo de <1.0x10<sup>2</sup> UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica), al ser evaluados en aguas residuales de las plantas de beneficio de ganado bovino de los

municipios de Tabio y La Calera como se observa en la Tabla 7. Esto indica su especificidad como indicadores de contaminación porcina debido a que no recuperaron fagos de otro origen fecal diferente al de su propio origen. Las cepas PZ15 y PZ26 presentaron un recuento del orden de  $10^1$  UFP/100 mL por lo cual fueron descartadas como cepas indicadoras de la contaminación fecal de porcino ya que, al presentar un recuento en aguas contaminadas con materia fecal de bovino, se evidencia que no son específicas para diferenciar contaminación por materia fecal de porcino.

**Tabla 7. Evaluación de las cepas de *Bacteroides* spp. aisladas de contenido intestinal de porcino en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos, de porcinos y en agua residual doméstica**

CEPAS EVALUADAS	PLANTAS DE BENEFICIO DE BOVINOS. n = 10. Promedio (UFP/100 mL)	PLANTAS DE BENEFICIO DE PORCINOS. n = 10. Promedio (UFP/100 mL)	PTARD. n = 18. Promedio (UFP/100 mL)
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8</b>	$<1.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ13</b>	$<1.0 \times 10^2$	$6.4 \times 10^2$	$6.1 \times 10^1$
<b>Fagos <i>Bacteroides</i> spp. PZ15</b>	$1.0 \times 10^1$	N.D.	N.D.
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ26</b>	$5.0 \times 10^1$	N.D.	N.D.
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ32</b>	$<1.0 \times 10^2$	$5.4 \times 10^2$	N.D.
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ35</b>	$<1.0 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	N.D.

N.D.: De acuerdo a los resultados obtenidos en cada tipo de agua residual, las cepas se iban descartando; en las siguientes etapas se evaluaron sólo aquellas cepas que cumplieran con los criterios de especificidad como potenciales cepas que discriminan el origen de la contaminación fecal de porcino.

En cuanto a la evaluación de las cepas seleccionadas en aguas residuales de plantas de beneficio de ganado porcino, todas las cepas recuperaron fagos en un recuento del orden de  $10^2$  UFP/100 mL como se muestra en la Tabla 7; sin embargo, las cepas PZ32 y PZ35 presentaron resultados por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) en al menos uno de los diez muestreos realizados de agua residual de plantas de porcino; por esta razón fueron descartadas como cepas indicadoras de la contaminación fecal de porcino.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se continuó con la evaluación de la especificidad con los aislamientos denominados PZ8 y PZ13, la primera cepa recuperó fagos



en la totalidad de las muestras evaluadas y la segunda en el 80% de las muestras. Los recuentos obtenidos son menores a los reportados por Gómez-Doñate et al. (2011), donde las cepas seleccionadas como potenciales indicadoras de la contaminación fecal de porcino presentaron recuentos en un rango entre  $10^3$  y  $10^5$  UFP/100 mL en la totalidad de las muestras cuando fueron evaluadas en 40 muestras de agua con contaminación porcina; si bien los recuentos obtenidos con las cepas aisladas en el presente estudio son menores en comparación con el estudio citado, se confirma el potencial de la cepa PZ8 debido a que recuperó fagos en todas las muestras evaluadas cumpliendo con los criterios para ser seleccionada como discriminante de la contaminación fecal porcina.

En la evaluación realizada en aguas residuales domésticas, los fagos que infectan la cepa PZ13 presentaron un recuento del orden de  $10^1$  UFP/100 mL, como se observa en la Tabla 7, lo que indicaría que no es específica para discriminar la contaminación fecal porcina, por lo que se descartó como cepa indicadora de este tipo de contaminación. Sin embargo, estos resultados coinciden con lo reportado en el trabajo de Gómez-Doñate et al. (2011) en el que las dos cepas aisladas y seleccionadas como indicadoras de contaminación fecal porcina, PG76 y PG1126, fueron infectadas por fagos en el 50 y 57% respectivamente, de 70 muestras de agua residual doméstica evaluadas, presentando un recuento del orden de  $10^3$  UFP/100 mL, si bien el recuento reportado en dicho trabajo es mayor al obtenido con la cepa PZ13, se puede inferir que las cepas aisladas a partir de contenido intestinal de porcino o de aguas con contaminación fecal porcina, eventualmente pueden recuperar bacteriófagos de origen humano. Los recuentos obtenidos en el presente estudio se pueden deber a contaminación por manipulación por parte de los empleados de la planta de beneficio o debido a una mezcla de contaminación fecal humana y animal, ya que en una de las plantas de beneficio de porcinos no fue posible el ingreso para tomar las muestras y en la otra planta los canales que transportan las aguas residuales no se encuentran totalmente separados, por lo queda la duda de que exista una conexión errada con las aguas de los baños de los empleados.

Los resultados de la evaluación de la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 en agua residual doméstica estuvieron por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) en aguas domésticas, lo que confirma su potencial como cepa discriminante de la contaminación fecal porcina.

Teniendo en cuenta estos resultados, la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 fue la más específica y cumplió con todos los criterios para ser seleccionada como una cepa potencial para diferenciar la contaminación fecal de origen porcino, por lo cual se considera que es una buena candidata para ser seleccionada como cepa indicadora de contaminación fecal porcina en nuestras condiciones geográficas y ambientales particulares. El aislamiento de esta cepa cobra importancia debido a que en el país ha aumentado el consumo de carne de cerdo (Asoporcicultores 2016), lo que implica un incremento en el sacrificio de animales y por consiguiente un aumento en el volumen de vertimientos contaminantes procedentes del sacrificio y faenado de este tipo de ganado; por lo que es necesario contar con

herramientas para que las autoridades ambientales ejerzan control en las fuentes generadoras de contaminación y apliquen las sanciones correspondientes.

La cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 se seleccionó para ser evaluada en aguas del río Bogotá. La secuencia de esta cepa fue depositada en el GenBank con número de acceso KY196191. El fragmento de DNA amplificado de esta cepa muestra un 99% de similitud con *Bacteroides fragilis* S14, la secuencia y el registro en el GenBank se muestra en el Anexo B.

#### **4.2. Evaluación de marcadores no discriminantes y discriminantes de contaminación fecal en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos**

Los resultados de los indicadores de contaminación fecal en el afluente de la planta de beneficio de bovinos del municipio de La Calera se observan en la Tabla 8. Los indicadores bacterianos, coliformes totales se encuentran en un promedio de  $10^7$  UFC/100 mL y *E. coli* en  $10^6$  UFC/100 mL. En cuanto a indicadores virales, los colifagos somáticos se encuentran en  $10^6$  UFP/100 mL y los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 en  $10^2$  UFP/100 mL.

Con respecto a los indicadores que discriminan la fuente de contaminación, se observó que con la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, específica para la contaminación fecal de origen humano y con la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, de origen porcino; los resultados estuvieron por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica), lo que indica su especificidad como cepa discriminante de la contaminación fecal humana y animal, respectivamente; ya que no recuperaron bacteriófagos de origen fecal bovino. Debido a que los resultados de la cepa *B. thetaiotaomicron* GA17 se encontraron por debajo del límite de cuantificación de la técnica, no se calculó la diferencia entre la concentración de colifagos somáticos y bacteriófagos que infectan *B. thetaiotaomicron* cepa GA17 (CS-GA17 unidades  $\log_{10}$ ).

En cuanto a los marcadores moleculares discriminantes se observó que los marcadores HF183F, ADO y DEN no se detectaron en este tipo de agua con contaminación bovina, confirmando su especificidad como marcadores de contaminación humana y coincidiendo con los resultados obtenidos mediante cultivo con la cepa *B. thetaiotaomicron* GA17, que se encontraron por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica). Con respecto al marcador CF128F, se detectó en la totalidad de las muestras, evidenciado su especificidad como marcador de contaminación fecal bovina.

**Tabla 8. Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de beneficio de bovinos del municipio de La Calera**

<b>INDICADORES NO DISCRIMINANTES</b>						
<b>n = 5</b>	<b>11 de mayo</b>	<b>13 de mayo</b>	<b>16 de mayo</b>	<b>18 de mayo</b>	<b>24 de mayo</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>Coliformes Totales (UFC/100 mL)</b>	4.3x10 <sup>6</sup>	6.3x10 <sup>6</sup>	5.9x10 <sup>6</sup>	5.6x10 <sup>6</sup>	3.2x10 <sup>7</sup> *	1.1x10 <sup>7</sup>
<b><i>E. coli</i> (UFC/100 mL)</b>	2.7x10 <sup>6</sup>	3.6x10 <sup>6</sup>	5.0x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>	2.0x10 <sup>7</sup> *	7.1x10 <sup>6</sup>
<b>Colifagos Somáticos (UFP/100 mL)</b>	2.2x10 <sup>6</sup>	3.6x10 <sup>6</sup>	4.2x10 <sup>6</sup>	3.3x10 <sup>6</sup>	1.7x10 <sup>6</sup>	3.0x10 <sup>6</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (UFP/100 mL)</b>	2.0x10 <sup>2</sup>	2.0x10 <sup>2</sup>	2.0x10 <sup>2</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>	1.6x10 <sup>2</sup>
<b>INDICADORES DISCRIMINANTES</b>						
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	N.A.
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	N.A.
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>)</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
<b>ADO</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>DEN</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>HF183F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>CF128F</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.

\* En estas muestras se realizaron repeticiones para confirmar los recuentos.

N.D.: No dato, debido a que el resultado de la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraba por debajo de <1.0x10<sup>2</sup> UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) no se calculó la diferencia entre CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>). N.A.: No aplica.

Los resultados de los indicadores de contaminación fecal en el afluente de la planta de beneficio de bovinos del municipio de Tabio se muestran en la Tabla 9. Los indicadores bacterianos, coliformes totales y *E. coli* se encuentran en un promedio de  $10^6$  UFC/100 mL. En cuanto a indicadores virales, los colifagos somáticos se encuentran en un promedio de  $10^6$  UFP/100 mL y los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 en promedio de  $10^2$  UFP/100 mL.

En relación a los indicadores que discriminan la fuente de contaminación, la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, de origen humano y la cepa *Bacteroides fragilis* PZ8, de origen porcino; presentaron resultados por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica), confirmando su especificidad, ya que no recuperaron bacteriófagos provenientes de agua con contaminación bovina. Debido a que los resultados de la cepa *B. thetaiotaomicron* GA17 se encontraron por debajo del límite de cuantificación de la técnica, no se calculó la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ).

En cuanto a los marcadores moleculares discriminantes se observó que los marcadores de contaminación fecal humana HF183F, ADO y DEN no se detectaron en este tipo de agua con contaminación bovina, confirmando su especificidad y coincidiendo con los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa *B. thetaiotaomicron* GA17 mediante cultivo, que se encontraron por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica). El marcador CF128F se detectó en la totalidad de las muestras, evidenciado su especificidad como marcador de contaminación fecal bovina.

**Tabla 9. Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de beneficio de bovinos del municipio de Tabio**

INDICADORES NO DISCRIMINANTES						
n = 5	11 de mayo	13 de mayo	16 de mayo	18 de mayo	24 de mayo	PROMEDIO
<b>Coliformes Totales (UFC/100 mL)</b>	$4.5 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$3.4 \times 10^6$	$3.8 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$	$4.4 \times 10^6$
<b><i>E. coli</i> (UFC/100 mL)</b>	$3.3 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$
<b>Colifagos Somáticos (UFP/100 mL)</b>	$1.2 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	$4.4 \times 10^6$	$4.8 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (UFP/100 mL)</b>	$1.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	$2.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$

Tabla 9. (Continuación)

INDICADORES DISCRIMINANTES						
n = 5	11 de mayo	13 de mayo	16 de mayo	18 de mayo	24 de mayo	PROMEDIO
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	N.A.
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	N.A.
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>)</b>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.A.
<b>ADO</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>DEN</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>HF183F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>CF128F</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.

N.D.: No dato, debido a que el resultado de la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraba por debajo de <1.0x10<sup>2</sup> UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) no se calculó la diferencia entre CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>). N.A.: No aplica.

Las concentraciones de los indicadores microbiológicos de contaminación fecal en el agua residual de las plantas de tratamiento de plantas de beneficio de bovinos de La Calera y Tabio fueron muy cercanas, esto se debe a diferentes factores como el número de animales sacrificados que es similar en ambas plantas; el tipo de muestra recolectada, que se tomó del mismo punto en las dos plantas de tratamiento; también se destaca la similitud en la procedencia de los vacunos, estos provienen de los municipios aledaños a las plantas de beneficio que se encuentran ubicadas muy cerca una de la otra, por lo que las razas de los bovinos sacrificados son las mismas, como Holstein, Normando, Jersey, Pardo Suizo, Angus, Simmental, entre otras (Martín-Burriel et al. 1999, Martínez et al. 2008); de igual forma la proximidad de los sitios de crianza del ganado a las plantas de beneficio evita grandes traslados de los animales, lo que les podría generar condiciones de estrés desencadenando variaciones en las concentraciones de microorganismos (Caballero & Sumano 1993, West 2003, Chacon et al. 2005).

Los indicadores no discriminantes como coliformes totales en el agua residual de las dos plantas de beneficio se encontraron en un promedio de 7.6x10<sup>6</sup> UFC/100 mL, la concentración es similar en ambas plantas a pesar de que los tratamientos aplicados al agua

son diferentes, los valores hallados se encuentran en el mismo rango que los reportados por Gannoun et al. (2009), de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/100 mL en agua residual sin tratar proveniente de una planta de beneficio de bovinos en Túnez.

*E. coli* presenta recuentos similares a los reportados por Um et al. (2015), en un trabajo realizado en aguas con heces de ganado bovino en Francia, en donde obtuvieron una concentración promedio de  $8.5 \times 10^5$  UFC/100 mL, en el presente trabajo los valores de *E. coli* hallados se encuentran en un promedio de  $5.1 \times 10^6$  UFC/100 mL, lo que indica que los indicadores evaluados estuvieron una unidad por encima de los valores hallados en el estudio citado. En dicho estudio se indica que las variaciones en estos niveles se pueden deber a características del ganado que se sacrifica en las plantas de beneficio, tales como edad y tipo de alimentación.

Los valores de *E. coli* hallados en el presente estudio en las plantas de beneficio de bovinos coinciden con lo reportado por Venegas et al. (2015), un promedio de  $10^6$  UFC/100 mL, este valor se encuentra dos unidades por encima de lo reportado en el estudio realizado por Colomer-Lluch et al. (2011) en el que evaluaron la presencia de indicadores microbiológicos en heces líquidas y sólidas y en aguas de plantas de beneficio de ganado vacuno en Barcelona, encontrando una concentración de  $3.3 \times 10^4$  UFC/100 mL; de igual forma, el valor promedio de colifagos somáticos de  $3.5 \times 10^6$  UFP/100 mL del presente estudio, se encuentra dos unidades por encima de lo obtenido por los autores mencionados, quienes reportan una concentración de  $1.1 \times 10^4$  UFP/100 mL; lo que indica una mayor carga microbiana contaminante en las plantas de beneficio evaluadas, en comparación a las evaluadas en España, debido probablemente a las diferencias en el tipo de ganado sacrificado, la forma o técnica del sacrificio, el origen de la muestra (si es contenido intestinal, materia fecal, agua proveniente del lavado de intestinos, del lavado de instalaciones o agua contaminada con materia fecal) y el manejo de las aguas residuales provenientes del sacrificio (European Commission 2005).

En cuanto a los recuentos de colifagos somáticos hallados en el presente estudio coinciden con lo reportado por Gómez-Doñate et al. (2011) en un estudio realizado en España, en el que se encuentran estos indicadores virales en un promedio de  $1.1 \times 10^6$  UFP/100 mL en diez muestras de aguas contaminadas con residuos fecales de bovinos. En cuanto a los resultados de la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 se encontró que en el mismo estudio se presentaron recuentos en el 100% de 45 muestras evaluadas, en el orden de  $10^3$  UFP/100 mL, una unidad por encima del promedio de los recuentos hallados en el presente estudio.

El promedio de la concentración de los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 de las dos plantas de beneficio de bovinos fue de  $1.5 \times 10^2$  UFP/100 mL, coincidiendo con el promedio de  $10^2$  UFP/100 mL hallado en el estudio de Venegas et al. (2015) que se realizó en plantas de beneficio de la misma área de la cuenca del río Bogotá; de igual forma coincide con los promedios reportados por Payán et al. (2005) en Suecia  $1.4 \times 10^2$  UFP/100 mL en el 25% de ocho muestras y en Reino Unido  $2.0 \times 10^2$  UFP/100 mL en

el 25% de cuatro muestras; en el mismo estudio reportaron en Francia un promedio de  $1.2 \times 10^3$  UFP/100 mL en el 70% de 10 muestras y en España de  $1.5 \times 10^4$  UFP/100 mL en el 57% de siete muestras, es decir una y dos unidades por encima de lo hallado, respectivamente. Estas diferencias se pueden explicar por las diferencias del tipo de ganado sacrificado y el tipo de muestra recolectada que varían en los estudios realizados en los diferentes países ya mencionados (European Commission 2005).

Con respecto a los fagos que infectan las cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y *Bacteroides fragilis* PZ8, se encontraron concentraciones menores a  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) en la totalidad de las muestras evaluadas, lo que confirma su especificidad como potenciales cepas indicadoras de contaminación fecal humana y porcina, respectivamente, ya que, al ser evaluadas en aguas con contaminación bovina, no recuperaron bacteriófagos de este origen.

Para el caso de la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, este resultado es igual al obtenido en un estudio realizado por Payán et al. (2005) en el que no detectaron los fagos que infectan la cepa GA17 en aguas con contaminación bovina, en España en siete muestras, en Francia en 10, en Suecia en ocho y en Reino Unido en cuatro. De igual forma el resultado coincide con lo reportado por Gómez-Doñate et al. (2011) quienes evaluaron la cepa GA17 en 45 muestras de agua residual de plantas de beneficio de bovinos sin hallar fagos que la infectaran y coinciden con lo hallado en el trabajo de Venegas et al. (2015), en el que evaluaron cuatro muestras del mismo tipo de agua proveniente de la misma área de la cuenca del río Bogotá, lo que confirma la especificidad de la cepa como indicador de contaminación fecal humana, ya que no recuperó bacteriófagos de origen fecal bovino en la Unión Europea ni en la zona estudiada en el área de la cuenca del río Bogotá en condiciones diferentes a las ya evaluadas en otros países.

En el caso de la cepa *Bacteroides fragilis* PZ8, los resultados son comparables con lo obtenido en el estudio citado de Gómez-Doñate et al. (2011), con las cepas de *Bacteroides fragilis* PG76 y *Bacteroides fragilis* PG1226, también aisladas de origen fecal porcino; estas cepas no recuperaron fagos de origen fecal bovino al ser evaluadas en el mismo número de muestras de agua residual proveniente de plantas de beneficio de bovinos, lo que confirmó su potencial para ser seleccionadas como indicadoras de contaminación fecal de origen porcino, tal como ocurrió con la cepa PZ8 aislada en el presente estudio, que no recuperó fagos provenientes de las muestras de agua residual de las dos plantas de beneficio de bovinos evaluadas .

En cuanto a los marcadores moleculares evaluados en aguas residuales de plantas de beneficio de ganado bovino, los resultados coinciden con lo reportado por Bernhard & Field. (2000a) en el que no detectaron el marcador HF183F en 19 muestras de origen fecal bovino y detectaron el marcador CF128F en la totalidad de las muestras. Los resultados también coinciden con lo obtenido en el estudio de Ahmed et al. (2008) realizado en el sureste de Queensland (Australia), evaluando 20 muestras con contaminación fecal bovina en las que

no se detectó el marcador HF183F. Así mismo los resultados coinciden con lo hallado por Ahmed et al. (2009) en el que el marcador HF183F no se detectó al ser evaluado en 10 muestras de origen fecal bovino; en un segundo reporte del mismo autor el marcador HF183F no se detectó en 20 muestras iguales. Los resultados obtenidos con el marcador CF128F coinciden con lo que se evidenció en el estudio de Fremaux et al. (2009), en el que el marcador fue detectado en 49 de 51 muestras de origen fecal bovino, confirmando su especificidad como indicador de este tipo de contaminación.

Bonjoch et al. (2004), no detectaron los marcadores moleculares de contaminación fecal humana ADO y DEN en dos muestras de agua residual con contaminación fecal bovina evaluadas, estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, lo que indica la especificidad de estos marcadores moleculares para indicar la presencia o ausencia de contaminación fecal humana en muestras con contaminación fecal animal.

De igual forma los resultados obtenidos con los marcadores moleculares coinciden con lo reportado por Venegas et al. (2015) en el que se evaluaron los mismos marcadores en cuatro muestras de agua residual con contaminación bovina, encontrando que los marcadores de contaminación humana HF183F, ADO y DEN no se detectaron en ninguna de las muestras evaluadas, mientras que el marcador de contaminación bovina CF128F se detectó en la totalidad de las muestras, confirmando la especificidad de estos marcadores para indicar el origen de la contaminación fecal en este tipo de agua residual.

Es importante tener en cuenta que en la literatura también se encuentran reportes de la detección de marcadores moleculares de origen fecal humano, en muestras de agua residual con contaminación bovina, como en el trabajo de Ballesté et al. (2010) en el que el marcador HF183F se detectó en 3 de 19 muestras de origen bovino, el marcador ADO en 6 de 17 muestras, el marcador DEN en 1 de 17 muestras y finalmente el marcador de origen fecal bovino CF128F, que se detectó en 5 de 19 muestras. Lo hallado en el estudio citado confirma la necesidad de correlacionar los resultados de los marcadores moleculares con los de los marcadores cultivables, ya que un único marcador por sí sólo no define el origen de la contaminación fecal.

#### **4.3. Evaluación de marcadores no discriminantes y discriminantes de contaminación fecal en aguas residuales de plantas de beneficio de porcinos**

Los resultados de la evaluación de indicadores de contaminación fecal en aguas residuales de la planta de beneficio de ganado porcino del municipio de Zipaquirá se observan en la Tabla 10. Los indicadores bacterianos se encontraron en un promedio de  $10^7$  UFC/100 mL, los colifagos somáticos en  $10^6$  UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en promedio de  $10^5$  UFP/100 mL.



Con respecto a los marcadores discriminantes, los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraron en un promedio de  $2.8 \times 10^5$  UFP/100 mL, calculado con el recuento de dos muestras de los cinco muestreos realizados, ya que en los tres restantes se presentaron resultados por debajo de  $<3.3 \times 10^1$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica), que se tomaron como cero en el momento de calcular el promedio. Con estos resultados se puede inferir la posible presencia de contaminación fecal humana, que se puede deber a una fuente humana por parte de los empleados o por conexiones erradas de las tuberías que transportan el agua residual doméstica de los baños del personal que labora en la planta de beneficio. Sin embargo, al relacionar estos resultados con los obtenidos con la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) que se encontró en un promedio de 0.3, por ser un valor alejado de 2 unidades, indica que este tipo de muestras no presentaron contaminación fecal humana. Los resultados de estos dos indicadores de contaminación fecal humana difieren entre sí, lo que refuerza el principio de la disciplina de MST que indica que un único marcador no es suficiente para determinar la fuente o el origen de la contaminación fecal (Simpson et al. 2002, Field & Samadpour 2007, Hagedorn et al. 2011). En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, se encontraron en todas las muestras evaluadas en un promedio de  $10^2$  UFP/100 mL, indicando que la cepa es potencialmente útil para discriminar la contaminación fecal de origen porcino, ya que se dio la infección con los bacteriófagos extraídos de agua residual con contaminación fecal porcina.

En cuanto a los marcadores moleculares HF183F, ADO y DEN como marcadores de contaminación fecal humana no se encontraron en este tipo de agua y el marcador CF128F se detectó en la totalidad de las muestras, indicando la presencia de contaminación bovina en el agua residual evaluada, lo que se puede deber a la presencia de residuos contaminantes del sacrificio de bovinos, ya que como se ha mencionado en esta planta sacrifican los dos tipos de ganado y los canales de transporte y cajas de recolección del agua residual proveniente del sacrificio y del lavado de las áreas, no se encuentran totalmente separados generando una mezcla de contaminación fecal.

**Tabla 10. Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales del Frigorífico de Zipaquirá**

<b>INDICADORES NO DISCRIMINANTES</b>						
<b>n = 5</b>	<b>25 de mayo</b>	<b>02 de junio</b>	<b>07 de junio</b>	<b>09 de junio</b>	<b>16 de junio</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>Coliformes Totales (UFC/100 mL)</b>	8.7x10 <sup>7</sup>	6.9x10 <sup>7</sup>	7.4x10 <sup>7</sup>	1.2x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	5.6x10 <sup>7</sup>
<b><i>E. coli</i> (UFC/100 mL)</b>	7.2x10 <sup>7</sup>	5.3x10 <sup>7</sup>	6.9x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	4.3x10 <sup>7</sup>
<b>Colifagos Somáticos (UFP/100 mL)</b>	5.1x10 <sup>4</sup>	5.0x10 <sup>5</sup>	1.1x10 <sup>6</sup>	1.9x10 <sup>6</sup>	3.6x10 <sup>6</sup>	1.4x10 <sup>6</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (UFP/100 mL)</b>	1.0x10 <sup>2</sup>	6.7x10 <sup>1</sup>	3.3x10 <sup>1</sup>	8.1x10 <sup>5*</sup>	7.4x10 <sup>4*</sup>	1.8x10 <sup>5</sup>
<b>INDICADORES DISCRIMINANTES</b>						
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	<3.3x10 <sup>1</sup>	<3.3x10 <sup>1</sup>	<3.3x10 <sup>1</sup>	1.2x10 <sup>6*</sup>	1.9x10 <sup>5*</sup>	2.8x10 <sup>5</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	3.3x10 <sup>1</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>	4.0x10 <sup>2</sup>	6.3x10 <sup>2</sup>	1.8x10 <sup>3</sup>	5.9x10 <sup>2</sup>
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>)</b>	N.D.	N.D.	N.D.	0.2	1.3	N.A.
<b>ADO</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>DEN</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>HF183F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>CF128F</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.

\* En estas muestras se realizaron repeticiones para confirmar los recuentos.

N.D.: No dato, debido a que el resultado de la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraba por debajo de <3.3x10<sup>1</sup> UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) no se calculó la diferencia entre CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>). N.A.: No aplica.

Los resultados de la evaluación de indicadores de contaminación fecal en aguas residuales de la planta de beneficio de ganado porcino frigorífico BLE se muestran en la Tabla 11. Los coliformes totales se encontraron en un promedio de  $10^9$  y *E. coli* en  $10^8$  UFC/100 mL, los colifagos somáticos en  $10^8$  UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en  $10^3$  UFP/100 mL.

Con respecto a los marcadores discriminantes, los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraron en cuatro de las cinco muestras del frigorífico BLE, en un promedio de  $10^4$  UFP/100 mL, encontrándose el mismo caso del frigorífico de Zipaquirá, lo que indica la posible presencia de contaminación fecal humana debida probablemente al contacto y manipulación por parte de los empleados en el momento del sacrificio de los porcinos. En cuanto al cálculo de la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ), este arrojó un valor de 3.4, lo que indica la presencia de contaminación fecal animal en las muestras evaluadas. En cuanto a los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, se hallaron en todas las muestras en promedio de  $10^2$  UFP/100 mL, lo que indica el potencial de dicha cepa para discriminar la contaminación fecal de origen porcino.

En cuanto a los marcadores moleculares no se detectaron en la mayoría de las muestras, excepto en una muestra tomada el 13 de junio, positiva para el marcador ADO indicador de contaminación fecal humana, lo que puede confirmar la presencia de contaminación humana en el afluente dada la alta especificidad reportada para el marcador ADO. Este resultado se puede deber a contaminación por una fuente humana por parte de los empleados de la planta de beneficio.

**Tabla 11. Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales del Frigorífico BLE de Bogotá**

<b>INDICADORES NO DISCRIMINANTES</b>						
<b>n = 5</b>	<b>02 de junio</b>	<b>07 de junio</b>	<b>08 de junio</b>	<b>13 de junio</b>	<b>15 de junio</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>Coliformes Totales (UFC/100 mL)</b>	5.6x10 <sup>7</sup>	2.1x10 <sup>7</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	4.5x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>9</sup>
<b><i>E. coli</i> (UFC/100 mL)</b>	1.9x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>8</sup>	7.9x10 <sup>8</sup>
<b>Colifagos Somáticos (UFP/100 mL)</b>	4.5x10 <sup>6</sup>	4.4x10 <sup>6</sup>	4.3x10 <sup>7</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>8</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (UFP/100 mL)</b>	1.0x10 <sup>2</sup>	<3.3x10 <sup>2</sup>	<3.3x10 <sup>2</sup>	3.1x10 <sup>4*</sup>	1.0x10 <sup>3*</sup>	6.4x10 <sup>3</sup>
<b>INDICADORES DISCRIMINANTES</b>						
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	1.3x10 <sup>2</sup>	6.7x10 <sup>2</sup>	<3.3x10 <sup>2</sup>	5.5x10 <sup>4*</sup>	1.0x10 <sup>3*</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	6.7x10 <sup>1</sup>	3.3x10 <sup>2</sup>	3.3x10 <sup>2</sup>	1.0x10 <sup>3*</sup>	3.3x10 <sup>2*</sup>	4.1x10 <sup>2</sup>
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>)</b>	4.5	3.8	N.D.	4.2	4.5	N.A.
<b>ADO</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	N.A.
<b>DEN</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>HF183F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.
<b>CF128F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.

\* En estas muestras se realizaron repeticiones para confirmar los recuentos.

N.D.: No dato, debido a que el resultado de la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraba por debajo de <3.3x10<sup>1</sup> UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) no se calculó la diferencia entre CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>). N.A.: No aplica.

Los recuentos de coliformes totales hallados en las dos plantas de beneficio de ganado porcino se encuentran en un promedio de  $5.4 \times 10^8$  UFC/100 mL; este valor se encuentra una unidad por encima del valor reportado en el estudio de Claydong et al. (2001) en el que el promedio de los coliformes totales en agua residual de una planta de beneficio de ganado porcino es de  $1 \times 10^7$  NMP/100 mL, sin embargo se encuentra que el promedio obtenido en el frigorífico de Zipaquirá coincide con el estudio citado, ya que este fue de  $5.6 \times 10^7$  UFC/100 mL, así mismo concuerda con lo reportado por Barros et al. (2007) en una evaluación de la contaminación microbiana en aguas de plantas de beneficio de porcinos realizada en Sao Paulo (Brasil), en la que encontraron recuentos de  $10^7$  NMP/100 mL en aguas provenientes de todo el proceso de sacrificio y en el afluente del sistema de tratamiento, en temporada seca y de lluvia, coincidiendo con el presente estudio que se realizó en temporada de lluvias.

En los estudios realizados por Cortés et al. (2010) y Colomer-Lluch et al. (2011) se evaluó la presencia de coliformes fecales, *E. coli* y colifagos somáticos en agua residual con contaminación porcina en Barcelona, encontrando una concentración de *E. coli* en promedio de  $4.6 \times 10^5$  UFC/100 mL, valor inferior en tres unidades al promedio de  $4.2 \times 10^8$  UFC/100 mL, calculado de las dos plantas de beneficio evaluadas en este estudio. En cuanto a los colifagos somáticos, en el estudio citado reportan una concentración de  $7.6 \times 10^5$  UFP/100 mL, que es inferior en dos unidades al promedio de  $9.9 \times 10^7$  UFP/100 mL hallado de las dos plantas de beneficio de porcinos del presente estudio. Resultados similares se hallaron en el estudio de Claydong et al. (2001) donde se determinó el uso de los colifagos somáticos como indicadores de contaminación de origen fecal en diferentes tipos de agua, fueron detectados en muestras de aguas tratadas, aguas residuales de origen doméstico, industrial y agrícola. En las aguas residuales provenientes de plantas de beneficio de ganado, la mayor concentración de colifagos somáticos de todas las muestras evaluadas se encontró en muestras de aguas de plantas de beneficio de ganado porcino con una concentración de  $10^4$  UFP/100 mL.

El promedio de los recuentos de *E. coli* obtenidos en el frigorífico de Zipaquirá de  $4.3 \times 10^7$  UFC/100 mL coinciden con el reporte de Barros et al. (2007), quienes obtuvieron un recuento de  $10^7$  NMP/100 mL en aguas provenientes de todo el proceso de sacrificio y en el afluente del sistema de tratamiento, en temporada de lluvia, lo que concuerda con el presente estudio realizado en una época lluviosa.

Los resultados de la evaluación de los indicadores bacterianos y virales en las dos plantas de beneficio de porcinos fueron similares, sin embargo, los resultados de coliformes totales, *E. coli* y colifagos somáticos en el frigorífico BLE fueron superiores en dos unidades a las halladas en el frigorífico de Zipaquirá, esto se puede deber a la diferencia en la cantidad de animales sacrificados, en el Frigorífico BLE es de 200 porcinos en el día y en Zipaquirá 50, en una proporción de 4 a 1. Las variaciones en las concentraciones también se pueden deber a las diferencias en el tipo de muestra evaluada, ya que en el frigorífico BLE se tomó agua del lavado intestinal con todas las heces del animal, lo que sería una evaluación de la carga fecal directa y en el caso del frigorífico de Zipaquirá se tomó la muestra de las cajas

recolectoras de agua residual en las que se mezcla el agua proveniente del sacrificio, de todos los procesos y procedimientos y del lavado de las diferentes áreas del frigorífico antes de ir a la planta de tratamiento de aguas residuales. Para explicar las diferencias en las concentraciones de los indicadores mencionados también se debe tener en cuenta la procedencia de los porcinos; los que se sacrifican en el Frigorífico BLE en su mayoría provienen de regiones apartadas del país, por lo que su traslado desde el lugar de origen hacia la planta de beneficio implica recorrer largas distancias generando estrés en los animales y ocasionando la liberación de una mayor cantidad de microorganismos debido a la disminución de las defensas del sistema inmunológico (Baer et al. 2013), mientras que los porcinos sacrificados en Zipaquirá provienen de los municipios aledaños al frigorífico; este aspecto también implica que las razas de los animales sacrificados y la forma de alimentación y crianza sean diferentes debido al origen diverso, lo que influye directamente en las diferencias en la microbiota intestinal de estos animales y por consiguiente en las concentraciones de los microorganismos evaluados, puesto que los cerdos que llegan al Frigorífico BLE procedentes de zonas alejadas son de razas propias de clima cálido que se ven favorecidas por las condiciones ambientales en el crecimiento y desarrollo del animal, mientras que los de Zipaquirá son de razas de clima frío; se encuentran algunas propias del país como el San Pedreño, Zungo Costeño (CLEM), Zungo de Turipaná, “Casco de Mula” y otras adaptadas como el Hampshire, Duroc o Duroc-Jersey, Yorkshire, Landrace y Pietrain y el cerdo comercial (Koeslag 2001, Oslinger et al. 2006).

Gómez-Doñate et al. (2011) evaluaron diez muestras de agua con contaminación fecal porcina, encontrando los colifagos somáticos en concentración de  $7.6 \times 10^7$  UFP/100 mL; este reporte coincide con lo hallado en el presente estudio, ya que el promedio de los recuentos de las dos plantas de beneficio de porcino fue de  $9.9 \times 10^7$  UFP/100 mL. En el mismo estudio reportan la concentración de los fagos que infectan las cepas de *Bacteroides fragilis* RYC2056 en promedio de  $10^4$  UFP/100 mL en el 100% de 40 muestras de agua residual con contaminación porcina, lo que coincide con los resultados hallados en el presente estudio en el que se hallaron fagos RYC2056 en ocho de 10 (80%) muestras evaluadas, en un promedio de  $9.2 \times 10^4$  UFP/100 mL, coincidiendo también con Payán et al. (2005) quienes detectaron dichos fagos en muestras con contaminación porcina en el 100% de las muestras, en un promedio de  $8.1 \times 10^4$  UFP/100 mL en 3 muestras en Reino Unido y en  $2.3 \times 10^4$  UFP/100 mL en 5 muestras en Chipre, dentro del estudio se encontró que en España el promedio fue de  $1.2 \times 10^5$  UFP/100 mL en nueve muestras, es decir una unidad por encima del presente estudio.

La diferencia en la concentración de los indicadores bacterianos y virales no discriminantes evidenciada en la comparación con estudios realizados en otros países, puede deberse al tipo de muestra evaluada, ya que esta puede ser agua con contaminación fecal proveniente del lavado de los intestinos de los animales sacrificados o agua del lavado de todo el sitio de sacrificio, que es una mezcla de residuos que incluye restos de sangre, piel, pelo y huesos, que va a la planta de tratamiento de aguas residuales.

En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, se encontraron en seis de las 10 muestras evaluadas (60%) en un rango entre  $<3.3 \times 10^1$  (inferior al límite de cuantificación de la técnica) y  $1.2 \times 10^6$  UFP/100 mL, en un promedio de  $1.4 \times 10^5$  UFP/100 mL. En la literatura se encuentran reportes de recuentos de fagos GA17 en aguas con contaminación de origen animal en diferentes países en los que se ha evaluado la cepa. En el trabajo de Payán et al. (2005) estos fagos se encontraron en España en el 50% de 9 muestras de agua con contaminación porcina en un promedio de  $2.5 \times 10^2$  UFP/100 mL, mientras que en Reino Unido y Chipre no se hallaron en tres y cinco muestras, respectivamente. Gómez-Doñate et al. (2011) reportan recuentos en un rango entre  $2.0 \times 10^1$  y  $2.0 \times 10^3$  UFP/100 mL en cuatro muestras de 125 evaluadas (3.2%) (Jebri et al. 2017) y en un estudio realizado en países de la Unión Europea (Francia, España, Suiza y Reino Unido) se detectaron en agua residual de plantas de beneficio animal y en muestras de estiércol líquido de ganado bovino, porcino, aviar y en mezclas de estos, con recuentos en un rango entre  $<5.0 \times 10^1$  y  $1.0 \times 10^3$ , en un promedio de  $5.5 \times 10^1$  UFP/100 mL en cinco de 71 muestras (7%) (Blanch et al. 2006). En otro estudio llevado a cabo en Túnez en agua residual de plantas de beneficio, el recuento se encontró en un rango entre  $<1$  y  $1.0 \times 10^3$  UFP/100 mL (Yahya et al. 2015).

Si bien se observa que los recuentos de los fagos que infectan la cepa *B. thetaiotaomicron* GA17 son bajos en la mayoría de estos reportes y que la cepa presenta especificidad como indicadora de contaminación humana, en el presente estudio se hallaron concentraciones altas en las dos plantas de beneficio de porcinos, por lo que no se puede descartar este tipo de contaminación en las muestras evaluadas. Dichos resultados se pueden deber a la presencia de una fuente de contaminación fecal humana por parte de los empleados de la planta de beneficio o debido a una mezcla de contaminación humana y animal en el sitio de muestreo, ya que en una de las plantas de beneficio no permitieron el ingreso para la toma de las muestras directamente y en la otra planta las cajas recolectoras de las aguas residuales provenientes del lavado de las áreas de sacrificio y los conductos que la transportan, no se encuentran totalmente separados, por lo que puede haber conexiones erradas con las aguas domésticas de los baños de los empleados que llegan a un sitio cercano al lugar de donde se tomó la muestra.

Con respecto al cálculo de la diferencia entre las concentraciones de CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ), se obtuvieron valores en un promedio de 0.3 en el Frigorífico de Zipaquirá y de 3.4 en BLE, confirmando la presencia de contaminación fecal animal en las muestras de agua residual evaluadas, por ser valores alejados de 2 unidades que indican contaminación humana y cercanos a 4 unidades que corresponden a contaminación animal, según los parámetros establecidos por Muniesa et al. (2012).

En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 de origen fecal porcino, se presentaron recuentos en la totalidad de las muestras de las dos plantas de beneficio de ganado porcino, en un promedio de  $5.0 \times 10^2$  UFP/100 mL. En el estudio de Gómez-Doñate et al. (2011), las cepas de *Bacteroides fragilis* PG76 y *Bacteroides fragilis* PG1226 de origen

fecal porcino, se evaluaron en 40 muestras de agua residual de plantas de beneficio de porcinos, presentando recuentos de  $10^5$  UFP/100 mL en la totalidad de las muestras evaluadas. Si bien los recuentos obtenidos con la cepa *B. fragilis* PZ8 en el presente estudio son inferiores a los reportados con las cepas PG76 y PG1226 del mismo origen fecal, se infiere que la cepa es potencialmente útil para discriminar la contaminación de origen fecal porcino, debido a la especificidad que mostró recuperando bacteriófagos provenientes de agua residual con contaminación fecal porcina y no de otros orígenes fecales como el agua con contaminación bovina.

En el caso de los marcadores moleculares, los resultados del marcador CF128F en el Frigorífico BLE coinciden con lo reportado en el estudio de Ballesté et al. (2010) en el que se no detectó el marcador en aguas con contaminación porcina, lo que indicaría su especificidad para indicar la presencia de contaminación fecal bovina, sin embargo, estudios como el de Fremaux et al. (2009) muestran que el marcador CF128F se detectó en 11 de 50 muestras con contaminación porcina, como ocurrió en el presente estudio en la totalidad de las muestras del Frigorífico de Zipaquirá. Estos resultados se pueden deber a que en esta planta de beneficio los conductos y cajas recolectoras del agua residual del sacrificio de ganado bovino y porcino y del lavado de las diferentes áreas del frigorífico, no se encuentran totalmente separados, lo que indica una mezcla de residuos y de contaminación fecal proveniente de ambos tipos de ganado en el agua de la cual se tomó la muestra.

Bonjoch et al. (2004), no detectaron los marcadores moleculares de contaminación fecal humana ADO y DEN en dos muestras de agua residual con contaminación fecal porcina evaluadas, estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio, excepto por la detección del marcador ADO en una de las cinco muestras del frigorífico BLE, lo que confirmaría que la muestra evaluada presentaba una mezcla de contaminación fecal animal y humana, ya que se reporta una alta especificidad para dicho marcador, sin embargo, en estudios como el de Ballesté et al. (2010) reportan la detección de los marcadores HF183F, ADO y DEN en aguas con contaminación fecal porcina, es por esto que se deben relacionar los resultados de los marcadores moleculares con los cultivables para poder definir el origen fecal de la contaminación.

#### **4.4. Evaluación de marcadores no discriminantes y discriminantes de contaminación fecal en aguas de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas**

Los resultados de los marcadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Guasca se observan en la Tabla 12. Los coliformes totales se encuentran en un promedio de  $10^6$  UFC/100 mL y *E. coli* en  $10^5$  UFC/100 mL, en cuanto a indicadores virales los colifagos



somáticos en  $10^5$  UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en  $10^4$  UFP/100 mL.

Con respecto a los indicadores discriminantes, los fagos que infectan la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraron en las seis muestras evaluadas en un promedio de  $10^4$  UFP/100 mL. En este tipo de muestras la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) arrojó valores en su mayoría cercanos a dos unidades, confirmando el origen fecal humano de este tipo de agua residual. Con la cepa *Bacteroides fragilis* PZ8 las concentraciones se encontraron por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) en la totalidad de las muestras.

Los tres marcadores moleculares de contaminación fecal humana, HF183F, ADO y DEN se detectaron en la totalidad de las muestras y el marcador de contaminación fecal bovina CF128F no se detectó en ninguna muestra.

**Tabla 12. Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Guasca**

INDICADORES NO DISCRIMINANTES							
n = 6	7 de julio	11 de julio	13 de julio	18 de julio	19 de julio	25 de julio	PROMEDIO
<b>Coliformes Totales (UFC/100 mL)</b>	$1.1 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$2.5 \times 10^6$
<b><i>E. coli</i> (UFC/100 mL)</b>	$2.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$5.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$4.5 \times 10^5$	$3.3 \times 10^5$
<b>Colifagos Somáticos (UFP/100 mL)</b>	$4.0 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$6.0 \times 10^5$	$6.2 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (UFP/100 mL)</b>	$2.2 \times 10^4$	$8.6 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$
INDICADORES DISCRIMINANTES							
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	$1.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3$	$1.9 \times 10^4$
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	N.A.

Tabla 12. (Continuación)

n = 6	7 de julio	11 de julio	13 de julio	18 de julio	19 de julio	25 de julio	PROMEDIO
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>)</b>	1.5	1.6	1.7	0.5	1.7	2.3	N.A.
<b>ADO</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>DEN</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>HF183F</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>CF128F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.

N.A.: No aplica.

Los resultados de los marcadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas El Salitre de la ciudad de Bogotá se muestran en la Tabla 13. Los coliformes totales se encuentran en un promedio de  $10^6$  UFC/100 mL y *E. coli* en  $10^5$  UFC/100 mL, en cuanto a indicadores virales los colifagos somáticos se encuentran en un promedio de  $10^5$  UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en  $10^4$  UFP/100 mL.

Los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se hallaron en todas las muestras evaluadas en un promedio de  $10^4$  UFP/100 mL. De la misma forma que en la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas de Guasca, en este tipo de muestras la diferencia entre CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>) arrojó un valor de cercano a dos unidades, confirmando el origen de este tipo de agua residual. En el caso de la cepa *Bacteroides fragilis* PZ8, las concentraciones se encontraron por debajo de  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) en la totalidad de las muestras.

El marcador molecular de contaminación fecal humana HF183F se detectó en la totalidad de las muestras de esta planta de tratamiento, el marcador ADO en cinco de las seis muestras evaluadas y DEN en cuatro muestras, finalmente el marcador de contaminación fecal bovina CF128F, no se detectó en ninguna muestra.

**Tabla 13. Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas El Salitre de la ciudad de Bogotá**

INDICADORES NO DISCRIMINANTES							
n = 6	7 de julio	11 de julio	13 de julio	18 de julio	19 de julio	25 de julio	PROMEDIO
<b>Coliformes Totales (UFC/100 mL)</b>	9.0x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>	3.3x10 <sup>6</sup>	2.2x10 <sup>6</sup>	3.2x10 <sup>6</sup>	2.1x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>
<b><i>E. coli</i> (UFC/100 mL)</b>	7.0x10 <sup>5</sup>	3.0x10 <sup>5</sup>	1.3x10 <sup>6</sup>	1.3x10 <sup>5</sup>	4.5x10 <sup>5</sup>	1.3x10 <sup>5</sup>	5.0x10 <sup>5</sup>
<b>Colifagos Somáticos (UFP/100 mL)</b>	3.0x10 <sup>5</sup>	9.0x10 <sup>5</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	5.0x10 <sup>5</sup>	9.0x10 <sup>5</sup>	5.5x10 <sup>5</sup>	5.4x10 <sup>5</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (UFP/100 mL)</b>	2.0x10 <sup>4</sup>	1.3x10 <sup>4</sup>	3.0x10 <sup>3</sup>	9.0x10 <sup>3</sup>	1.7x10 <sup>4</sup>	6.0x10 <sup>3</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>
INDICADORES DISCRIMINANTES							
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	1.0x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>	4.0x10 <sup>3</sup>	1.6x10 <sup>4</sup>	2.3x10 <sup>4</sup>	8.0x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>2</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	<1.0x10 <sup>3</sup>	N.A.
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>)</b>	1.5	1.9	1.4	1.5	1.6	1.8	N.A.
<b>ADO</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>DEN</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	N.A.
<b>HF183F</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>CF128F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.

N.A.: No aplica.

Los resultados de los marcadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Cajicá se observan en la Tabla 14. Los coliformes totales se encuentran en un promedio de 10<sup>6</sup> UFC/100 mL y *E. coli* en 10<sup>5</sup> UFC/100 mL, en cuanto a indicadores virales los colifagos somáticos se encuentran en un promedio de 10<sup>6</sup> UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en 10<sup>4</sup> UFP/100 mL.

Con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se obtuvo un promedio de  $10^4$  UFP/100 mL. De la misma forma que en la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas de Guasca y El Salitre de Bogotá, en este tipo de muestras la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) arrojó un valor de cercano a dos unidades, confirmando el origen fecal humano de este tipo de agua residual. La cepa *Bacteroides fragilis* PZ8, presentó concentraciones por debajo de  $<1.0 \times 10^3$  UFP/100 mL (límite de cuantificación de la técnica) en la totalidad de las muestras.

Los marcadores moleculares HF183F, ADO y DEN se detectaron en todas las muestras evaluadas de esta planta de tratamiento y no se detectó en ningún caso el marcador de contaminación fecal bovina CF128F.

**Tabla 14. Resultados de la evaluación de los indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en el afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales domésticas del municipio de Cajicá**

INDICADORES NO DISCRIMINANTES							
n = 6	28 de julio	28 de julio	1 de agosto	1 de agosto	3 de agosto	3 de agosto	PROMEDIO
<b>Coliformes Totales (UFC/100 mL)</b>	$6.5 \times 10^6$	$5.0 \times 10^6$	$6.6 \times 10^6$	$3.2 \times 10^6$	$2.4 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$
<b><i>E. coli</i> (UFC/100 mL)</b>	$1.3 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$
<b>Colifagos Somáticos (UFP/100 mL)</b>	$9.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$	$6.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^6$	$1.0 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> RYC2056 (UFP/100 mL)</b>	$2.2 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$	$9.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^4$
INDICADORES DISCRIMINANTES							
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	$2.8 \times 10^4$	$8.0 \times 10^3$	$5.1 \times 10^4$	$5.4 \times 10^4$	$3.2 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$3.7 \times 10^4$
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	$<1.0 \times 10^3$	N.A.
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades <math>\log_{10}</math>)</b>	1.5	2.3	1.1	1.5	1.5	1.5	N.A.

**Tabla 14. (Continuación)**

<b>n = 6</b>	<b>28 de julio</b>	<b>28 de julio</b>	<b>1 de agosto</b>	<b>1 de agosto</b>	<b>3 de agosto</b>	<b>3 de agosto</b>	<b>PROMEDIO</b>
<b>ADO</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>DEN</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>HF183F</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N.A.
<b>CF128F</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	N.A.

N.A.: No aplica.

Se observó que en las tres plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas evaluadas, los resultados de los indicadores bacterianos, virales y los indicadores discriminantes fueron similares, debido al tipo de contaminación que presentan. Los recuentos de coliformes totales y *E. coli* de cada una de las PTARD y el promedio hallado de las tres PTARD fue de  $10^6$  y  $10^5$  UFC/100 mL, respectivamente, estos promedios coinciden con lo reportado por Kim et al. (2005) quienes evaluaron los mismos indicadores en 55 muestras de agua mezclada del alcantarillado que se vertían en el río Geum en Korea, lo que indica que las concentraciones de los indicadores bacterianos en este tipo de aguas municipales sin tratar, son similares en otras zonas geográficas con diferentes condiciones a las del área de la cuenca del río Bogotá.

Los resultados de los coliformes totales en agua residual doméstica obtenidos en el presente estudio se encuentran 3 unidades por debajo de lo hallado por Savichtcheva et al. (2007) en el mismo tipo de agua, quienes reportaron una concentración de  $2.4 \times 10^9$  UFC/100 mL, indicando que este alto valor se debe a que el tipo de agua evaluada no tiene ningún tipo de tratamiento.

Los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Venegas et al. (2015) en la misma área geográfica. En dicho estudio se analizaron 5 muestras de agua residual doméstica, obteniendo recuentos de *E. coli* y de colifagos somáticos en promedio de  $10^6$  UFC - UFP/100 mL, respectivamente, una unidad por encima del promedio de las tres PTARD evaluadas en el presente estudio, que fue de  $3.5 \times 10^5$  UFC/100 mL para *E. coli* y de  $7.5 \times 10^5$  UFP/100 mL para colifagos somáticos y los fagos que infectan la cepa *Bacteroides fragilis* RYC2056 fueron reportados en promedio de  $10^4$  UFP/100 mL, coincidiendo con el promedio de este estudio, de  $1.4 \times 10^4$  UFP/100 mL.

Los recuentos de colifagos somáticos hallados en el presente estudio, coinciden con lo reportado por Zhang & Farahbakhsh (2007) en el que evaluaron coliformes totales y colifagos somáticos en agua residual doméstica sin tratar en un período de 24 horas, encontrando una concentración de colifagos somáticos de  $10^5$  UFP/100 mL y coliformes

totales en  $10^7$  UFP/100 mL, estos últimos se encuentran una unidad por encima del promedio hallado en este trabajo; en el estudio mencionan que la concentración de dichos indicadores puede variar según la hora en la que se tome la muestra debido a las descargas de agua residual doméstica realizadas por la población, lo que puede indicar la diferencia de unidades.

Los resultados de los colifagos somáticos en las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas son comparables con el estudio realizado por Gómez-Doñate et al. (2011) en el que se halló que estos indicadores virales se encontraban en un rango entre  $10^4$  y  $10^7$  UFP/100 mL, según los autores, estos valores pueden variar dependiendo del tipo de tratamiento que se realice a las aguas residuales domésticas, sin embargo, en este caso se tomaron las muestras del afluente para así evitar este tipo de variaciones.

El promedio del recuento de colifagos somáticos de las tres plantas de tratamiento de agua residual doméstica fue de  $7.5 \times 10^5$  UFP/100 mL, coincidiendo con los valores reportados para este tipo de agua, por Lucena et al. (2003) en Argentina y Colombia, por Lodder & de Roda Husman (2005) en Holanda y Zhang & Farahbakhsh (2007) en Canadá.

Gómez-Doñate et al. (2011) encontraron los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 en 70 (100%) muestras de agua residual con contaminación fecal humana, en concentración de  $10^4$  UFP/100 mL, lo que coincide con los recuentos obtenidos en el presente estudio en el que se obtuvieron resultados en la totalidad de las muestras en un promedio de  $1.4 \times 10^4$  UFP/100 mL.

El promedio de los recuentos de los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 en agua sin tratar de las tres PTARD coincide con los promedios reportados en agua residual con contaminación humana por Payán et al. (2005) en un estudio realizado en algunos países de la Unión Europea, en los que encontraron los fagos en promedios de  $4.3 \times 10^4$  UFP/100 mL en España,  $2.6 \times 10^4$  UFP/100 mL en Francia,  $1.1 \times 10^4$  UFP/100 mL en Reino Unido y  $3.3 \times 10^4$  UFP/100 mL en Chipre, con el único país que no coincidieron los resultados fue con Suecia en el que hallaron los fagos en el 90% de 10 muestras en un promedio de  $2.2 \times 10^3$  UFP/100 mL. Estos resultados indican que la cepa RYC2056 recupera fagos provenientes de muestras de agua de lugares con condiciones geográficas diferentes, lo que confirma su capacidad para ser utilizado como indicador de la presencia de fagos de origen fecal humano o animal.

Los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraron en aguas residuales exclusivas de origen doméstico en la totalidad de las muestras evaluadas, en un rango entre  $3.0 \times 10^3$  y  $6.3 \times 10^4$  UFP/100 mL en promedio de  $2.3 \times 10^4$  UFP/100 mL, estos resultados son comparables con los obtenidos en el estudio de Gómez-Doñate et al. (2011) que reporta recuentos en 70 muestras (100%) en un promedio de  $10^5$  UFP/100 mL, una unidad por encima de lo hallado en el presente estudio. Los resultados de los fagos GA17 coinciden con el reporte de Venegas et al. (2015) en PTARD de la misma zona, en un promedio de  $10^4$  UFP/100 mL, mostrando la especificidad de la cepa como indicador de la

presencia de contaminación fecal humana en el área de la cuenca del río Bogotá, ya que el recuento de fagos obtenido en agua con contaminación fecal animal fue muy bajo, como se observó en las muestras de agua de las plantas de beneficio de bovinos y porcinos, en comparación a los recuentos hallados en agua residual doméstica. Estos datos confirman la utilidad de la cepa en una zona geográfica con condiciones diferentes a las ya evaluadas en otros países, como se observa en los promedios de los recuentos de los fagos GA17 hallados en la Unión Europea: en España  $5.9 \times 10^4$  UFP/100 mL (100% de 22 muestras), en Francia  $2.4 \times 10^4$  UFP/100 mL (100% de 14 muestras), Suecia  $3.6 \times 10^3$  UFP/100 mL (80% de las muestras), Reino Unido  $2.9 \times 10^3$  UFP/100 mL (100% de 10 muestras) y Chipre  $1.2 \times 10^4$  UFP/100 mL (100% de 10 muestras), reportados por Blanch et al. (2004), Payán et al. (2005), Payán (2006) y Blanch et al. (2006), por Gómez-Doñate et al. (2011) y Muniesa et al. (2012) en España y Yahya et al. (2015) en Túnez (Jofre et al. 2014 y Jebri et al. 2017) quienes un rango entre  $10^4$  y  $10^5$  UFP/100 mL en muestras de agua con contaminación fecal humana provenientes de PTARD, hospitales e instituciones militares, coincidiendo con el promedio calculado en el presente estudio; lo que indica el potencial de dicha cepa para realizar el seguimiento a la fuente de contaminación humana y para diferenciar el origen de la contaminación fecal a nivel mundial.

El valor promedio de la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) calculado con los recuentos de dichos fagos de las muestras de agua residual domésticas de las tres PTARD fue de 1.6, este valor representa la presencia de contaminación fecal de origen humano de acuerdo al trabajo de Muniesa et al. (2012) y es similar al reportado por Venegas et al. (2015), de 1.2 unidades, calculado con los recuentos de fagos de cinco muestras de origen doméstico.

En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, no se presentaron recuentos en ninguna de las muestras evaluadas de las tres PTARD, lo que confirma el potencial de la cepa para discriminar la contaminación fecal de su mismo origen (porcino) debido a que no se presentó infección con fagos de origen fecal humano provenientes del agua residual doméstica.

Los resultados obtenidos con los marcadores moleculares en agua residual doméstica son comparables con lo hallado en el estudio de Bernhard & Field. (2000a) quienes reportan que el marcador HF183F se detectó en 11 de 13 muestras (84,6%) y el marcador CF128F no se detectó en ninguna muestra, en el presente estudio el marcador HF183F se detectó en la totalidad de las muestras y el CF128F en ninguna de las muestras. Estos resultados también coinciden con lo hallado en el trabajo de Fremaux et al. (2009), en el que inicialmente detectaron el marcador HF183F en 51 de 54 muestras (94,4%) de origen fecal humano y en 8 de 8 (100%) muestras de agua residual no tratada, sin detectar el marcador de contaminación bovina CF128F en las mismas muestras.

Comparando los resultados conseguidos en la detección de los marcadores moleculares en el presente estudio, HF183F (en el 100% de las muestras) y DEN en 16 de 18 muestras (88,9%), se observa que estos se detectaron en mayor proporción que lo reportado en el

trabajo de Ballesté et al. (2010) en el que detectaron el marcador HF183F en 20 de 40 muestras (50%) con contaminación humana y el marcador DEN en 29 de 45 (64,4%) muestras; con respecto al marcador ADO, se detectó en 17 de 18 muestras (94,4%) en menor proporción que en el estudio citado en donde se reportó en 43 de 45 muestras (95,6%) y finalmente el marcador CF128 no se detectó en 40 muestras de origen humano, coincidiendo con el presente estudio. Los resultados obtenidos son semejantes a los reportados por Bonjoch et al. (2004), el marcador ADO fue detectado en 12 (100%) muestras y el marcador DEN en 11 (91,7%), para ambos marcadores el porcentaje de detección fue menor en el presente estudio; así mismo los resultados fueron similares a los obtenidos por Venegas et al. (2015) en este mismo tipo de muestras, en las que detectaron los marcadores de contaminación humana HF183F y ADO en la totalidad de las muestras, divergiendo con el presente estudio en la detección del marcador ADO que se detectó en el 94,4% de las muestras, mientras que el marcador HF183F sí se detectó en todas las muestras evaluadas; en el caso del marcador DEN, la detección fue mayor en el presente estudio, en el 88,9% de las muestras mientras que en el trabajo de Venegas et al. (2015) se detectó en el 40% de las muestras; el marcador de contaminación bovina CF128F no se detectó en ninguna muestra coincidiendo con el presente estudio y confirmando la especificidad de dicho marcador para detectar la contaminación de origen fecal bovino al ser evaluado en muestras de agua con contaminación humana.

Como se puede observar en la comparación realizada con estudios similares, las diferencias en la detección de marcadores moleculares son más evidentes entre los marcadores ADO y DEN y son menores con los marcadores HF183F y CF128F, estas se deben a las diferencias en la concentración de las especies de *Bifidobacterium adolescentis* (ADO) y *Bifidobacterium dentium* (DEN) en la microbiota intestinal humana entre diferentes países, esta se ve afectada por hábitos alimenticios y condiciones genéticas y de salud, lo que puede variar entre distintas regiones geográficas y como se puede observar, los estudios mencionados fueron realizados en países con diferentes condiciones a las nuestras (Volker 2004). Con respecto a las diferencias entre los resultados de los marcadores moleculares HF183F y CF128F, estas se deben a que dichos marcadores codifican el 16SrRNA, que es una región que se encuentran altamente conservada en los *Bacteroidetes*, lo que explicaría las mínimas diferencias halladas entre los diferentes estudios analizados, teniendo en cuenta que este género bacteriano se encuentra en la microbiota intestinal de gran parte de la población mundial (Volker 2004, Zoetendal et al. 2004, Dethlefsen et al. 2006, Hattori & Taylor 2009). Estos resultados confirman la alta especificidad que tienen estos dos marcadores para diferenciar el origen de la contaminación fecal humana y animal.

Los resultados de la evaluación de marcadores microbiológicos no discriminantes y discriminantes en aguas con contaminación fecal animal y humana se han presentado en forma de tabla, en el caso de los resultados de la evaluación de los marcadores en el río Bogotá, se pasó a utilizar gráficas para facilitar el análisis.



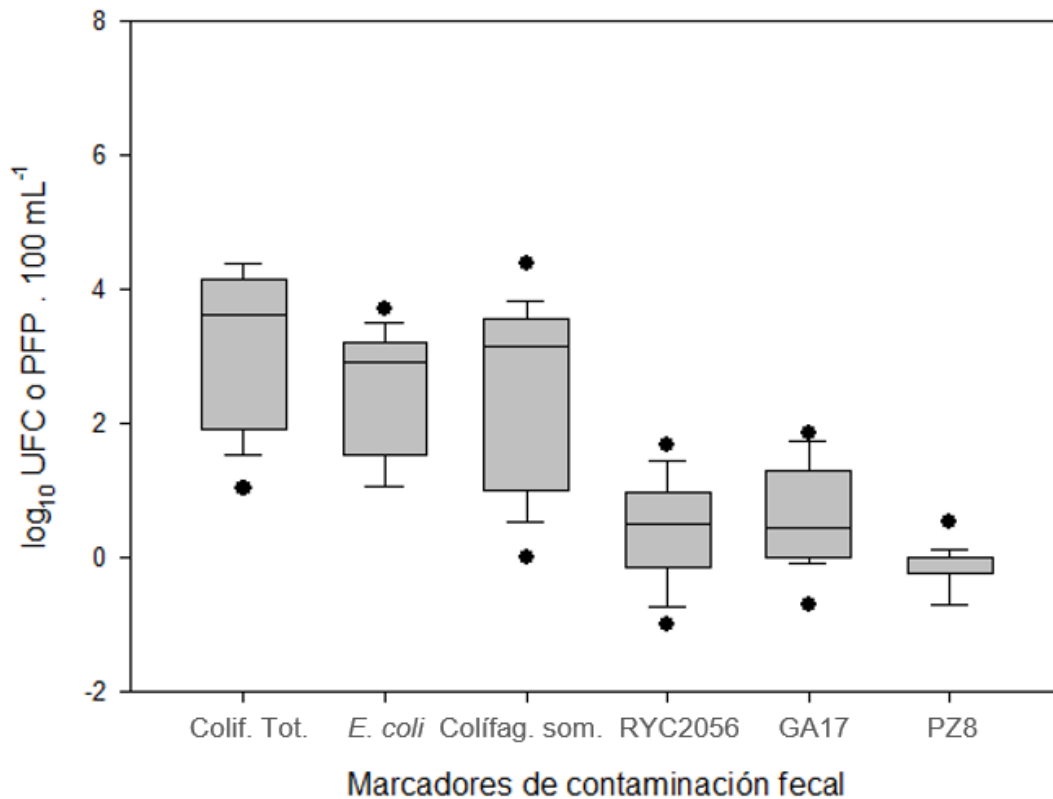
#### 4.5. Indicadores de contaminación fecal en aguas del río Bogotá

##### 4.5.1. Evaluación de los indicadores de contaminación fecal cultivables no discriminantes y discriminantes en el río Bogotá

Los resultados de la evaluación de los indicadores cultivables no discriminantes y discriminantes en aguas de la cuenca alta del río Bogotá se muestran en la Figura 10. Los indicadores bacterianos, coliformes totales, se encontraron en un rango entre  $10^1$  y  $10^4$  UFC/100 mL y *E. coli* en un rango entre  $10^1$  y  $10^3$  UFC/100 mL. Los indicadores virales, los colifagos somáticos se encontraron en un rango entre  $<1.0 \times 10^2$  UFP/100 mL (menor al límite de cuantificación de la técnica) y  $10^4$  UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en un rango entre  $<1/L$  (menor al límite de cuantificación de la técnica) y  $10^1$  UFP/100 mL.

En cuanto a los indicadores que discriminan la fuente de contaminación, los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, que discrimina la contaminación fecal de origen humano, se hallaron en 14 de 18 (77,8%) muestras evaluadas de la cuenca alta, en un rango entre  $<1$  y  $10^1$  UFP/100 mL y los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 se detectaron en 7 de 18 (38,9%) muestras, en un rango entre  $<1$  y 1 UFP/100 mL. Estos rangos de concentraciones se debieron a la diferencia del nivel de contaminación en las estaciones de muestreo de la cuenca alta, ya que la primera estación se encuentra cerca al nacimiento del río en donde la contaminación se encuentra en niveles muy bajos y en las siguientes se presenta una mayor contaminación. Para evaluar cada una de las cepas de *Bacteroides* spp. con las muestras de la cuenca alta se concentró un litro de muestra, sin embargo, se reportan resultados por debajo de límite de cuantificación de la técnica en esta zona del río Bogotá.

Con respecto a los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, se infiere que dicha cepa tiene potencial como discriminante de la contaminación fecal de origen porcino en muestras con baja contaminación, como las provenientes de la cuenca alta que es la zona menos contaminada del río Bogotá; sin embargo, en dicha región se evidenció la presencia de granjas porcícolas y plantas de beneficio de este tipo de ganado, los cuales vierten aguas residuales tratadas y sin tratar en esta zona del río, lo que explica la detección de fagos que infectan la cepa de *B. fragilis* PZ8.



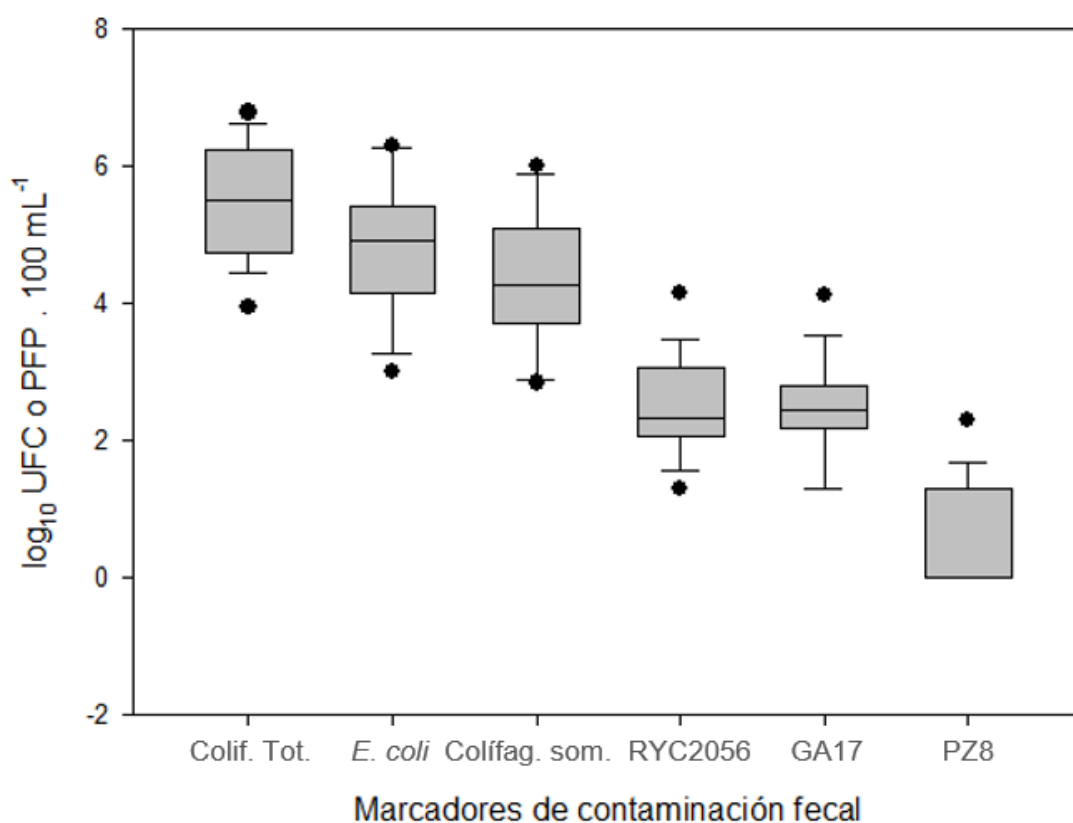
**Figura 10. Indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en la cuenca alta del río Bogotá**

Los resultados de la evaluación de los indicadores cultivables no discriminantes y discriminantes en aguas de la cuenca media del río Bogotá se muestran en la Figura 11. En esta cuenca, los indicadores bacterianos, coliformes totales y *E. coli* se encuentran en un rango entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/100 mL; en cuanto a los indicadores virales, los colifagos somáticos se encuentran en un rango entre  $10^2$  y  $10^6$  UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en un rango entre  $10^1$  y  $10^4$  UFP/100 mL.

En esta cuenca se evidenció un aumento del nivel de contaminación debido a la entrada del río a la ciudad de Bogotá, en donde recibe aguas residuales domésticas tratadas, provenientes de la PTARD El Salitre y aguas no tratadas de la zona norte de la ciudad. Los recuentos más altos de los indicadores de contaminación fecal se obtuvieron en la estación de muestreo El Cortijo ubicada en la zona noroccidental de la ciudad de Bogotá.

Los fagos que infectan la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraron en la cuenca media en las 18 muestras evaluadas (100%), en un rango entre  $10^1$  y  $10^4$  UFP/100 mL, y los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 en 7 de 18 (38,9%) muestras, en un rango entre  $<10^1$  y  $10^2$  UFP/100 mL, lo que indica el potencial de la cepa PZ8 para

recuperar fagos de origen fecal porcino y su posible utilidad para determinar la mayor fuente de contaminación en una zona con contaminación mixta como es la cuenca media del río Bogotá. Estos resultados indican que en esta área del río predomina la contaminación fecal humana debido al volumen de aguas residuales domésticas realizados en la ciudad de Bogotá y en los municipios de las provincias de Sabana Centro y Sabana Norte del Departamento de Cundinamarca. Se debe tener en cuenta que los vertimientos de las plantas de beneficio de bovinos y porcinos que se encuentran ubicadas en la ciudad de Bogotá, son importantes en términos de volumen ya que sacrifican una gran cantidad de animales generando alta contaminación, lo que hace que esta contaminación sea significativa en la cuenca media del río Bogotá, sin embargo, en comparación con el volumen de contaminación humana es menor pero no despreciable.

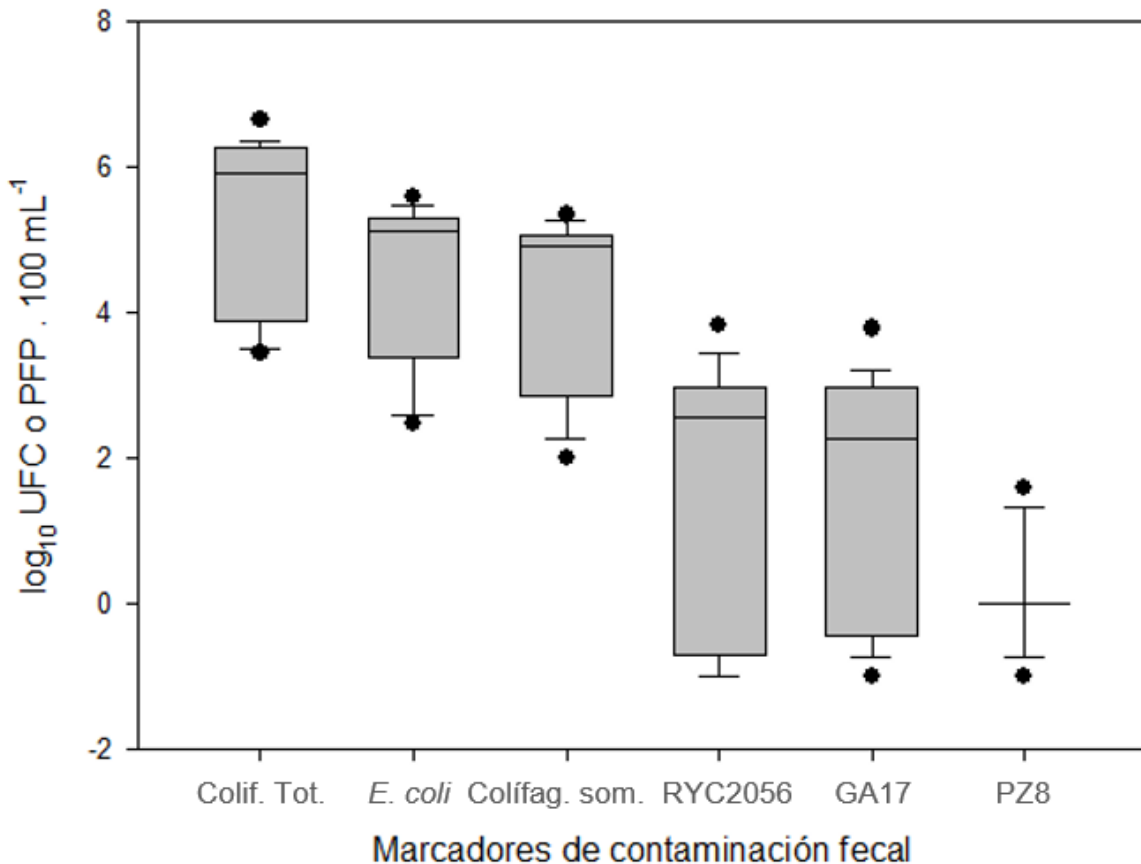


**Figura 11. Indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en la cuenca media del río Bogotá**

Los resultados de la evaluación de los indicadores cultivables no discriminantes y discriminantes en aguas de la cuenca baja del río Bogotá se muestran en la Figura 12. En esta cuenca, los coliformes totales se encuentran en un rango entre  $10^3$  y  $10^6$  UFC/100 mL y *E. coli* en un rango entre  $10^2$  y  $10^5$  UFC/100 mL, el amplio rango de la concentración de

estos indicadores se debe a la diferencia del nivel de contaminación en las estaciones de muestreo de esta cuenca, la estación de muestreo Quebrada Santa Marta, tiene niveles de contaminación muy bajos debido que no recibe aguas del río Bogotá, es un afluente de este; de igual forma ocurre con los indicadores virales, los colifagos somáticos se encuentran en un rango entre  $10^2$  y  $10^5$  UFP/100 mL y los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* cepa RYC2056 en un rango entre 1 y  $10^3$  UFP/100 mL.

En cuanto a los indicadores que discriminan la fuente de contaminación, los fagos que infectan la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se encontraron en 17 de 18 (94,4%) muestras evaluadas en la cuenca baja, en un rango entre  $<10^1$  y  $10^3$  UFP/100 mL. Los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 se hallaron en 5 de las 18 (27,8%) muestras, en un rango entre  $<10^1$  y  $10^1$  UFP/100 mL. Estos resultados confirman el potencial de los indicadores discriminantes para diferenciar el origen de la contaminación fecal presente en esta área del río Bogotá que cuenta con una alta contaminación de origen humano y baja contaminación de origen porcino, corroborando que la cepa PZ8 recupera fagos de origen porcino incluso en muestras con alta contaminación fecal humana.



**Figura 12. Indicadores de contaminación fecal no discriminantes y discriminantes en la cuenca baja del río Bogotá**

Los indicadores bacterianos, coliformes totales, se encontraron en el río Bogotá en un promedio de las tres cuencas de  $7.2 \times 10^5$  UFC/100 mL; estos resultados coinciden con lo hallado por Savichtcheva et al. (2007), en un estudio en el que evaluaron cuatro ríos ubicados alrededor de la ciudad de Sapporo, Japón, hallando una concentración de  $3.8 \times 10^5$  y  $5.2 \times 10^5$  UFC/100 mL en dos ríos y de  $4.0 \times 10^4$  y  $4.1 \times 10^4$  UFC/100 mL en los dos ríos restantes, indicado que estos valores están influenciados por las descargas de aguas residuales domésticas que se evidenciaron a lo largo del río y que presentaron valores de coliformes totales de  $10^9$  UFC/100 mL, valores típicos para este tipo de agua; de igual forma los resultados son similares a lo hallado por Claydong et al. (2001) en el que reportan una concentración de coliformes totales entre  $10^4$  y  $10^5$  UFC/100 mL. En los dos estudios mencionados indican que estos valores se vieron influenciados por las aguas residuales provenientes de granjas de ganado bovino y porcino y de PTARD cercanas a las estaciones de muestreo, también debido al flujo de aguas urbanas y agrícolas dentro de algunos de los ríos evaluados, como sucede en el caso del río Bogotá que recibe descargas con las mismas características.

Los resultados de coliformes totales obtenidos en el río Bogotá son comparables con lo reportado en el estudio de Benka-Coker & Ojior (1995) en el río Ikpoba en Nigeria, en el que evaluaron muestras de agua de cinco estaciones de muestreo sobre este río que continuamente recibe descargas de agua residual sin tratar de plantas de beneficio, obtuvieron una concentración de coliformes totales en un rango entre  $5.4 \times 10^4$  UFC/100 mL y  $9.2 \times 10^4$  UFC/100 mL antes del sitio de descarga de agua con contaminación fecal animal, en las muestras del punto posterior al vertimiento obtuvieron  $10^8$  UFC/100 mL y en los tres últimos puntos  $10^6$  UFC/100 mL, evidenciado que la concentración incrementaba conforme aumentaba la descarga de agua residual y disminuía después de 400 metros por el efecto de dilución, coincidiendo con el recuento de  $10^6$  UFC/100 mL obtenido en las estaciones de muestreo El Cortijo, El Salto e Hidroeléctrica La Guaca, que están ubicadas en el paso del río por la ciudad de Bogotá y después de esta, en donde recibe las descargas de las grandes plantas de beneficio de bovinos y porcinos ubicadas en la capital del país.

Los recuentos de *E. coli* en el río se encontraron en un rango entre  $10^1$  y  $10^6$  UFC/100 mL en todo el río, en la cuenca alta en un promedio de  $1.1 \times 10^3$  UFC/100 mL, en la cuenca media en  $3.4 \times 10^5$  UFC/100 mL y en la cuenca baja en  $1.3 \times 10^5$  UFC/100 mL, coincidiendo con los promedios reportados Venegas et al. (2015) en el que se evaluaron indicadores de contaminación fecal de tipo bacteriano y viral e indicadores que discriminan el origen de la contaminación en aguas del río Bogotá en las mismas estaciones de muestreo.

En el estudio de Benka-Coker & Ojior (1995) también evaluaron el efecto del agua residual de plantas de beneficio de bovinos en la concentración de coliformes totales y *E. coli* en el agua del río Ikpoba, encontrando que concentraciones de coliformes totales en un rango entre  $1.6 \times 10^8$  UFC/100 mL y  $2.4 \times 10^8$  UFC/100 mL incrementaron el recuento en el río en tres unidades, de  $6.0 \times 10^4$  UFC/100 mL a  $7.0 \times 10^7$  UFC/100 mL directamente en los puntos de

vertimiento, en una unidad aguas debajo de estos puntos, de  $9.2 \times 10^6$  UFC/100 mL a  $2.4 \times 10^7$  UFC/100 mL y en el caso de *E. coli* aumentó de  $5.4 \times 10^6$  UFC/100 mL a  $2.4 \times 10^7$  UFC/100 mL; este mismo efecto se observó en el río Bogotá desde la estación de muestreo Saucio hasta la hidroeléctrica La Guaca, debido a que a lo largo de las tres cuencas se vierten aguas con contaminación animal tratadas y sin tratar provenientes de las plantas de beneficio de los municipios que conforman la cuenca y de la ciudad de Bogotá. Los resultados también coinciden con lo reportado por Egborge & Benka-Coker (1986) en el río Warri de Nigeria, que recibe materia fecal de plantas de beneficio animal y aguas residuales sin tratar de fuentes humanas. Estos resultados y los obtenidos en el río Bogotá indican que la continua descarga de aguas residuales sin tratar provenientes de plantas de beneficio animal y de PTARD, afectan los cuerpos de agua debido al alto contenido de microorganismos y de materia orgánica disponible generando altos niveles de contaminación; de igual forma se observó que las concentraciones de los indicadores bacterianos fueron similares en los tres ríos comparados, que tienen en común la contaminación de origen fecal animal y humana pero se encuentran ubicados en diferentes regiones y países; así mismo los ríos mencionados sirven como fuente de agua para potabilización, por lo que los altos recuentos de coliformes y *E. coli* los convierten en un peligro para la salud de las comunidades ubicadas alrededor de dichos cuerpos de agua.

En la cuenca alta del río Bogotá, específicamente en la estación de muestreo Puente Florencia, el recuento de coliformes totales fue de  $10^3$  UFC/100 mL y de *E. coli* de  $10^1$  UFC/100 mL, este recuento es particular debido a que esta es la última estación de la cuenca alta que es la menos contaminada del río, sin embargo, en dicha estación aumentan los recuentos debido a que en la zona aleñada se intensifican las actividades agropecuarias e industriales. Estos resultados coinciden con lo hallado en el estudio de Kim et al. (2005) en el que reportan concentraciones de coliformes totales de  $10^3$  UFC/100 mL y de *E. coli* entre  $10^1$  y  $10^2$  UFC/100 mL en seis estaciones de muestreo ubicadas a lo largo del río Geum en Korea y en una microcuenca del mismo evaluadas en temporada de lluvias; en el estudio mencionan que la concentración de coliformes totales tiende a incrementar en las tres primeras estaciones de muestreo, pero decrece en las tres últimas, evidenciando el efecto de un punto específico de contaminación, así como el efecto del efluente de las PTARD de las poblaciones cercanas y de las actividades agrícolas que se desarrollan en la zona y que generan contaminación difusa que se ve reflejada en el río, tal y como se evidencia en la cuenca alta del río Bogotá, en el estudio también se evidenció que la contaminación es mayor en donde se desarrollan actividades agropecuarias y menor en donde se realizan actividades forestales. En las estaciones de muestreo Saucio y Puente Bavaria los resultados de coliformes totales y *E. coli* obtenidos fueron de  $10^4$  UFC/100 mL y  $10^3$  UFC/100, respectivamente, coincidiendo con lo hallado en el estudio citado en una microcuenca del río Geum evaluada en temporada seca y en un sector del río que recibe efluentes de PTARD, estos resultados se explican por el efecto del vertimiento de aguas residuales domésticas y aguas provenientes de actividades agrícolas y pecuarias que se llevan a cabo en dicho río, tal como sucede en el río Bogotá como ya se ha mencionado anteriormente.

El promedio de los recuentos de coliformes totales y *E. coli* de la estación de muestreo Puente La Virgen de la cuenca media del río Bogotá, de  $2.9 \times 10^5$  UFC/100 mL y  $7.7 \times 10^4$  UFC/100 mL, respectivamente, coinciden con lo reportado por Barros et al. (2007) en un estudio en el que evaluaron la contaminación microbiana en aguas de plantas de beneficio de porcinos obteniendo recuentos de coliformes totales y *E. coli* de  $10^7$  NMP/100 mL y en aguas abajo después del punto de vertido de estas aguas contaminadas reportaron una concentración de coliformes totales de  $10^5$  NMP/100 mL y de *E. coli* de  $10^4$  NMP/100 mL, en temporada seca y de lluvias, lo que confirma que la contaminación proveniente de las plantas de beneficio se ve reflejada en los recuentos aguas abajo, esto teniendo en cuenta que los recuentos de las muestras de agua de las plantas de beneficio de porcinos evaluadas en el presente estudio también coinciden con lo reportado por Barros et al. (2007). Es importante mencionar que en la estación de muestreo Puente La Virgen se observó el vertimiento directo de aguas domésticas sin tratar en el momento de la muestras, también se detectaron fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 que indica contaminación fecal porcina, en tres muestras en un recuento de  $10^1$  UFP/100 mL; la presencia de este tipo de contaminación se puede deber a que en este punto el río ya ha pasado por el municipio de Zipaquirá en donde se encuentra ubicado el Frigorífico que sacrifica bovinos y porcinos, por lo tanto parte de las aguas residuales y desechos generados son transportados por el río lo que explicaría la presencia de contaminantes fecales de origen porcino en esta zona aguas abajo.

Los promedios de los recuentos de coliformes totales y *E. coli* obtenidos en las cuencas media y baja, de  $10^6$  y  $10^5$  UFC/100 mL, respectivamente, coinciden con lo reportado por Kim et al. (2005) quienes reportaron los mismos valores en muestras de agua del río Geum en Korea, tomadas en temporada de lluvias en estaciones de muestreo en las que se presentaba una mezcla del agua del río con agua doméstica sin tratar proveniente del alcantarillado de la población de la cuenca, así mismo los promedios coinciden con lo reportado en época seca para la misma zona. Al revisar los promedios de estos indicadores bacterianos en cada una de las estaciones de muestreo, se observa que los valores reportados en el estudio coinciden con los obtenidos específicamente en las estaciones El Cortijo, El Salto y La Guaca, que se caracterizan por presentar los recuentos más altos en todo el río Bogotá, siendo estas las estaciones más contaminadas debido a que se encuentran ubicadas sobre el área del río que recibe el agua residual doméstica de los habitantes de la ciudad de Bogotá, confirmando que este tipo de agua es la que causa mayor contaminación e impacto negativo sobre el río.

El promedio de los recuentos de coliformes totales y el de *E. coli* en el río Bogotá fue de  $10^5$  UFC/100 mL, una unidad menor en comparación con el estudio de Lucena et al. (1996) en el Río Besós en España en el que el promedio de coliformes totales fue de  $10^6$  UFC/100 mL y con el trabajo de Crowther et al. (2002) en el que evaluaron ríos y corrientes que recibían un flujo alto y bajo de descargas de agua residual doméstica en Reino Unido, encontrando un promedio de coliformes totales de  $2.6 \times 10^6$  UFC/100 mL y de *E. coli* de  $1.8 \times 10^6$  UFC/100

mL, en dicho estudio también evidenciaron el efecto de la cercanía de los puntos de vertido de aguas domésticas en ríos, puesto que la concentración de *E. coli* aumentó de  $1.0 \times 10^4$  UFC/100 mL a  $1.0 \times 10^6$  UFC/100 mL de acuerdo a la proximidad de estos; este incremento en los recuentos se evidenció en el río Bogotá en dos y tres unidades desde la segunda estación de muestreo ubicada después del nacimiento del río, ya que desde la estación Saucio en el municipio de Villapinzón inician los vertimientos de aguas domésticas. Estos recuentos varían de acuerdo al tipo de agua residual que se vierte en los ríos, si es tratada o no tratada, debido al tipo de tratamiento aplicado y a la cantidad de agua vertida, ya que de acuerdo a la cantidad se dará o no el efecto de dilución y de autodepuración en estos cuerpos de agua.

Comparando los resultados de los estudios mencionados y lo obtenido en el río Bogotá, se puede evidenciar que las concentraciones de los indicadores bacterianos evaluados fueron similares en ríos de seis países, en Japón, Nigeria, Korea, España, Reino Unido y Colombia y en comparación con los estudios recientes los recuentos se mantuvieron incluso tres décadas después, confirmando la utilidad de los indicadores para demostrar la presencia de contaminación fecal en el agua y evaluar su calidad microbiológica, pero sin discriminar el origen de la contaminación fecal.

En cuanto a los indicadores virales, la concentración de colifagos somáticos hallada en la cuenca alta del río Bogotá fue de  $10^3$  UFP/100 mL, en la cuenca media de  $10^5$  UFP/100 mL y en la cuenca baja de  $10^4$  UFP/100 mL, la cuenca media presentó la concentración más alta debido al alto nivel de contaminación que se presenta en dicha zona por el paso del río por la capital del país, estos resultados coinciden con lo reportado en el estudio de Venegas et al. (2015) en el que se detectaron dichos indicadores en las mismas concentraciones, en un promedio de  $10^3$  UFP/100 mL en la cuenca alta y de  $10^4$  UFP/100 mL en la cuenca baja, excepto en la cuenca media en donde se encontraron en  $10^5$  UFP/100 mL, esta concentración también coincide con la reportada por Lucena et al. (1996) en la evaluación de bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal en diferentes ríos de España, en donde se indica que la concentración de estos fagos se ve influenciada por la descarga de aguas residuales domésticas, como ocurre en la cuenca media del río Bogotá, que es la zona con mayor contaminación debido a los vertimientos de los habitantes de la ciudad de Bogotá y los municipios aledaños. En el caso de la concentración de la cuenca alta y baja, se observa que la contaminación es menor, los resultados coinciden con lo reportado por Jofre et al. (1995) en un estudio en el que evaluaron agua del río Llobregat antes de entrar a plantas de potabilización, en una de las plantas la concentración fue de  $4.6 \times 10^3$  UFP/100 mL y en la otra planta fue de  $1.1 \times 10^4$  UFP/100 mL, lo que indica que concentraciones de colifagos somáticos entre  $10^3$  y  $10^5$  UFP/100 mL son típicas en ríos que reciben agua residual doméstica tratada y sin tratar.

El promedio de la concentración de colifagos somáticos en todo el río Bogotá fue de  $10^4$  UFP/100 mL, coincidiendo con lo reportado por Jofre et al. (1995) en el río Llobregat y con



el reporte de Lucena et al. (2003) en un estudio en el que evaluaron la contaminación fecal de diferentes ríos, incluido el río Bogotá y otros ríos de países como Francia, España y Argentina, demostrando que la concentración de dichos indicadores virales es la misma en agua de ríos en diferentes condiciones geográficas; así mismo se observó que la concentración se mantuvo en ríos de España y en el río Bogotá incluso una década después.

Los resultados de los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC2056 en la cuenca alta se encontraron en un rango entre  $<1$  y  $10^1$  UFP/100 mL, coincidiendo con lo reportado por Lucena et al. (2003) y Venegas et al. (2015) en estudios realizados en el mismo río. En la cuenca media se hallaron en un rango entre  $10^1$  y  $10^4$  UFP/100 mL y en la cuenca baja entre  $10^{-1}$  y  $10^3$  UFP/100 mL, a diferencia de Venegas et al. (2015) quienes reportan un rango entre  $10^2$  y  $10^3$  UFP/100 mL en la cuenca baja; estas variaciones se deben al nivel de contaminación de dichas zonas, ya que como se ha mencionado, en las cuencas media y baja del río Bogotá se presentan los niveles de contaminación más altos, a excepción de la estación de muestreo Quebrada Santa Marta que es un afluente del río y presenta baja contaminación, por esta razón se realizó un proceso de concentración de la muestra para lograr detectar los fagos que infectan las cepas de *Bacteroides* spp.

Los resultados obtenidos en el río Bogotá con los indicadores cultivables no discriminantes y discriminantes, son comparables con lo hallado por Gómez-Doñate et al. (2011) en el río Llobregat, donde los colifagos somáticos se encontraron en un promedio de  $6.3 \times 10^3$  UFP/100 mL; en el presente estudio los colifagos somáticos se encontraron en la cuenca alta en promedio de  $2.9 \times 10^3$  UFP/100 mL, en la cuenca media  $1.4 \times 10^5$  UFP/100 mL, en la cuenca baja  $7.6 \times 10^4$  UFP/100 mL y en un promedio de  $7.4 \times 10^4$  UFP/100 mL en todo el río, es decir una unidad por encima de lo hallado en el río Llobregat. Con respecto a los resultados de los fagos que infectan la cepa *Bacteroides fragilis* RYC2056, en el estudio citado se hallaron en un rango entre  $<1$  y  $1.2 \times 10^2$  UFP/100 mL en un promedio de  $7.9 \times 10^0$  UFP/100 mL, en el presente estudio se detectaron en 52 de 54 muestras (96,3%), en un rango entre  $<1$  y  $1.4 \times 10^4$  UFP/100 mL, en un promedio de  $7.5 \times 10^2$  UFP/100 mL. En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, en el estudio citado obtuvieron recuentos en la totalidad de las muestras en un rango entre  $5.0 \times 10^1$  y  $1.0 \times 10^3$  UFP/100 mL en un promedio de  $4.0 \times 10^2$  UFP/100 mL, en el presente estudio los fagos se encontraron en 49 de 54 (90,7%) muestras, en un rango entre  $<1$  y  $1.3 \times 10^4$  UFP/100 mL en un promedio de  $6.7 \times 10^2$  UFP/100 mL, coincidiendo con el promedio calculado en el estudio mencionado. Como se puede observar los niveles de contaminación de los dos ríos comparados son diferentes, los resultados de la cuenca alta del río Bogotá, la zona menos contaminada, coinciden con los reportes del río Llobregat en donde se encuentran concentraciones de los indicadores de contaminación fecal menores a las halladas en las cuencas media y baja del río Bogotá, esto se debe a que en el recorrido del río Llobregat hay varias PTARD que realizan tratamientos terciarios y desinfección y vierten los efluentes en dicho río, lo que disminuye notablemente la contaminación en ese cuerpo de agua. En el caso de las cuencas media y baja, los resultados se encontraron dos unidades por encima

de las concentraciones reportadas en el río Llobregat, ya que en estas zonas del río Bogotá existen pocas PTARD y algunas de las existentes perdieron su capacidad debido a que fueron diseñadas para tratar las aguas domésticas generadas por una población menor, por lo que actualmente son insuficientes; así mismo, es importante mencionar que las plantas existentes realizan tratamiento primario que no elimina microorganismos, por lo tanto las concentraciones de microorganismos se mantienen constantes en las tres cuencas.

En el río Bogotá se encontraron concentraciones de fagos que infectan la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 en un promedio de  $6.7 \times 10^2$  UFP/100 mL, lo que concuerda con lo reportado por Payán (2006) en Jofre et al. (2014) en un estudio realizado en la Unión Europea en el que indican que la cepa GA17 es detectada en concentraciones ligeramente superiores a  $10^2$  UFP/100 mL en agua de río moderadamente contaminado con contaminación fecal de origen humano, con valores de *E. coli* de  $10^3$  UFC/100 mL, sin embargo, esta característica no se presentó en el presente estudio, ya que el promedio de los recuentos de *E. coli* fue de  $1.6 \times 10^5$  UFC/100 mL, lo que indica un nivel de contaminación fecal mayor, debido a las diferencias en los sistemas de saneamiento existentes entre los ríos europeos y el río Bogotá, que ya se han mencionado antes. Estos resultados confirman que la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 es útil para discriminar la contaminación fecal humana y contribuye en la diferenciación y seguimiento del origen de la contaminación en la cuenca del río Bogotá, así como en otras cuencas de ríos europeos con condiciones geográficas y de saneamiento diferentes, en las que se evaluó la cepa anteriormente.

En cuanto a los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 en cada una de las cuencas del río Bogotá, se encontraron en la cuenca alta en un rango entre  $<1$  y  $7.1 \times 10^1$  UFP/100 mL, en la cuenca media entre  $2.0 \times 10^1$  y  $1.3 \times 10^4$  UFP/100 mL y en la cuenca baja entre  $<1$  y  $6.1 \times 10^3$  UFP/100 mL concordando con lo reportado por Venegas et al. (2015) (a excepción de una muestra de la cuenca baja en la que no se detectaron los fagos), en un estudio realizado en las mismas estaciones de muestreo, confirmando el vertimiento de aguas residuales domésticas a lo largo del río. Teniendo en cuenta esta correlación entre los resultados, se infiere que la cepa GA17 se puede seguir utilizando en el área de la cuenca del río Bogotá para discriminar la contaminación de origen fecal humano.

Con respecto a la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ), en la cuenca alta del río Bogotá el promedio calculado fue de 2 unidades, en la cuenca media de 1.9 y en la cuenca baja de 2.4, lo que indica contaminación predominante de origen humano; coincidiendo con lo propuesto por Muniesa et al. (2012) quienes hallaron que el resultado de la relación entre colifagos somáticos y fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 da valores de aproximadamente 2 unidades indican contaminación humana y valores mayores a 4 unidades contaminación no humana. El análisis de este parámetro se desglosará por cada una de las estaciones de muestreo de las tres cuencas en el siguiente numeral.

Los resultados de la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) relacionados con los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa *B. thetaiotaomicron* GA17 confirman que la mayor fuente de contaminación del río Bogotá es de origen humano. Esto debido a los vertimientos provenientes de los habitantes de los 24 municipios que recorre y de los 8 millones de habitantes de la capital del país, coincidiendo con lo reportado por Venegas et al. (2015) para el mismo río.

En relación a los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, aislada a partir de contenido intestinal de porcinos y evaluada en muestras de agua del río Bogotá, se hallaron en 19 de 54 muestras evaluadas (35,2%) de todo el río; en la cuenca alta en un rango entre  $<1$  y  $3.5$  UFP/100 mL, en la cuenca media entre  $<1$  y  $2.0 \times 10^2$  UFP/100 mL y en la cuenca baja entre  $<1$  y  $4.0 \times 10^1$  UFP/100 mL, en un promedio de  $7.9$  UFP/100 mL, evidenciando la descarga de aguas provenientes de sitios de cría y sacrificio de ganado porcino tal y como se pudo comprobar por la localización de plantas de beneficio de este ganado en las tres cuencas. El mayor recuento se encontró en la cuenca media, que se caracteriza por tener una gran carga de contaminación fecal humana debida al paso del río por la ciudad de Bogotá, sin embargo, se deben tener en cuenta las aguas residuales de las grandes plantas de beneficio de porcinos de la capital que sacrifican una gran cantidad de animales y que generan altos índices de contaminación por el volumen de sus desechos, por lo cual la contaminación de origen porcino es significativa en esta zona del río Bogotá. Los resultados obtenidos son comparables con los hallados en el estudio de Gómez-Doñate et al. (2011), en el que aislaron las cepas PG76 y PG1126 a partir de agua con contaminación porcina, encontrando que fueron específicas para discriminar la contaminación fecal de origen porcino y al evaluarlas en el río Llobregat obtuvieron recuentos de fagos que infectan la cepa PG76 en seis de 15 muestras (40,0%) en un rango entre  $<1$  y  $5.0 \times 10^1$  UFP/100 mL, mientras que en el caso de la cepa PG1126 los resultados se hallaban por debajo del límite de cuantificación de la técnica en la totalidad de las muestras. Al comparar los resultados obtenidos con el reporte de Gómez-Doñate et al. (2011) se observa que la detección de fagos de origen porcino en el río Bogotá se dio en un menor porcentaje con respecto a la detección en el río Llobregat; en cuanto a los recuentos de los fagos que infectan la cepa PZ8, únicamente coinciden con los obtenidos con la cepa PG76 los hallados en la cuenca baja del río Bogotá. Las diferencias encontradas se pueden deber a la cantidad de sitios de crianza y sacrificio de ganado porcino que realizan vertimientos sobre los ríos, ya que en el área de la cuenca del río Bogotá la actividad porcicultora es menor en comparación a la que se lleva a cabo en la región de la cuenca del río Llobregat, en donde las cifras de sacrificio de porcinos son altas debido a que la carne de este tipo de ganado es la segunda más consumida en España y en toda Europa, después de la carne de bovino (Ben Kaabia et al. 2001, EIPPCB 2006, Valta et al. 2014).

Estos resultados permiten inferir que esta cepa es un potencial indicador de la contaminación fecal por ganado porcino en la región geográfica de la cuenca del río Bogotá, debido a que la cepa presentó especificidad como indicadora discriminante de este tipo de

contaminación en muestras de agua con una mezcla de contaminación humana superior a la de origen animal, así como en muestras con bajos niveles de contaminación, provenientes de la cuenca alta del río Bogotá.

#### 4.5.2. Evaluación de los indicadores cultivables y moleculares útiles para discriminar el origen de la contaminación fecal en el río Bogotá

En la tabla 15 se presentan los resultados de los marcadores de contaminación fecal cultivables y moleculares discriminantes, evaluados en la cuenca alta del río Bogotá.

**Tabla 15. Marcadores de contaminación fecal humana y animal en la cuenca alta del río Bogotá**

ESTACIÓN DE MUESTREO	PUENTE FLORENCIA		
	VILLAPINZÓN	SAUCIO	PUENTE FLORENCIA
MARCADOR			
Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/L)	1.3x10 <sup>2</sup>	1.9x10 <sup>2</sup>	9.1x10 <sup>1</sup>
Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/L)	<1	6.5	4.3
Diferencia CS-GA17 (unidades log <sub>10</sub> )	-0.2	2.6	2.8
ADO (+/total)	0/6	5/6	0/6
DEN (+/total)	0/6	4/6	0/6
HF183F (+/total)	0/6	6/6	2/6
CF128F (+/total)	2/6	3/6	0/6

En la cuenca alta del río Bogotá se detectó el marcador HF183F en 8 de 18 muestras (44,4%), los marcadores CF128F y ADO en 5 (27,8%) y el marcador DEN en 4 (22,2%). En la estación de muestreo Villapinzón, los marcadores de contaminación fecal humana HF183F, ADO y DEN no se detectaron, estos resultados indican la escasa presencia de este tipo de contaminación fecal en ese punto del río; también se puede inferir que la concentración de ADN de las muestras provenientes de esa estación era muy baja y no fue detectada mediante la técnica de PCR a pesar de haber realizado un proceso de concentración con las muestras, debido a que esa zona es la que tiene menor contaminación por ser el sector más cercano al nacimiento del río. Al relacionar estos resultados con los obtenidos con los marcadores cultivables se encuentra que en este punto los indicadores bacterianos y virales no discriminantes evaluados, estaban en un rango entre 10<sup>1</sup> y 10<sup>2</sup> unidades evidenciando el bajo nivel de contaminación, de igual forma ocurrió con los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 como indicador de

contaminación fecal humana, que se encontraron en sólo dos muestras de esta estación en el orden de  $10^1$  y  $10^2$  UFP/L y en el caso de los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 que no se encontraron en esta estación, indicando que posiblemente no hay presencia de contaminación fecal de origen porcino en este punto del río. Estos resultados coinciden con lo reportado en el estudio de Venegas et al. (2015) en el que se indica que en muestras con baja contaminación fecal no es posible detectar la presencia de marcadores moleculares. En cuanto al marcador CF128F que indica contaminación bovina, se detectó en dos de las seis muestras provenientes de la estación mencionada, este resultado se explica por la presencia de ganado bovino en la región aledaña al sitio de toma de muestra.

En la segunda estación de muestreo de la cuenca alta, Saucio, se detectó el marcador HF183F en la totalidad de las muestras evaluadas, ADO en cinco de las seis muestras y DEN en cuatro muestras; los resultados de este conjunto de marcadores que indican la presencia de contaminación fecal humana se confirman debido a que en este punto se vierten las aguas residuales domésticas tratadas y sin tratar del municipio de Villapinzón. Estos resultados se relacionan con los recuentos obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, que se encontraron en un rango entre  $10^1$  y  $10^2$  UFP/100 mL en todas las muestras de esta estación y con el resultado de la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) que se calculó en un promedio de 2.6 unidades, lo que confirma la presencia de contaminación fecal humana en este punto de la cuenca alta del río Bogotá. En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, que tiene potencial para discriminar la contaminación fecal de origen porcino, se hallaron en tres de las seis muestras en un promedio de 6.5 UFP/L, lo que se explica por la presencia de pequeñas granjas porcícolas en la zona. Con respecto al marcador CF128F, se detectó en tres de las seis muestras, confirmando la presencia de contaminación fecal de origen bovino debido al vertimiento de las aguas residuales tratadas y sin tratar de la planta de beneficio del municipio de Villapinzón que sacrifica ganado bovino diariamente.

En la estación de muestreo Puente Florencia, la tercera de la cuenca alta del río Bogotá, se detectó el marcador HF183F en dos de las seis muestras evaluadas, los demás marcadores no se detectaron; estos resultados se explican por la posible presencia de compuestos químicos que interfirieron con la reacción de PCR, tales como fenoles que pueden inhibirla, ya que la fuente de contaminación en este punto de muestreo es principalmente industrial debido a que en la zona se encuentran instaladas fábricas de diferentes sectores de la industria; relacionando estos resultados con los obtenidos con los marcadores cultivables se encuentra que los indicadores bacterianos y virales no discriminantes, se encuentran en un rango entre  $10^1$  y  $10^3$  UFC/100 mL UFP/100 mL, lo que evidencia que a pesar de presentarse contaminación fecal en este punto no se logró la detección de los marcadores moleculares mencionados. Sin embargo, se deduce la presencia de contaminación fecal humana por la detección del marcador HF183F en al menos dos muestras y por los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 que se encontraron en todas las muestras de esta estación en un rango entre  $10^1$  y  $10^2$  UFP/L, así como el promedio de la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) que fue de

2.8 unidades, confirmando la presencia de fuentes de contaminación humana, esto se explica porque a su paso por esta estación de muestreo, el río ya ha recorrido tres municipios de la provincia de Almeidas: Villapinzón, Chocontá y Suesca, en los cuales se vierten aguas residuales domésticas tratadas y sin tratar. En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, estos se hallaron en cuatro de las seis muestras en un promedio de 4.3 UFP/L, lo que indica la posible presencia de contaminación fecal de origen porcino, ya que al igual que en la estación de muestreo anterior, en esta también se evidenció la presencia de pequeñas granjas porcícolas en las fincas de la zona.

Los resultados de los marcadores de contaminación fecal cultivables y moleculares discriminantes, evaluados en la cuenca media del río Bogotá se observan en la Tabla 16.

**Tabla 16. Marcadores de contaminación fecal humana y animal en la cuenca media del río Bogotá**

ESTACIÓN DE MUESTREO	PUENTE	PUENTE LA	EL
MARCADOR	BAVARIA	VIRGEN	CORTIJO
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	1.2x10 <sup>2</sup>	5.7x10 <sup>2</sup>	3.0x10 <sup>3</sup>
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	1.7x10 <sup>1</sup>	1.0x10 <sup>1</sup>	3.3x10 <sup>1</sup>
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>)</b>	1.4	2.0	2.1
<b>ADO (+/total)</b>	6/6	0/6	6/6
<b>DEN (+/total)</b>	0/6	0/6	6/6
<b>HF183F (+/total)</b>	0/6	4/6	6/6
<b>CF128F (+/total)</b>	0/6	3/6	6/6

En la cuenca media del río Bogotá se detectó el marcador ADO en 12 de 18 muestras (66,7%), el marcador HF183F en 10 (55,6%), CF128F en 9 (50,0%) y DEN en 6 (33,3%). En la estación de muestreo Puente Bavaria no se detectaron los marcadores HF183F, DEN y CF128F en ninguna de las seis muestras evaluadas, el marcador ADO se detectó en la totalidad de las muestras; a pesar de que los demás marcadores de contaminación fecal humana no se detectaron, se infiere la presencia de este tipo de contaminación debido a la relación que se encuentra con los resultados obtenidos con los marcadores cultivables discriminantes, los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se hallaron en concentraciones de 10<sup>1</sup> y 10<sup>2</sup> UFP/100 mL y la diferencia entre CS-GA17 (unidades log<sub>10</sub>) que se encontró en un promedio de 1.4 unidades, indicando la presencia de contaminación humana; de igual forma se tiene en cuenta que el marcador ADO se caracteriza por tener una alta sensibilidad en presencia de contaminación fecal humana, como lo reporta Bonjoch et al, (2004), lo que confirma la presencia de este tipo de contaminación en la estación de muestreo. Este tipo de contaminación se debe a que en

este punto el río ha recorrido el sur de la provincia de Almeidas pasando por el municipio de Sesquilé y por parte de la provincia de Sabana Centro pasando por los municipios de Tocancipá y Gachancipá de los que recibe aguas residuales domésticas tratadas y sin tratar, así como una gran cantidad de afluentes que llegan contaminados desde tales municipios. En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8, se encontraron en tres de las seis muestras, en concentración de  $10^1$  UFP/100 mL, indicando la posible presencia de contaminación fecal porcina, que puede deberse a la cría de ganado porcino en la zona.

En la estación de muestreo Puente La Virgen el marcador HF183F se detectó en cuatro de las seis muestras evaluadas, los marcadores ADO y DEN no se detectaron y CF128F se detectó en tres muestras. En este punto de la cuenca media del río Bogotá la contaminación fecal es alta, se hallaron recuentos de *E. coli* de  $10^5$  UFC/100 mL y recuentos de bacteriófagos que infectan la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 en todas las muestras, en un rango entre  $10^2$  y  $10^3$  UFP/100 mL, lo que relacionado con los resultados del marcador HF183F y la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) que se encontró en este punto en un promedio de 2.0 unidades, indican la presencia de contaminación fecal humana. Estos resultados y altos recuentos se deben a que actualmente en esta estación de muestreo se vierten directamente las aguas residuales domésticas sin tratar del municipio de Cota, lo que se evidenció en el momento de la toma de muestras. De igual forma se observó la presencia de hatos ganaderos en este punto de la cuenca media del río Bogotá, lo que explica la detección del marcador molecular de contaminación bovina CF128F. Con respecto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 que indica contaminación fecal porcina, se encontraron en tres muestras en un recuento de  $10^1$  UFP/100 mL; la presencia de este tipo de contaminación se puede deber a que en este punto el río ya ha pasado por el municipio de Zipaquirá en donde se encuentra ubicado el Frigorífico que sacrifica bovinos y porcinos, por lo tanto parte de los vertimientos generados son transportados por el río lo que explicaría la presencia de contaminantes fecales de origen porcino en esta zona.

En la última estación de muestreo de la cuenca media del río Bogotá, El Cortijo, se detectaron todos los marcadores moleculares en la totalidad de las muestras; estos resultados se deben a que en este punto el río recibe un alto volumen de descargas de aguas residuales domésticas e industriales tratadas y sin tratar, provenientes del norte de la ciudad de Bogotá. De acuerdo a los recuentos obtenidos con los marcadores cultivables, que se encuentran en la sección anterior, este es el punto más contaminado de la cuenca media del río, tal es el caso de *E. coli* que se halló en recuentos de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/100 mL, este alto nivel de contaminación explica la presencia de todos los marcadores moleculares que indican contaminación de origen humano, teniendo en cuenta la relación que se muestra en el trabajo de Venegas et al. (2015), en donde indican que en los casos en los que se detectaron los marcadores HF183F (50%), ADO (25%) y DEN (25%) en lo que denominaron cuenca baja (unión de resultados de las cuencas media y baja), correspondieron a muestras con una alta contaminación fecal, con valores de *E. coli* de  $10^6$

UFC/100 mL coincidiendo con los recuentos hallados en el presente estudio en la misma estación de muestreo, dicha relación también se evidencia en el trabajo de Jofre et al. (2014). Así mismo, se encuentra la relación con los resultados de los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, con recuentos entre  $10^2$  y  $10^4$  UFP/100 mL y la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) que se halló en un promedio de 2.1 unidades, confirmando el origen fecal humano de la contaminación en este punto, debida al gran volumen de vertimientos de aguas domésticas de los habitantes de la zona noroccidental de la capital del país. En el caso de los resultados de los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 como indicador de contaminación porcina que se hallaron en una muestra y los resultados del marcador de contaminación bovina CF128F que se detectó en todas las muestras; se infiere que es poco probable la presencia de contaminación fecal porcina y bovina en la zona teniendo en cuenta que la estación de muestreo se encuentra ubicada en un área urbana, por lo tanto, estos resultados se puede deber a la presencia de contaminantes fecales que son arrastrados por el río provenientes de los sitios de cría y sacrificio de estos tipos de ganado, que se encuentran en los municipios aledaños a la ciudad de Bogotá.

En la tabla 17 se presentan los resultados de los marcadores de contaminación fecal cultivables y moleculares discriminantes, evaluados en la cuenca baja del río Bogotá.

**Tabla 17. Marcadores de contaminación fecal humana y animal en la cuenca baja del río Bogotá**

ESTACIÓN DE MUESTREO	PEAJE "EL NUEVO SALTO"	HIDROELÉCTRICA DARIO VALENCIA "LA GUACA"	QUEBRADA SANTA MARTA (UFP/L)
<b>MARCADOR</b>			2.0
<b>Fagos <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> GA17 (UFP/100 mL)</b>	1.9x10 <sup>3</sup>	4.1x10 <sup>2</sup>	
<b>Fagos <i>Bacteroides fragilis</i> PZ8 (UFP/100 mL)</b>	6.7	3.3	3.2
<b>Diferencia CS-GA17 (unidades <math>\log_{10}</math>)</b>	2.0	2.6	2.6
<b>ADO (+/total)</b>	5/6	5/6	0/6
<b>DEN (+/total)</b>	4/6	4/6	0/6
<b>HF183F (+/total)</b>	3/6	2/6	2/6
<b>CF128F (+/total)</b>	5/6	2/6	0/6

En la cuenca baja del río Bogotá se detectaron los marcadores moleculares ADO en 10 de 18 muestras evaluadas (55,6%), DEN en 8 (44,4%) y HF183F y CF128F en siete muestras (38,9%). En la estación de muestreo Peaje El Nuevo Salto se detectó el marcador ADO en



cinco muestras, DEN en cuatro muestras y HF183F en tres de las seis muestras de esta estación; en este punto del río se encuentra un alto nivel de contaminación fecal que se evidenció con los resultados de los marcadores cultivables, en el caso de *E. coli* los recuentos son de  $10^5$  UFC/100 mL, lo que coincide con lo ocurrido en la estación de muestreo anterior en cuanto a la relación existente entre la detección de los marcadores moleculares que indican contaminación fecal humana y concentraciones de *E. coli* elevadas. La presencia de contaminación fecal de origen humano se confirmó con el resultado obtenido con los fagos que infectan la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, ya que se encontraron en todas las muestras de esta estación en un rango entre  $10^2$  y  $10^3$  UFP/100 mL; de igual forma ocurrió con la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) que se encontró en un promedio de 2.0 unidades indicando el origen fecal humano de la contaminación presente en las muestras, este tipo de contaminación se debe a que el río recibe a su paso por Bogotá un gran volumen de descargas sin tratar de los habitantes del centro y sur de la ciudad, así como del municipio de Soacha, debido a que en estos sectores no se cuenta con plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas. En cuanto a la presencia de contaminación fecal animal, los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 se hallaron en una muestra en el orden de  $10^1$  UFP/100 mL y el marcador de contaminación bovina CF128F en cinco muestras; en esta estación de muestreo no es común la contaminación de origen animal debido a que en este punto el río termina de pasar por la zona urbana de Bogotá y los municipios ubicados al sur de la capital y empieza de nuevo el recorrido por una zona rural en donde no son comunes las actividades agrícolas y ganaderas, allí el uso del río es netamente para generación de energía, por lo cual la presencia de contaminación de origen porcino y bovino se puede deber a los vertimientos de las grandes plantas de beneficio de estos tipos de ganado de la ciudad de Bogotá, que son importantes en términos de volumen debido a que sacrifican una gran cantidad de animales generando alta contaminación que persiste a lo largo del río.

En la estación de muestreo Hidroeléctrica Darío Valencia “La Guaca”, el marcador ADO se detectó en cinco de las seis muestras evaluadas, DEN en cuatro muestras y HF183F en dos muestras. En este punto del río Bogotá se detectaron altos niveles de contaminación fecal evidenciados por el recuento de *E. coli* que se halló en un rango entre  $10^4$  y  $10^5$  UFC/100 mL, coincidiendo con lo hallado en las estaciones El Cortijo y Peaje El Salto en donde los recuentos fueron de  $10^5$  UFC/100 mL, por lo que se infiere que en este caso también se dio la relación existente entre los altos recuentos de *E. coli* y la detección de marcadores moleculares relacionados con contaminación fecal humana; así mismo estos recuentos coinciden con la detección del marcador ADO en mayor proporción en comparación con los otros marcadores moleculares, como ocurrió en las dos estaciones de muestreo ya mencionadas. En cuanto a los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 se presentaron recuentos de  $10^1$  a  $10^2$  UFP/100 mL en todas las muestras de esta estación, lo que en conjunto con el promedio de la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) de 2.6 unidades indica la presencia de contaminación fecal humana. Al relacionar estos resultados con la detección de los marcadores moleculares se confirma la presencia

de contaminación fecal humana resultante de todo el recorrido que ha hecho el río después de pasar por Bogotá, pasando por las provincias de Soacha y Tequendama en donde se vierten aguas residuales domésticas sin tratar, como ocurre en gran parte del trayecto del río. Con respecto a la presencia de fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 como posible indicador de contaminación porcina, se encontraron en una muestra de esta estación en un recuento de  $10^1$  UFP/100 mL, por lo que se infiere que la contaminación de origen animal en este punto del río es mínima, ya que con el marcador molecular CF128F que indica la presencia de contaminación fecal bovina también se obtuvieron menores resultados, sólo se detectó en dos muestras. Estos resultados se deben a que en esta zona de la cuenca baja del río las actividades de cría y sacrificio de ganado se realizan a muy baja escala, mientras que la actividad económica principal es la generación de energía eléctrica mediante el uso del agua del río Bogotá.

En la última estación de muestreo de la cuenca baja, en la Quebrada Santa Marta, se detectó el marcador HF183F en dos muestras de las seis evaluadas, los demás marcadores moleculares no se detectaron a pesar de haber realizado un proceso de concentración con las muestras debido a la baja contaminación de este cuerpo de agua, ya que como se ha mencionado la quebrada es un afluente del río Bogotá y se encuentra ubicada en una zona rural con menos posibilidades de recibir grandes volúmenes de vertimientos; estos bajos niveles de contaminación se evidenciaron con recuentos de *E. coli* de  $10^2$  y  $10^3$  UFC/100 mL. En cuanto a los indicadores discriminantes se halló que los recuentos de fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, se encontraron en cinco de las seis muestras evaluadas en un rango entre 1 y 4 UFP/L y el promedio de CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ) en 2.6 unidades lo que indica contaminación fecal de origen humano, aunque en una proporción baja, comparable a la evidenciada en la cuenca alta del río. Los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 como posible cepa indicadora del origen porcino de la contaminación fecal, se hallaron en tres muestras en un recuento en un rango entre 1 y  $10^1$  UFP/L, lo que se debe a la descarga de aguas residuales provenientes de fincas de cría de este tipo de ganado en la zona. En general, la presencia de contaminación tanto animal como humana en la quebrada, se debe a que en el trayecto que recorre desde su nacimiento en el municipio de El Colegio hasta su desembocadura en el río Bogotá, recibe principalmente aguas residuales de origen agropecuario provenientes de las actividades de cría de ganado porcino y en menor proporción de ganado bovino, llevada a cabo en las veredas del sector; de igual forma recibe aguas residuales domésticas de algunas veredas y sectores poblados que se encuentran aguas arriba, aún sin recibir la descarga del alcantarillado del municipio de El Colegio, ya que el punto en el que se tomaron las muestras, la quebrada aún no termina de atravesar el casco urbano del municipio y es al final en donde se realizan las descargas de aguas residuales según información de la comunidad de la zona.

En el análisis de los resultados obtenidos con los marcadores moleculares se encuentra que en el estudio de Venegas et al. (2015) reportaron que en la cuenca alta del río Bogotá los marcadores ADO y DEN se encontraron en el 9% de las muestras y los marcadores HF183F y CF128F no se detectaron, esto en las estaciones de muestreo que presentaban baja contaminación, coincidiendo con lo hallado en el presente estudio en las estaciones de muestreo Villapinzón y Puente Florencia de la cuenca alta. De igual forma reportaron que en las cuencas media y baja los marcadores ADO y DEN se encontraron en por lo menos una de las cuatro muestras evaluadas (25%); los resultados del marcador ADO coinciden con lo que se detectó en las estaciones de muestreo Puente Bavaria y El Cortijo de la cuenca media y en las estaciones Peaje El Salto e Hidroeléctrica La Guaca de la cuenca baja del río Bogotá. En cuanto a los marcadores HF183F y CF128F, en el estudio citado se detectaron en dos de las cuatro muestras, lo que coincide con los resultados hallados en todas las estaciones de muestreo excepto Puente Bavaria y Quebrada Santa Marta, que fueron estaciones de muestreo con un bajo nivel de contaminación fecal de acuerdo a los resultados obtenidos con los marcadores cultivables.

En el mismo estudio reportaron que el marcador CF128F se detectó siempre en las mismas muestras en las que se detectaron los demás marcadores moleculares, lo que no coincide con los resultados hallados en el presente estudio, ya que en algunos casos como el de la estación de muestreo Villapinzón, se detectó dicho marcador sin estar presentes los demás marcadores moleculares.

El conjunto de resultados obtenidos en las estaciones de muestreo con variados niveles de contaminación de diferente origen fecal, refuerzan el principio de la disciplina de diferenciación del origen de la contaminación (Microbial Source Tracking) que indica que el uso de un único marcador no es suficiente para determinar la fuente de contaminación fecal, ya que como se puede observar en algunos casos no se encontraron ciertos marcadores de contaminación fecal humana a pesar de haber evidenciado los vertimientos de agua residual doméstica, de igual forma ocurrió con el marcador CF128F que indica la presencia de contaminación fecal de origen bovino y no se detectó en determinadas zonas de actividad ganadera.

Los resultados obtenidos con los marcadores moleculares en el río Bogotá concuerdan con los obtenidos por Jenkins et al. (2009) en el río Njoro en Kenya, en el que detectaron el marcador HF183F en dos de 18 muestras, evidenciando la presencia de contaminación fecal humana en este tipo de agua.

Los resultados de los marcadores moleculares son comparables con lo reportado en el estudio de Fremaux et al. (2009), en el que inicialmente se evaluaron los marcadores en aguas con contaminación conocida de origen bovino, porcino y humano, como se realizó en el presente estudio. En cuanto al marcador CF128F, en el estudio citado fue detectado en 49 de 51 muestras de origen bovino y en 11 de 50 muestras de origen porcino; con respecto al marcador HF183F, se detectó en 51 de 54 muestras de origen fecal humano y en 8 de 8 muestras de agua residual no tratada, sin detectar el marcador de contaminación bovina

CF128F en este tipo de agua. Posteriormente el marcador HF183F fue detectado en 7 de 14 (50%) muestras del río Qu'Appelle en Canadá y el marcador CF128F en 1 de 14 (7%) muestras, estos resultados coinciden parcialmente con lo hallado en el presente estudio ya que el marcador de contaminación humana se detectó en 25 de 54 (46,3%) muestras y el marcador de contaminación bovina en 21 de 54 (38,9%), dichos marcadores se detectaron en las diferentes estaciones de muestreo dependiendo del tipo de actividades antropogénicas llevadas a cabo en la zona, como actividades agrícolas y/o ganaderas y las prácticas asociadas a estas, en algunos casos prácticas inapropiadas como la deposición directa de los residuos fecales de ganado bovino en el agua, así como por la presencia de plantas de beneficio de ganado que también realizan prácticas inadecuadas contaminando los cuerpos de agua, entre otras actividades y en cuanto a la contaminación de origen humano, como ya se ha mencionado, esta se da por el paso del río por áreas urbanas con influencia de las plantas de tratamiento de pueblos y ciudades, también por fallas de las pocas plantas de tratamiento existentes, tal como se observó en toda la cuenca del río Bogotá. De igual forma en el estudio citado se halló la relación existente entre la detección de marcadores moleculares de contaminación fecal humana, con la presencia de entero patógenos como *E. coli* y altos recuentos de dicha bacteria.

A nivel general, en el análisis de los marcadores discriminantes, se evidenció que la cepa de *Bacteroides fragilis* PZ8 tiene potencial para discriminar la contaminación fecal animal de origen porcino en aguas con diferentes grados de contaminación y en aguas que presentan una alta contaminación de origen humano, como se observó en los resultados obtenidos en la cuenca alta del río Bogotá y en la Quebrada Santa Marta, que presentan un bajo nivel de contaminación y en las cuencas media y baja que se encuentran altamente contaminadas por aguas residuales de origen fecal humano.

Basados en los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 en aguas con diferentes grados de contaminación fecal humana evaluadas en países de la Unión Europea (Blanch et al. 2004), en Suecia y Reino Unido (Payán et al. 2005, Payán 2006) en España, Francia y Chipre (Blanch et al. 2006), España (Gómez-Doñate et al. 2011, Muniesa et al. 2012) y en Túnez (Yahya et al. 2015) (Jofre et al. 2014, Jebri et al. 2017) y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que la cepa funciona como indicador de la contaminación fecal humana en el río Bogotá, que tiene una evidente carga de contaminación humana debido a la gran cantidad de vertimientos realizados a su paso por 24 municipios del Departamento de Cundinamarca y por la ciudad de Bogotá; por lo que se infiere que esta cepa puede ser evaluada también en otros ríos del país en dónde la contaminación es menor, las cuencas han sido menos estudiadas y no se tienen identificadas las fuentes que generan la contaminación fecal como sí ocurre en la cuenca del río Bogotá.

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos con los fagos que infectan la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y con la diferencia entre CS-GA17 (unidades  $\log_{10}$ ), que fueron útiles para discriminar la contaminación fecal humana en el río Bogotá,

se deben relacionar con los resultados de los demás marcadores cultivables y moleculares para confirmar el origen fecal, debido a que estos resultados por sí solos no siempre van a discriminar la fuente de contaminación, ya que como se había mencionado anteriormente, en la literatura se encuentran reportes de recuentos de los fagos que infectan la cepa GA17 en aguas con contaminación de otras fuentes diferentes a la humana en otros países en los que se ha evaluado dicha cepa (Blanch et al. 2006, Yahya et al. 2015).

Los resultados de los marcadores moleculares permitieron evidenciar su utilidad para discriminar el origen de la contaminación fecal, ya sea de origen humano o animal, pero como en el caso de los marcadores cultivables, estos no se deben utilizar como única fuente de información para discriminar la fuente de contaminación. Estos resultados refuerzan lo descrito por Simpson et al. (2002), Field & Samadpour (2007) y Hagedorn et al. (2011), en donde indican que un único marcador no es suficiente para determinar la fuente de contaminación fecal, por lo cual es necesario utilizar un conjunto de marcadores que se denominan como una “bolsa de marcadores” o “caja de herramientas” e integrar los resultados obtenidos con estos y hacer el análisis en programas informáticos desarrollados para tal fin, como el software Ichanea©, basado en sistemas inductivos de aprendizaje.

## 5. CONCLUSIONES

Se aisló una cepa bacteriana de *Bacteroides fragilis* PZ8 específica para diferenciar la contaminación por materia fecal de ganado porcino en nuestras condiciones geográficas y con potencial para ser utilizada en la cuenca del río Bogotá y en otros ríos del país.

No se aisló una cepa de *Bacteroides* spp. para discriminar la contaminación fecal de ganado bovino.

Los marcadores discriminantes, como las cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 y *Bacteroides fragilis* PZ8 son potencialmente útiles para diferenciar el origen de la contaminación fecal de origen humano y de porcino, respectivamente, en aguas de plantas de beneficio de bovinos y porcinos, aguas residuales domésticas y aguas del río Bogotá.

La relación entre los valores de colifagos somáticos y fagos de *Bacteroides thetaiotaomicron* cepa GA17 confirmó que la contaminación microbiana del río Bogotá es principalmente de origen fecal humano.

Los marcadores moleculares HF183F, *Bifidobacterium adolescentis* ADO y *Bifidobacterium dentium* DEN son útiles para discriminar la contaminación fecal humana en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos y porcinos, aguas residuales domésticas y en aguas del río Bogotá.

El marcador molecular CF128F discrimina la presencia de contaminación fecal animal bovina en aguas residuales de plantas de beneficio de bovinos y porcinos, aguas residuales domésticas y en aguas del río Bogotá.

## 6. RECOMENDACIONES

Es importante continuar con la búsqueda de marcadores que discriminen el origen de la contaminación fecal en la cuenca del río Bogotá. Se recomienda aislar una cepa de *Bacteroides* spp., específica para diferenciar la contaminación fecal de origen aviar y bovino, debido a que la carne de estos animales son las más consumidas en el país, además de la carne de cerdo; por lo que se cuenta con una mayor cantidad de plantas de beneficio que sacrifican estos tipos de ganado, lo que hace necesario evaluar el impacto y diferenciar el origen fecal de los vertimientos que estas plantas hacen a los cuerpos de agua.

Para realizar el aislamiento de cepas de origen bovino se recomienda evaluar la toma de muestra del líquido ruminal de los bovinos, teniendo en cuenta que este mantiene condiciones de anaerobiosis, lo que facilitaría la supervivencia de las bacterias de interés que son anaerobias estrictas. Para esta toma de muestra se recomienda establecer un mejor punto de muestreo, incluso contemplar la posibilidad de extraer la muestra en el animal en pie y no en el momento del sacrificio.

En futuros trabajos se recomienda a nivel molecular, realizar un procedimiento de concentración o pre enriquecimiento de las muestras de agua con baja contaminación antes de realizar la extracción del ADN, por medio del uso de caldos enriquecidos e incubación en condiciones de anaerobiosis o mediante la incubación de las membranas que hacen parte del kit comercial de extracción.

Así mismo para el protocolo de extracción de ADN, se recomienda adicionar reactivos que eliminen las sustancias químicas presentes en el agua que puedan inhibir la reacción de PCR.

Para la detección de los marcadores moleculares de origen humano y animal, se recomienda utilizar protocolos más específicos y cuantificables como la q-PCR.

Se recomienda la integración de la información en programas matemáticos como el Ichanea®, que permite la identificación de la fuente de contaminación fecal mediante el entrenamiento del sistema con los resultados obtenidos en la evaluación del origen de la contaminación, debido a que es un software basado en sistemas inductivos de aprendizaje.

Es importante evaluar los marcadores discriminantes seleccionados en el presente estudio en otros ríos del país en donde las cuencas han sido menos estudiadas y no se tienen identificadas las fuentes que generan la contaminación fecal, contribuyendo a la selección de un grupo de marcadores adecuados para aplicar en cualquier río del país.

## COMPLEMENTARIOS

### BIBLIOGRAFÍA

Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de La Salud. Tercera Edición, Volumen 1. Bacteriosis y Micosis, 2001. En: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 2nd edition. Washington: Pan American Health Organization/World Health Organization. Obtenido de: [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download).

Ahmed W, Stewart J, Powell D, Gardner T. Evaluation of *Bacteroides* markers for the detection of human faecal pollution. *Letters in Applied Microbiology*, 46 (2): 237 - 242, 2008. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02287.x.

Ahmed W, Goonetilleke A, Powell D, Gardner T. Evaluation of multiple sewage-associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking. *Water Research*, 43 (19): 4872 – 4877, 2009. doi:10.1016/j.watres.2009.08.042.

Alarcón MA, Beltrán M, Cárdenas ML, Campos MC. Recuento y determinación de viabilidad de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. en aguas potables y residuales en la cuenca alta del río Bogotá. *Biomédica*, 25: 353 - 365, 2005.

American Public Health Association (APHA). Standard method for examination of water and wastewater. 22th edition. American Public Health Association/American Water Works Association /Water Environment Federation. Washington, D.C., United States. 2012.

Aranha-Creado H, Brandwein H. Application of Bacteriophages as Surrogates for Mammalian Viruses: A Case for Use in Filter Validation Based on Precedents and Current Practices in Medical and Environmental Virology. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 53 (2): 75 – 82, 1999.

Araujo R, Muniesa M, Méndez X, Puig A, Queralt N, Lucena F, Jofre J. Optimisation and standardisation of a method for detecting and enumerating bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. *Journal of Virological Methods*, 93: 127 - 136, 2001. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00261-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00261-0).

Armon R. Bacteriophage monitoring in drinking water: do they fulfill the index or indicator function. *Water Science and Technology*, 27: 463 - 467, 1993.

Armon R, Kott Y. Distribution comparison between coliphages and phages of anaerobic bacteria (*Bacteroides fragilis*) in water sources, and their reliability as fecal pollution indicators in drinking water. *Water Science and Technology*, 31 (5 - 6): 215 - 222, 1995. doi: [doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00269-S](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00269-S).



Armon R, Kott Y. Bacteriophages as indicators of pollution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26: 299 - 335, 1996. doi: 10.1080/10643389609388494.

Ashbolt NJ, Grabow WOK, Snozzi M. Indicators of microbial water quality. World Health Organization (WHO). *Water Quality - Guidelines, Standards and Health: Assessment of Risk and Risk Management for Water-Related Infectious Disease*. Edited by Lorna Fewtrell and Jamie Bartram. Published by IWA Publishing, London, UK, 2001 and World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2001.

Asociación Colombiana de Porcicultores - Asoporcicultores. Informe consumo per cápita de carne de cerdo año 2016. 2016. Recuperado de: <http://www.laboratoriosprovet.com/menu/eventos-noticias/52-consumo-per-capita-de-carne-de-cerdo>.

Baer AA, Miller MJ, Dilger AC. Pathogens of Interest to the Pork Industry: A Review of Research on Interventions to Assure Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12 (2): 183 – 217, 2013. doi: 10.1111/1541-4337.12001.

Baker KH, Herson DS. Detection and Occurrence of Indicator Organisms and Pathogens. Measurement and Monitoring of Pollutants. Literature Review. *Water Environment Research*, 71(5): 530 - 551, 1999. doi: <https://doi.org/10.2175/106143099X133622>.

Ballesté E, Bonjoch X, Belanche LA, Blanch AR. Molecular Indicators Used in the Development of Predictive Models for Microbial Source Tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (6): 1789 – 1795, 2010. doi: 10.1128/AEM.02350-09.

Banco Mundial, World Bank Group. Environmental, Health and Safety (EHS) Guidelines for Meat Processing. General EHS Guidelines: Environmental Wastewater and Ambient Water Quality, 2007. Obtenido de: <http://www.ifc.org/ehsguidelines>.

Barros LSS, Amaral LA, Lorenzon CS, Junior JL, Machado Neto JG. Potential microbiological contamination of effluents in poultry and swine abattoirs. *Epidemiology and Infection*, 135 (3): 505 - 518, 2007. doi:10.1017/S0950268806006972.

Baudizsova, D. Evaluation of *Escherichia coli* as the main indicator of faecal pollution. *Water Science and Technology*, 35: 333 – 336, 1997. doi:10.1016/S0273-1223(97)00281-3.

Banks CJ, Wang Z. Treatment of meat wastes, in: Wang LK, Yung-Tse Hung, Lo HH, Yapijakis C (Eds.), *Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment*, CRC Press, 2004.

Belanche LA, Blanch AR. Machine learning methods for microbial source tracking. *Environmental Modeling and Software*, 23: 741 - 750, 2008. doi: 10.1016/j.envsoft.2007.09.013.

Belanche LA, Blanch AR. Statistical Approaches for Modeling in Microbial Source Tracking en Hagedorn et al. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. 207 - 227, 2011. doi:10.1007/978-1-4419-9386-1\_9.

Ben Kaabia M, Angulo AM, Gil JM. Health information and the demand for meat in Spain. *European Review of Agricultural Economics*, 28 (4, 1): 499 - 517, 2001. doi: [//doi.org/10.1093/erae/28.4.499](https://doi.org/10.1093/erae/28.4.499).

Benka-Coker MO, Ojior OO. Effect of slaughterhouse wastes on the water quality of Ikpoba river, Nigeria. *Bioresource Technology*, 52 (1): 5 - 12, 1995. doi:10.1016/0960-8524(94)00139-R.

Bernhard AE, Field KG. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4571 – 4574, 2000a. doi:10.1128/AEM.66.10.4571-4574.2000.

Bernhard AE, Field KG. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4): 1587 – 1594, 2000b. doi:10.1128/AEM.66.4.1587-1594.2000.

Blanch A, Belanche-Muñoz L, Bonjoch X, Ebdon J, Gantzer C, Lucena F, Ottoson J, Kourtis C, Iversen A, Kühn I, Moce L, Muniesa M, Schwartzbrod J, Skrabber S, Papageorgiou G, Taylor HD, Wallis J, Jofre J. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *Journal of Water and Health*, 2 (4): 249 – 260, 2004.

Blanch A, Belanche-Muñoz L, Bonjoch X, Ebdon J, Gantzer C, Lucena F, Ottoson J, Kourtis C, Iversen A, Kühn I, Mocé L, Muniesa M, Schwartzbrod J, Skrabber S, Papageorgiou GT, Taylor H, Wallis J, Jofre J. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (9): 5915 - 5926, 2006. doi:10.1128/AEM.02453-05.

Bonjoch X, Ballesté E, Blanch AR. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Applied Environmental Microbiology*, 70 (5): 3171 – 3175, 2004. doi:10.1128/AEM.70.5.3171-3175.2004.

Bonjoch X, Ballesté E, Blanch AR. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Research*, 39 (8): 1621 - 1627, 2005. doi:10.1016/j.watres.2005.01.018.

Booth SJ, Van Tassell RL, Johnson JL, Wilkins TD. Bacteriophages of *Bacteroides*. *Reviews of Infectious Diseases*, 1 (2): 325 - 336, 1979. doi: <https://doi.org/10.1093/clinids/1.2.325>.

Borrego JJ, Moriñigo MA, De Vicente A, Córnanx R, Romero P. Coliphages as an Indicator of fecal pollution in water. It relationship with indicator and pathogenic microorganism. *Water Research*, 21 (12): 1473 - 1480, 1987. doi:10.1016/0043-1354(87)90130-8.

Bouwman L, Goldewijk KK, Van Der Hoek KW, Beusen AHW, Van Vuuren DP, Willems J, Rufino MC, Stehfest E. Exploring global changes in nitrogen and phosphorus cycles in agriculture induced by livestock production over the 1900-2050 period. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (52): 20882 - 20887, 2013. doi: 10.1073/pnas.1012878108.

Brion GM, Neelakantan TR, Lingireddy S. A neural-network-based classification scheme for sorting sources and ages of faecal contamination in water. *Water Research*, 36 (15): 3765 - 3774, 2002. Doi:10.1016/S0043-1354(02)00091-X.

Bull MA, Sterritt RM, Lester JN. The treatment of wastewaters from the meat industry: a review. *Environmental Technology Letters*, 3 (3): 117 - 126, 1982. <http://dx.doi.org/10.1080/09593338209384107>.

Bustillo-Lecompte CF, Mehrvar M. Slaughterhouse wastewater characteristics, treatment, and management in the meat processing industry: A review on trends and advances. *Journal of Environmental Management*, 161: 287 - 302, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.008>

Caballero SC, Sumano HS. Characterization of stress in bovines. A review. *Archivos de Medicina Veterinaria (Chile)*, 1993.

Camper AK, McFeters GA, Characklis WG, Jones WL. Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking-water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8): 2233 - 2239, 1991.

Campos C, Cárdenas M, Guerrero A. Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferentes tipos de aguas en la Sabana de Bogotá. *Universitas Scientiarum*, 13 (2): 103 - 108, 2009.

Campos C, Guerrero A. Evaluating the usefulness of bacteriophages as model microorganisms for the assessment of water treatment processes and water quality, final report. Universidad de Barcelona, Universidad de Nancy, Universidad de Buenos Aires y Universidad Javeriana. Proyecto No. ERB3514PL972471 de INCO-DC. International Cooperation with Developing Countries of Unión Europea 1999 - 2001. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2002.

Chacon G, Garcia-Belenguer S, Villarroel M, Maria GA. Effect of transport stress on physiological responses of male bovines. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 112 (12): 465 - 469. 2005. PMID: 16425633.

Claydong P, Danteravanich S, Siritwong C, Uakritdathikarn S. Bacteriophages, coliform and fecal coliform bacteria in wastewater in southern Thailand. Faculty of Environmental Management, Prince of Songkla University, Thailand, 2001. En: *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology: Molecular Technology, Nutrient Removal, Sludge*

Reduction, and Environmental Health. Matsuo T, Hanaki K, Takizawa S, Satoh H. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2001.

Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55 (10): 4908 – 4911, 2011. doi: 10.1128/AAC.00535-11.

Contreras-Coll N, Lucena F, Mooijman K, Havelaar A, Pierzo V, Boque M, Gawler A, Holler C, Lambiri M, Mirolo G, Moreno B, Niemi M, Sommer R, Valentin B, Wiedenmann A, Young V, Jofre J. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Research*, 36 (20): 4963 – 4974, 2002. doi: 10.1016/S0043-1354(02)00229-4.

Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco J, Blanco M, López C, Andreu A, Navarro F, Alonso M.P, Bou G, Blanco J, Llagostera M. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2799 - 2805, 2010. doi: 10.1128/AEM.02421-09.

Crowther J, Kay D, Wyer MD. Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: relationships with land use and farming practices. *Water Research*, 36 (7): 1725 - 1734, 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00394-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00394-3).

Decreto 901 de 2007 del Ministerio del Medio Ambiente. Por medio del cual se reglamentan las tasas retributivas por la utilización directa o indirecta del agua como receptor de los vertimientos puntuales y se establecen las tarifas de éstas.

De Sena RF, Tambosi JL, Genena AK, Moreira R.d.F.P.M, Schröder H.Fr, José HJ. Treatment of meat industry wastewater using dissolved air flotation and advanced oxidation processes monitored by GC-MS and LC-MS. *Chemical Engineering Journal*, 152 (1): 151 - 157, 2009. doi: 10.1016/j.cej.2009.04.021.

Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends in Ecology Evolution*, 21: 517 - 523, 2006. doi: 10.1016/j.tree.2006.06.013.

Ebdon J, Muniesa M, Taylor H. The application of a recently isolated strain of *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water Research*, 41(16): 3683 – 3690, 2007. doi:10.1016/j.watres.2006.12.020.

Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (S1): 106S – 116S, 2000. doi:10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x.

Egborge ABM, Benka-Coker J. Water quality index: application in the Warri River, Nigeria. *Environmental Pollution (Series B)*, 12: 27 - 40, 1986. doi: [https://doi.org/10.1016/0143-148X\(86\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0143-148X(86)90004-2).

Environmental Protection Agency, US EPA. Effluent limitations guidelines and new source performance standards for the meat and poultry products point source category. U. S. Federal Regist. 69 (173), 2004. Obtenido de: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/20002F0Q.PDF?Dockkey%20002F0Q.PDF>.

Environmental Protection Agency, US EPA. Microbial source tracking guide. Document EPA/600/R-05/064. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2005.

European Commission, European integrated pollution prevention and control bureau (EIPPCB), Reference document on best available techniques (BAT) in the food, drink and milk industries, EIPPCB, Seville. Obtenido de: [http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/fdm\\_bref\\_0806.pdf](http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/fdm_bref_0806.pdf)., 2006.

European Commission, Reference document on best available techniques in the slaughterhouses and animal by-products industries. Obtenido de: [http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/sa\\_bref\\_0505.pdf](http://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/sa_bref_0505.pdf)., 2005.

Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations (UN), Food Outlook: Biannual Report on Global Food Markets. Meat and Meat Products. Rome, Italy, 2013. Obtenido de: <http://www.fao.org/docrep/019/i3473e/i3473e.pdf>.

Federación Colombiana de Ganaderos – Fedegan. Programa de Transformación Productiva - Sector Carne Bovina Sector Cárnico Bovino Colombiano, Oportunidades y Retos: hacia la construcción de una agenda país para la inserción internacional de la carne bovina colombiana 2001. Estadísticas de consume del año 2016 – 2017. Recuperado de: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/consumo-0>.

Federación Nacional de Avicultores de Colombia - Fenavi, Reporte del consume de aves en Colombia, Departamento Administrativo Nacional de Estadística, Dane (cifras consolidadas censo 2005 desde 1985, reporte año 2017).

Ferguson CM, Coote BG, Ashbolt NJ, Stevenson IM. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Research*, 30(9): 2045 – 2054, 1996. doi:10.1016/0043-1354(96)00079-6.

Field KG, Bernhard AE, Brodeur TJ. Molecular approaches to microbiological monitoring: fecal source detection. *Environmental Monitoring and Assessment*, 81: 313 - 326, 2003. doi: [https://doi.org/10.1007/978-94-017-0299-7\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0299-7_26).

Field KG, Samadpour M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research*, 41, (16): 3517 – 3538, 2007. doi:10.1016/j.watres.2007.06.056.

FoodDrinkEurope, Data and trends of the European food and drink industry. Obtenido de: [http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications\\_documents/Data\\_\\_Trends\\_%28int eractive%29.pdf](http://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/Data__Trends_%28int eractive%29.pdf)., 2013.

Franke-Whittle IH, Insam H. Treatment alternatives of slaughterhouse wastes, and their effect on the inactivation of different pathogens: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 39 (2): 139 - 151, 2013. doi: 10.3109/1040841X.2012.694410.

Fremaux B, Gritzfeld J, Boa T, Yost CK. Evaluation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed. *Water Research*, 43 (19): 4838 – 4849, 2009. doi:10.1016/j.watres.2009.06.045.

Funderburg SW, Sorber CA. Coliphages as indicators of enteric viruses in activated sludge. *Water Research*, 19 (5): 547 – 555, 1985. doi:10.1016/0043-1354(85)90059-4.

Gannoun H, Bouallagui H, Okbi A, Sayadi S, Hamdi M. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of biologically pretreated abattoir wastewaters in an upflow anaerobic filter. *Journal of Hazardous Materials*, 170 (1): 263 – 271, 2009. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.111.

Gantzer C, Maul A, Audic JM, Schwartzbrod L. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11): 4307 - 4312, 1998. doi: 0099-2240/98/\$04.0010.

Gavini F, Beerens H. Origin and identification of *Bifidobacteria* strains isolated from meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 46(1): 81 – 85, 1999. doi:10.1016/S0168-1605(98)00178-0.

Girones R, Ferrús MA, Alonso JL, Rodríguez-Manzano J, Calgua B, de Abreu Correã A, Hundesa A, Carratala A, Bofill-Mas S. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44: 4325 - 4339, 2010. doi:10.1016/j.watres.2010.06.030.

Gerbens-Leenes PW, Mekonnen MM, Hoekstra AY. The water footprint of poultry, pork and beef: a comparative study in different countries and production systems. *Water Resources and Industry*, 1 – 2: 25 - 36, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wri.2013.03.001>.

Gómez-Doñate M, Ballesté E, Muniesa M, Blanch AR. New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific *Bifidobacteriaceae* suitable for microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (16): 5788 – 5795, 2012. doi: 10.1128/AEM.00895-12.

Gómez-Doñate M, Payán A, Cortés I, Blanch AR, Lucena F, Jofre J, Muniesa M. Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water. *Environmental Microbiology*, 13 (6): 1622 - 1631, 2011. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02474.x

Grabow WOK, Coubrough P, Nupen E, Bateman B. Evaluation of coliphages as indicator of the virological quality of sewage-polluted water. *Water SA*, 10: 7 - 14, 1984.

Grabow WOK, Neubrech TE, Holtzhausen CS, Jofre J. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages. Excretion by humans and animals. *Water Science and Technology*, 31 (5 - 6): 223 - 230, 1995. doi: [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00270-W](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00270-W).

Grabow WOK, Taylor MB, Clay CG, Villiers JC. Molecular detection of viruses in drinking water: implications for safety and disinfection. En Proceeding: Second Conference of the International Life Science Institute: The Safety of Water Disinfection: Balancing Chemical and Chemical and Microbial Risk. Miami Beach, FL, 2000.

Grabow WOK. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water S.A.*, 27 (2): 251 - 268, 2001. doi:10.4314/wsa.v27i2.4999.

Guzmán C, Jofre J, Blanch AR, Lucena F. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *Journal of Virological Methods*, 144 (1-2): 41 - 48, 2007. doi:10.1016/j.jviromet.2007.03.017.

Hagedorn C, Harwood VJ, Blanch A. *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. Springer, New York, USA 2011.

Harwood VJ, Brownella M, Wang S, Lepo J, Ellenderb RD, Ajidahunc A, Helleinc KN, Kennedy E, Ye X, Flood C. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Research*, 43 (19): 4812 – 4819, 2009. doi:10.1016/j.watres.2009.06.029.

Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose J. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6): 3163 - 3170, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005.

Harwood VJ, Whitlock J, Withington, V. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of faecal contamination in subtropical waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (9): 3698 - 3704, 2000. doi: 10.1128/AEM.66.9.3698-3704.2000.

Hattori M, Taylor TD. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. *DNA Research*, 6 (1, 1): 1 – 12, 2009. doi://doi.org/10.1093/dnares/dsn033.

Haugland RA, Varma M, Sivaganesan M, Kelty C, Pedd L, Shanks OC. Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and human fecal waste by qPCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 33 (6): 348 - 357, 2010. doi:10.1016/j.syapm.2010.06.001.

Havelaar AH, Nieuwstad TJ. Bacteriophages and Fecal Bacteria as Indicators of Chlorination Efficiency of Biologically Treated Wastewater. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 57 (11): 1084 – 1088, 1985.

Hayes W. The Genetic of Bacteria and Their Viruses, second ed. Blackwell Scientific publications, Oxford, USA 1968.

Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M, Andréoletti L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Research*, 37 (19): 4703 - 4710, 2003. doi:10.1016/S0043-1354(03)00439-1.

International Organisation for Standardisation, ISO 9308-1. Water Quality. Detection and Enumeration of *Escherichia coli* and coliform Bacteria - Part 1: Membrane Filtration Method for Water with Low Bacteria Background Flora, Geneva, Switzerland 2014.

International Organisation for Standardisation, ISO 10705 - 2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages -Part 2: Enumeration of somatic coliphages, Geneva, Switzerland 2000.

International Organisation for Standardisation, ISO 10705 - 4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages -part 2: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*, Geneva, Switzerland 2001.

IWAPRC. Study Group on Health Related Water Microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research*, 25: 529 - 545, 1991.

Jebri S, Muniesa M, Jofre J. General and host-associated bacteriophage indicators of fecal pollution. En: Rose JB, Jiménez-Cisneros B, (eds) Global Water Pathogens Project. <http://www.waterpathogens.org> (A.Farnleitner, and A. Blanch (eds) Part 2 Indicators and Microbial Source Tracking Markers) <http://www.waterpathogens.org/book/coliphage> Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO, 2017.

Jenkins MW, Tiwari S, Lorente M, Gichaba CM, Wuertz S. Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific *Bacteroidales* assays. *Water Research*, 43 (19): 4956 – 4966, 2009. doi:10.1016/j.watres.2009.07.028.

Jofre J. Bacteriophages as indicators. En Encyclopedia of Environmental Microbiology, Vol. 1. Bitton G. (ed.). John Willey and Sons, New York, USA, 2002.

Jofre J. Indicators of waterborne enteric viruses. In Human Viruses in Water (Series Perspectives in Medical Virology). Bosch A. (ed.), Elsevier, London, UK, 2007.

Jofre J, Blasi M, Bosch A, Lucena F. Occurrence of Bacteriophages Infecting *Bacteroides fragilis* and Other Viruses in Polluted Marine Sediments. *Water Science and Technology*, 21 (3): 15 – 19, 1989.

Jofre J, Blanch AR, Lucena F, Muniesa M. Bacteriophages infecting *Bacteroides* as a marker for microbial source tracking. *Water Research*, 55: 1 - 11, 2014. doi:10.1016/j.watres.2014.02.006.



Jofre J, Lucena F. Los bacteriófagos, un instrumento útil en la gestión de la calidad microbiológica del agua regenerada. *Tecnología del agua*. 272: 56 - 68, 2006.

Jofre J, Lucena F, Blanch AR, Muniesa M. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. *Water*, 8 (5): 199; 2 - 21, 2016. doi:10.3390/w8050199.

Jofre J, Ollé E, Lucena F, Ribas F. Bacteriophage removal in water treatment plants. *Water Science and Technology*, 31 (5 - 6): 69 - 73, 1995. doi: 0273-1223(95)00243-X. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00243-G](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00243-G).

Johns MR. Developments in wastewater treatment in the meat processing industry: a review. *Bioresource Technology*, 54: 203 - 216, 1995. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00140-9](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(95)00140-9).

Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M, Meile L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (4): 1268 - 1273, 1997.

Kim G, Choi E, Lee D. Diffuse and point pollution impacts on the pathogen indicator organism level in the Geum River, Korea. *Science of the Total Environment*, 350 (1 - 3): 94 - 105, 2005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.021>.

Koeslag JH. Manuales para educación agropecuaria. Producción animal. 1. Cerdos – Alimentación y alimentos. 2. Cría de Cerdos. Editorial Trillas, México D.F., México 2001.

Kott Y, Ben-Ari H, Vinokur L. Coliphages survival as viral indicator in various wastewater quality effluents. *Prog Water Technology*, 10: 337 – 346, 1978.

Kott Y, Roze N, Sperber S, Betzer N. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research*, 8 (3): 165 - 171, 1974. doi:10.1016/0043-1354(74)90039-6.

Lamendella R, Santo Domingo JW, Oerther DB, Vogel JR, Stoeckel DM. Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of *Bacteroidetes* 16S rRNA gene. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3): 651 - 660, 2007. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00211.x.

Lasobras J, Muniesa M, Frias J, Lucena F, Jofre J. Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. *Water Science and Technology*, 35: 11 - 12, 1997. doi: [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00247-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00247-3).

Lawrence M. Treatment of slaughterhouse wastewater NDSU, 2006.

LeChevallier Mark W. Coliform regrowth in drinking water: A review. *Journal American Water Works Association*, 82 (11): 74 - 86, 1990.

Leclerc H, Mossel DAA, Edberg SC, Struijk CB. Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Review of Microbiology*, 55: 201 - 234, 2001. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.201.

Lee D, Lee H, Trevors JT, Weir SC, Thomas JL, Habash M. Characterization of sources and loadings of fecal pollutants using microbial source tracking assays in urban and rural areas of the Grand River Watershed, Southwestern Ontario. *Water Research*, 53: 123 - 131, 2014. doi:10.1016/j.watres.2014.01.003.

Liu H, Motoda H. Feature selection for knowledge discovery and data mining. Springer Science, New York, USA 1998.

Livingston SJ. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *Journal of Clinical Microbiology*, 7: 448 – 453, 1978.

Lodder WJ, de Roda Husman AM. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (3): 1453 – 1461, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005.

Lucena F, Araujo R, Jofre J. Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. *Water Research*, 30 (11): 2812 – 2816, 1996. doi: 10.1016/S0043-1354(96)00193-5.

Lucena F, Jofre J. Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. In *Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogens*. Sabour PM, Griffiths MW (eds), ASM Press, Washington D.C., USA, 2010.

Lucena F, Méndez X, Morón A, Calderón E, Campos C, Guerrero A, Cárdenas M, Gantzer C, Schwartzbrood L, Skrabber S, Jofre J. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (5): 808 - 815, 2003. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Brock Biología de los microorganismos*, Pearson Addison Wesley, Madrid, España 2009.

Mara DD, Oragui JI. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *Journal of Applied Bacteriology*, 55(2): 349 - 357, 1983. doi: 10.1111/j.1365-2672.1983.tb01331.x.

Martín-Burriel I, García-Muro E, Zaragoza P. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics*, 30 (3): 177 – 182. 1999. doi: 10.1046/j.1365-2052.1999.00437.x.

Martínez RA, García D, Gallego JL, Onofre G, Pérez J, Cañón J. Genetic variability in Colombian Creole cattle populations estimated by pedigree information. *Journal of Animal Science Abstract - Quantitative Genetics*, 86: 545 – 552, 2008. doi: 10.2527/jas.2007-0175.

Massé DI, Masse L. Characterization of wastewater from hog slaughterhouses in Eastern Canada and evaluation of their in-plant wastewater treatment systems. *Can. Agricultural Engineering*, 42 (3): 139 - 146, 2000. doi: <http://www.engr.usask.ca/societies/csae/c9918.pdf>.

Matsumura EM, Mierzwa JC. Water conservation and reuse in poultry processing plant-A case study. *Resources, Conservation and Recycling*, 52 (6): 835 - 842, 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2007.10.002>.

Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4506 - 4512, 1999.

McLellan SL, Daniels AD, Salmore AK. Clonal Populations of Thermotolerant *Enterobacteriaceae* in Recreational Water and Their Potential Interference with Fecal *Escherichia coli* Counts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4934 - 4938, 2001. doi: 10.1128/AEM.67.10.4934-4938.2001.

Meays CL, Broersma K, Nordin R, Mazumder A. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of Environmental Management*, 73 (1): 71 - 79, 2004. doi: 10.1016/j.jenvman.2004.06.001.

Mekonnen MM, Hoekstra AY. A global assessment of the water footprint of farm animal products. *Ecosystems*, 15 (3): 401 - 415, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10021-011-9517-8>.

Méndez J, Audicana A, Isern A, Llaneza J, Moreno B, Tarancón ML, Jofre J, Lucena F. Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water. *Journal of Virological Methods*, 117 (1): 19 - 25, 2004. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.013.

Méndez J, Jofre J, Lucena F, Contreras N, Mooijman K, Araujo R. Conservation of phage reference materials and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. *Journal of Virological Methods*, 106: 215 - 224, 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00163-5).

Mitchell M. Machine Learning. McGraw-Hill Higher Education, New York, USA 1997.

Mittal GS. Characterization of the effluent wastewater from abattoirs for land application. *Food Reviews International*, 20 (3): 229 - 256, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1081/LFRI-200029422>.

Morinigo MA, Wheeler D, Berry C, Jones C, Munoz MA, Cornax R, Borrego JJ. Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in southern England. *Water Research*, 26 (3): 267 - 271, 1992. doi: 10.1016/0043-1354(92)90022-V.

Multilateral Investment Guarantee Agency, Environmental Guidelines for Meat Processing and Rendering. Obtenido de: <http://www.fpeac.org/meat/EGuidelinesforMeatProcessing.pdf>., 2015.

Muniesa M, Jofre J. Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 86 (1): 65 - 76, 2004. doi:10.1023/B:ANTO.0000024909.75523.be.

Muniesa M, Lucena F, Blanch AR, Payán A, Jofre J. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Research*, 46 (19): 6410 – 6418, 2012. doi: 10.1016/j.watres.2012.09.015.

Nebra Y, Blanch AR. A New Selective Medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (11): 5173 – 5176, 1999.

Nebra Y, Bonjoch X, Blanch AR. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (5): 2651 - 2656, 2003. doi: 10.1128/AEM.69.5.2651-2656.2003.

Organización Mundial de la Salud (OMS) y OECD (Organization for Economic Co-operation and Development): 'Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods', OECD/WHO Drinking Water Quality Series, IWA Publishing, London, UK, 2003.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Criterios Relativos a la Salud y otra Información de Base, Guías para la Calidad del Agua Potable, 2: 93 – 99, 1987.

Oslinger A, Muñoz JE, Álvarez LA, Ariza F, Moreno F, Posso A. Caracterización de cerdos criollos colombianos mediante la técnica molecular RAMs Characterization of Colombian creole pigs by RAMs. *Acta Agronómica*, 55 (4): 45 – 52, 2006. ISSN electrónico 2323-0118. ISSN impreso 0120-2812.

Payán A. Bacteriófagos como modelo en el origen de la contaminación fecal en aguas regeneradas. Disertación doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona, España. 2006. Obtenido de <http://vuir.vu.edu.au/1598>.

Payán A, Ebdon J, Taylor H, Gantzer C, Ottoson J, Papageorgiou GT, Blanch AR, Lucena F, Jofre J, Muniesa M. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5659 - 5662, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.9.5659-5662.2005.

Pingali P. Westernization of Asian diets and the transformation of food systems: implications for research and policy. *Food Policy*, 32 (3): 281 - 298, 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodpol.2006.08.001>.

Puig A, Queralt N, Jofre J, Araujo R. Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (4): 1772 - 1776, 1999.

Quinlan J. C4.5: programs for machine learning. Morgan Kaufmann Publishers Inc, 1993.

Resolución 0273 de abril 1 de 1997 Ministerio del Medio Ambiente. Por la cual se fijan las tarifas mínimas de las tasas retributivas por vertimientos líquidos para los parámetros Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y Sólidos Suspendidos Totales (SST).

Ritter KJ, Carruthers E, Carson CA, Ellender RD, Harwood VJ, Kingsley K, Nakatsu C, Sadowsky M, Shear B, West B, Whitlock JE, Wiggins BA, Wilbur JD. Assessment of statistical methods used in library-based approaches to microbial source tracking. *Journal of Water and Health*, 1: 209 – 223, 2003.

Roslev P, Bukh AS. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (5): 1341 - 1355, 2011. doi: 10.1007/s00253-010-3080-7.

Ruiz I, Veiga MC, De Santiago P, Blázquez R. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. *Bioresource Technology*, 60 (3): 251 – 258, 1997. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00020-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00020-5).

Sánchez D, Belanche-Muñoz L, Blanch AR. A software system for the microbial source tracking problem. *Journal of Machine Learning Research (Workshop and Conference Proceedings)* 17: 56 - 62, 2011.

Santo Domingo JW, Sadowsky MJ. Microbial Source Tracking. ASM Press, Washington D.C., USA, 2007.

Savichtcheva O, Okayama N, Okabe S. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Research*, 41 (16): 3615 - 3628, 2007. doi:10.1016/j.watres.2007.03.028.

Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (12): 5796 - 5803, 2002. doi: 10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002.

Servais P, Garcia-Armisen T, George I, Billen G. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling. *Science of the Total Environment*, 375 (1–3): 152 - 167, 2007. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.12.010.

Simpson JM, Santo Domingo JW, Reasoner DJ. Microbial source tracking: state of the science. *Environmental Science and Technology*, 36 (4): 5279 - 5288, 2002. doi: 10.1021/es026000.

Sinton LW, Finlay RK, Hannah DJ. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: A review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32 (2): 323 - 348, 1998. doi: 10.1080/00288330.1998.9516828.

Siobhán D, O' Grady J, Colleran E. Specificity and sensitivity evaluation of novel and existing *Bacteroidales* and *Bifidobacteria*-specific PCR assays on feces and sewage samples and their application for microbial source tracking in Ireland. *Water Research*, 43 (19): 4980 - 4988, 2009. doi: 10.1016/j.watres.2009.08.050.

Skraber S, Gassilloud B, Gantzer C. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3644 – 3649, 2004. doi: 10.1128/AEM.70.6.3644-3649.2004.

Stetler RA. Coliphages as indicators of enteroviruses. *Applied Environmental Microbiology*, 48: 668 - 670, 1984.

Stevens M, Ashbolt N, Cunliffe D. "Microbial indicators of water quality: an NHMRC discussion paper." *National Health and Medical Council Act*, Canberra, 2001.

Stewart JR, Ellender RD, Gooch JA, Jiang S, Myoda SP, Weisberg SB. Recommendations for microbial source tracking: lessons from a methods comparison study. *Journal of Water and Health*, 1 (4): 225 - 231, 2003.

Stoeckel DM, Harwood VJ. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (8): 2405 - 2415, 2007. doi: 10.1128/AEM.02473-06.

Sun ZP, Levi Y, Kiene L, Dumoutier N, Lucena F. Quantification of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in environmental water samples of Seine River. *Water, Air and Soil Pollution*, 96: 175 - 183, 1997. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1026444102501>.

Szewzyk U, Manz W, Amann R, Schleifer KH, Stenstrom TA. Growth and in situ detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water-bacterium by use of 16S- and 23S-rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology*, 13 (3): 169 - 175, 1994. doi: 10.1111/j.1574-6941.1994.tb00063.x.

Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Leung KT. Microbial Indicators of Faecal Contamination in Water: A Current Perspective. *Water, Air and Soil Pollution*, 166 (1 - 4): 139 - 166, 2005. doi: 10.1007/s11270-005-7905-4.

Tartera C, Jofre J. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (7): 1632 – 1637, 1987.

Tartera C, Lucena F, Jofre J. Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (10): 2696 – 2701, 1989.

- Tritt WP, Schuchardt F. Materials flow and possibilities of treating liquid and solid wastes from slaughterhouses in Germany: A review. *Bioresource Technology*, 41 (3): 235 - 245, 1992. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90008-L](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(92)90008-L).
- Um MM, Barraud O, Kerourédan M, Gaschet M, Stalder T, Oswald E, Dagot C, Ploy M, Brugere H, Bibbal D. Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health. *Water Research*, 88: 30 – 38, 2015. doi: 10.1016/j.watres.2015.09.029.
- Valta K, Kosanovic T, Malamis D, Moustakas K, Loizidou M. Overview of water usage and wastewater management in the food and beverage industry. *Desalination and Water Treatment*, 53: 1 – 13 (3335 - 3347), 2014. doi: 10.1080/19443994.2014.934100.
- Vapnik V. Statistical Learning Theory. John Wiley, New York, USA 1998.
- Venegas C, Diez H, Blanch A, Jofre J, Campos C. Microbial source markers assessment in the Bogotá River basin (Colombia). *Journal of Water and Health*, 13 (3): 801 – 810, 2015.
- Vijayavel K, Fujioka R, Ebdon J, Taylor H. Isolation and characterization of *Bacteroides* host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. *Water Research*, 44 (12): 3714 - 3724, 2010. doi: 10.1016/j.watres.2010.04.012.
- Volker M. Dietary Modification of the Intestinal Microbiota. *Nutrition Reviews*, 62 (6): 235 - 242, 2004. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00045.x>.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2): 697 - 703, 1991. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Wentzel R, O'neil P & Kitchens J. Evaluation of coliphages detection as a rapid indicator of water quality. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(2): 430 - 434, 1982. doi: 0099-2240/82/020430-05\$02.00/0.
- West JW. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 86 (6): 2131 – 2144, 2003. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X).
- Wicki M, Auckenthaler A, Felleisen R, Tanner M, Baumgartner A. Novel *Bacteroides* host strains for detection of human- and animal-specific bacteriophages in water. *Journal of Water and Health*, 9(1): 159 - 168, 2011. doi: 10.2166/wh.2010.165.
- Wu P, Mittal G. Characterization of provincially inspected slaughterhouse wastewater in Ontario, Canada. *Canadian Biosystems Engineering*, 54: 6.9 - 6.18, 2012. doi: <http://www.csbe-scgab.ca/docs/journal/54/C12062.pdf>.

Yahya M, Hmaied F, Jebri S, Jofre J, Hamdi M. Bacteriophages as indicators of human and animal faecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, 118 (5): 1217 - 1225, 2015. doi: 10.1111/jam.12774.

Yates MV. Classical indicators in the 21st century - Far and beyond the coliform. *Water Environment Research*, 79 (3): 279 – 286, 2007. doi: 10.2175/106143006X123085.


Zhang K, Farahbakhsh K. Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: Implications to water reuse. *Water Research*, 41: 2816 – 2824, 2007. doi:10.1016/j.watres.2007.03.010.

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *The Journal of Nutrition*, 134 (2): 465 – 472, 2004.



## ANEXO A

### Cadena de custodia Laboratorio de Indicadores de Calidad de Aguas y Lodos.

 <p><b>Pontificia Universidad JAVERIANA</b> Bogotá</p>	<b>CADENA DE CUSTODIA</b>	CODIGO: <b>DM-LIAL-F 024</b>
<b>LABORATORIO DE INDICADORES DE CALIDAD DE AGUAS Y LODOS</b>		VERSIÓN: 03
		VIGENTE: 2013-02-01
ZONA DE MUESTREO		CODIGO DE MUESTRA
DIRECCION TOMA MUESTRA		CODIGO CSM
NOMBRE SOLICITANTE		CODIGO INTERNO
EMPRESA		
E-MAIL EMPRESA		
<b>INFORMACION DE LA MUESTRA</b>		
TIPO DE MUESTRA:	Agua Potable <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> Agua Residual <input type="checkbox"/> Cual: <input type="text"/>	Lodo <input type="checkbox"/> Biosolido <input type="checkbox"/> Suelo <input type="checkbox"/> Vegetales <input type="checkbox"/>
Fecha:	Hora:	Muestra: Puntual <input type="checkbox"/> Compuesta <input type="checkbox"/>
Numero de recipientes:	Contramuestra:	Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
<b>Dosificaciones:</b> (Cantidad y frecuencia de aplicación de reactivos que se utilicen para la potabilización o mantenimiento del agua de piscina o tratamiento de aguas residuales. Se deben informar en unidades de masa (g, mg, kg etc.) o volumen (L, mL, µl etc).		
El análisis lo solicita directamente la empresa o un tercero. Cuál ?		
<b>Descripción climática:</b> (Hace referencia a la temperatura, al registro o no de precipitaciones (lluvia) y a la radiación solar en el lugar de muestreo. Cuando aplica )		
<b>Responsable Toma de Muestra:</b> (En caso de que la cadena de custodia sea enviada vía mail, la firma debe ser electrónica o escaneada)		
Nombre:	Cédula:	
Entidad:	Teléfono:	
Cargo:	Móvil:	
Firma e Identificación:		
<b>Recepción de la muestra</b>		
Nombre:	Hora:	Temperatura de Conservación:
Fecha:		Muestra Conforme:
Firma e Identificación		
<b>ANÁLISIS A REALIZAR</b>		
<b>Microbiológicos</b>		
<b>Coliformes Fecales</b>		<b>Salmonella spp.</b>
Numero Mas Probable NMP	Filtración por Membrana	Numero Mas Probable NMP
<b>Escherichia coli</b>	<b>Enterococos</b>	<b>Clostridium</b>
Filtración por Membrana	Filtración por Membrana	Filtración por Membrana
<b>Fagos Somáticos</b>	<b>Fagos F Específicos</b>	<b>Fagos Bacteroides fragilis</b>
Recuento de <i>Giardia spp</i> y <i>Cryptosporidium spp</i>	Huevos de Helminto	
<b>Bioensayos</b>		
<i>Hydra attenuata</i>	<i>Daphnia magna</i>	<i>Eisenia foetida</i>
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Selenastrum spp</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<b>Observaciones:</b>		
<b>NOTA:</b> Favor diligenciar todos los espacios del presente formato. En caso excepcional coloque la palabra <b>NO APLICA</b>		
La cadena de custodia debe llegar con la muestra o ser enviada al laboratorio antes que ésta llegue, de lo contrario <b>NO SE RECIBIRÁ LA MUESTRA</b>		
Carrera 7ª 43-82, Edificio Angel Valtierra S.J. (51). Laboratorio 235. Telefono 3208320 ext. 4156 ó 4165, Bogotá D.C –Colombia		

## ANEXO B

**Registro de la cepa *Bacteroides fragilis* PZ8 al GenBank:** Número de acceso KY196191.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY196191>.

### Uncultured *Bacteroides* sp. clone WA-ZP8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KY196191.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS KY196191 957 bp DNA linear ENV 21-JUN-2017  
DEFINITION Uncultured *Bacteroides* sp. clone WA-ZP8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION KY196191  
VERSION KY196191.1  
KEYWORDS ENV.  
SOURCE uncultured *Bacteroides* sp.  
ORGANISM [uncultured \*Bacteroides\* sp.](#)  
Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; *Bacteroides*; environmental samples.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 957)  
AUTHORS Sanchez,A., Diez,H., Campos,C., Blanch,A., Jofre,J. and Venegas,C.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (02-NOV-2016) Microbiology, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No43-82 Ofic 307 (50), Bogota, Bogota, D.C 1A, Colombia  
COMMENT ##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##  
FEATURES  
source Location/Qualifiers  
1..957  
/organism="uncultured *Bacteroides* sp."  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolation\_source="Bogota River water"  
/db\_xref="taxon:162156"  
/clone="WA-ZP8"  
/environmental\_sample  
/country="Colombia: Zipaquira, Cundinamarca"  
/PCR\_primers="fwd\_seq: agagtttgatcmtggctcag, rev\_seq: tacggytacctgttagcactt"  
[rRNA](#) <1..>957  
/product="16S ribosomal RNA"

## ANEXO B (Continuación)

**Registro de la cepa *Bacteroides fragilis* PZ8 al GenBank:** Número de acceso KY196191.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY196191>.

### Uncultured *Bacteroides* sp. clone WA-ZP8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: KY196191.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

---

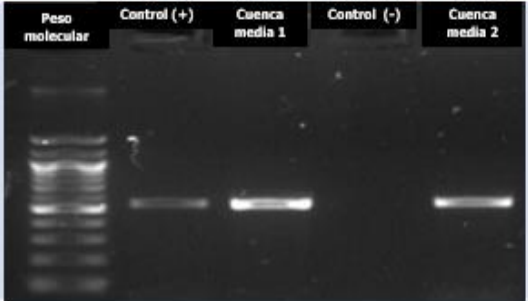
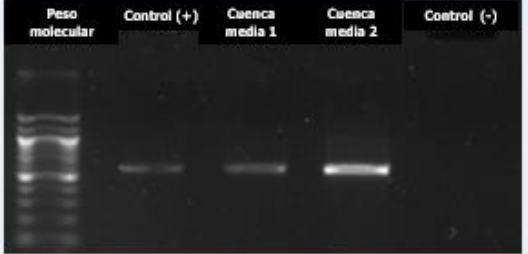
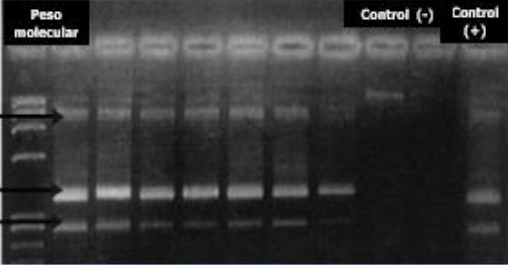
#### ORIGIN

```
1 cacagggcag gcccgccggg taatacggag gatccgagcg taatctgaat tattggttaa
61 agggagcgta ggtggactgg taaagtcagt tgtgaaagt gcggtcaac cgtaaaattg
121 cagttgatac tgcagtcctt gagtacagta gaggtgggagc gaattcgtgg thtagcggtg
181 aaatgcttag atatcacgaa gaactccgat tgcgaaggca gctcactgga ctgcaactga
241 cactgatgct cgaaagtgtg ggtatcaaac aggattagat accctggtag tccacacagt
301 aaacgatgaa tactcgtctg ttgcgatata cagtaagcgg ccaagcgaaa gcattaagta
361 ttccacctgg ggagtacgcc ggcaacggtg aaactcaaag gaattgacgg gggccccgac
421 aagcggagga acatgtggtt taattcgtat atacgcgagg aaccttaccg gggcttaaat
481 tgcagtggaa tgatgtggaa acatgtcagt gagcaatcac cgctgtgaag gtgctgcatg
541 gttgtcgtca gtcctgcccg tgaggtgtcg gcttaagtgc cataacgagc gcaaccctta
601 tctttagtta ctaacagggtt atgctgagga ctctagagag actgccgtcg taagatgtga
661 ggaaggtggg gatgacgtca aatcagcagc gcccttacgt cgggggctac acacgtgtta
721 caatgggggg tacagaaggc agctagcggg tgaccgtatg ctaatcccaa aatcctctct
781 cagttcggat cgaagtctgc aaccgactt cgtgaagctg gattcgttag taatcgcgca
841 tcagccacgg cgcgggtaat acgttcccgg gccctgtaca caccgccctg caagccatgg
901 gagccggggg tacctgaagt acgtaaccgc aaggatcgtc ctagggtgtaag cctggtg
```

//

## ANEXO C

**Visualización de los productos de PCR de la evaluación de los marcadores moleculares discriminantes de contaminación fecal en gel de agarosa**

MARCADOR	LECTURA. Banda de amplificación (pb)
<p style="text-align: center;"><b>HF183F</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Marcador de contaminación humana</b></p> <p style="text-align: center;">Bernhard AE and Field KG (2000a)</p> <p style="text-align: center;">-PCR convencional</p>	<p style="text-align: center;">520 pb</p> 
<p style="text-align: center;"><b>CF128F</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Marcador de contaminación bovina</b></p> <p style="text-align: center;">Bernhard AE and Field KG (2000b)</p> <p style="text-align: center;">- PCR convencional</p>	<p style="text-align: center;">580 – 590 pb</p> 
<p style="text-align: center;"><b>Lm3 – Lm26</b></p> <p style="text-align: center;">(Kaufmann et al. 1997, Bonjoch X et al. 2004) → <b>Bifidobacterium</b></p> <p style="text-align: center;">- PCR anidada</p> <p style="text-align: center;"><b>ADO y DEN</b></p> <p style="text-align: center;">(Matsuki T et al. 1999, Bonjoch X et al. 2004)</p> <p style="text-align: center;">- PCR multiplex</p>	 <p style="text-align: center;">Bonjoch X, Bailesté E, Blanch AR (2004)</p>