



# Identificación del origen de la contaminación fecal en aguas con *Bifidobacterium* spp. y/o *Bacteroides* spp. específicas de huéspedes

Marta Gómez Doñate

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





Departamento de Microbiología

Facultad de Biología

Universidad de Barcelona

**IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN FECAL EN AGUAS  
CON *BIFIDOBACTERIUM* SPP. Y/O *BACTEROIDES* SPP. ESPECÍFICAS DE  
HUÉSPEDES.**

Memoria presentada por Marta Gómez Doñate para optar al grado de Doctor por  
la Universidad de Barcelona

Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección del Doctor Anicet R. Blanch Gisbert y la Doctora  
M<sup>a</sup> Teresa Muniesa Pérez, en el departamento de Microbiología de la Universidad  
de Barcelona.

El director

La directora

La doctoranda

Dr. Anicet R. Blanch

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Muniesa

Marta Gómez

Barcelona, Junio 2014



*“Around here, however, we don’t look backwards for very long. We keep moving forward, opening up new doors and doing new things, because we’re curious... and curiosity keeps leading us down new paths”*

Walt Disney



*"La ciencia no conoce país, porque el conocimiento pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina el mundo"*

Louis Pasteur





*A mi familia*



## Agradecimientos

Parecía que este momento no fuera a llegar, pero lo ha hecho. Y más rápido de lo que esperaba. A lo largo de estos años he tenido el privilegio de conocer y trabajar con gente maravillosa de la cual he aprendido muchas cosas y con la que he compartido grandes experiencias. Es por ello que querría aprovechar estas líneas para agradecerles todo aquello que me llevo de ellos.

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores, Anicet y Maite, la oportunidad que me brindaron de poder trabajar aquí con ellos. Muchas gracias por todos vuestros sabios consejos y guías que me han permitido concluir con éxito esta tesis. Anicet, por la confianza que depositaste en mí, por tu interés y por tu criterio científico. Maite, has sido más que una “jefa”, me has ayudado mucho en situaciones de carácter personal (sobre todo con Martilla), has participado, tanto tú como tu familia, en las comilonas que hemos organizado y siempre te has preocupado por nosotros. Eres una gran amiga.

También quisiera dar las gracias al resto de profesores de este grupo de investigación, Joan, Francisco y Cristina. Joan, gracias por el interés que siempre has mostrado en mi trabajo, por entrar cada día a saludarnos al laboratorio y explicarnos anécdotas. Francisco, gracias por esos discursos de motivación que nos hacen sentir un grupo muy fuerte y unido, y gracias también por tus consejos de cómo identificar a un Coca-cola, Mimosín o Pryca, y cuál nos conviene más. Cristina, gracias por tu ayuda con las cromografías del *quorum sensing* y por los ánimos que nos das.

En un primer momento, cuando entré a formar parte de este grupo de investigación estuve en el laboratorio 9. Allí coincidí con unas compañeras fabulosas. Gracias Maru por ser la primera persona que me hizo sentir parte de este grupo, gracias Rachel por toda la ayuda que me has prestado, por todas esas sesiones de Phenomena y por estar siempre dispuesta a ayudarnos, y gracias Míriam por todas esas anécdotas que nos hacían reír aunque el día no fuera bueno. También tuve un compañero fabuloso que me fue guiando en mis primeros pasos, así que gracias Arnaus por tu paciencia, por nuestras excursiones al Delta y su “pont miserable”, y por compartir conmigo la gran experiencia de la DGGE. Gracias también a Julia, la incorporación más reciente, por los cafés de la mañana en Geo y ser tan risueña. Gracias también al resto de compañeros que pasaron por el labo 9 y también dejaron su huella, Camilo, Ángela, Sergi, Sílvia M y Raquel 2.

Gracias también a mis compañeros del laboratorio 8, Chus (y nuestras meriendas en Farmacia), Marta R, Byron, Sílvias, Xavi (Persi, sabes que te quiero a pesar de ser Vircont...), Ayalke, Laura G, Natalia, Anna C, Tarik y Sandra por las cenitas y fiestas varias, por las cervecitas en Bio y por esas visitas tan agradables que hacéis al labo 10. Gracias también a los compañeros del laboratorio 7, en especial a Markus, Raquel y Maite, y a los profesores Susana M y Joan T por dejarme usar su electroporador. Gracias también al resto de compañeros del departamento de Microbiología, en especial a las personas que estáis en Secretaría, Susana, Macu, Rosario (por los cafecitos de la mañana, por tu soporte durante las prácticas y por no dejarnos enloquecer por ellas), Bea y Manolo, por vuestra inestimable ayuda con los temas burocráticos y por todos los carnavales y sus deliciosos buñuelos.

A los que ya no estáis en el departamento, pero que se os sigue echando de menos, Jordi y Andreu. Nunca olvidaré nuestra escapada a Cadaqués, el juego de la oca, los Sing-star (aunque no lo reconozcas Andreu, te gané en *99 red balloons*), nuestras sesiones de cine, las cenitas y sus consecuentes copillas...Y a Jordi imitando a Rocky...

AquaValens-Team al poder!!!!!!!!!! Laura y Eli, moltes gràcies. Laura, ets genial, una lianta amb cara angelical i una curranta. M'encanta com planeges les bromes pels pobres "màsters" amb l'ús de la cabina, lo riallera que ets, l'organitzada (només cal veure els paquetets de mostres...) i que sempre "t'integres d'allò més bé"!!!! Jajajaja... Elis, gràcies per guiar-me també en els meus primers passos, pels teus "holeeee!!!!", per les nostres sortides i dinars romàntics dels mostrejós...Noies, som un super-equip!!!!

Ahora sí, llego al labo 10!!! Cuántas cosas para recordar...Primero de todo quisiera agradecer lo que me he llevado de las personas que ya no están. En primer lugar Fanny, gracias por tu paciencia y por enseñarme todo lo que hay que saber sobre los bacteriófagos, la titulación y que hay que decirles cosas bonitas a los *Bacteroides* para que crezcan mejor. Gracias a Lejla, sin ti no tendríamos ni la mitad de colores en el labo, eras la que nos mantenías a todos a ralla con el desorden, a la que acudíamos en momentos de crisis y siempre nos lo sabías solucionar todo, por las cenitas en tu casa, las risas, tus discusiones con Andreu como si fuerais un matrimonio, por las frases célebres como "el zumo a temperatura ambiental", mil gracias. A las chicas máster, Ana M y Miriam 2 (o Khaleesi como le gusta hacerse llamar). Con ambas he compartido grandes momentos. Gracias Ana por esa actitud tan alegre, esos momentos de empanamiento máximo (recordando la vitrina...), por el apoyo en la temática

musical...Míriam, gracias por ser tan trabajadora, divertida, tener tan buen sentido del humor y por aguantarnos cuando tocaba sesión Disney...

A Aiora, ¿qué habiéramos hecho sin ti? ¡Aiora tiene el poder! Gracias por enseñarnos tantas y tantas cosas, por tener tantísima paciencia, por ayudarnos en nuestras crisis con el ordenador, por tus pasteles y galletas deliciosas, por dejarme ser una garrapatilla cada lunes y miércoles, por los cafés de Geo, por cuando metemos la pata hasta el fondo hacérselo saber con “la mirada de lado”, por nuestras charlas, por aguantar la sesión Disney... ¡Mil gracias!

A Marta C, contigo ha sido con quién más tiempo he convivido estos años. Ya estábamos juntas en la carrera, luego el máster y después la tesis. Si lo sumamos todo, llevamos ya 10 años de amistad. Marta, te quiero agradecer todos los momentos que hemos compartido, como la escapada a Cadaqués, Port Aventura, los viajecitos o los congresos (vuelvo a pedirte disculpas por el rodillazo de Oviedo...). Tú has sido un gran apoyo para mí a lo largo de todo este tiempo, siempre te has interesado por las cosas que me sucedían y me mandabas mensajes de apoyo en momentos difíciles. ¡Gracias Marta!

A Anna, a pesar de empezar la carrera juntas no fue hasta que entramos en el departamento cuando pude conocerte mejor, y doy mil gracias por ello. Has sido mi gran apoyo durante estos años. En ti he encontrado una persona maravillosa, siempre has estado a mi lado, has sido mi paño de lágrimas y mi compañera en los momentos alegres (como cuando salían las DGGE...), incluso sólo con ver mi cara sabías qué pasaba. Anna, te doy gracias por todo, por ser siempre sincera, por ser siempre una amiga, por nuestras conversaciones con los cafés de Geo, por las sesiones de cine, por tu carácter alegre, por compartir nuestras inquietudes, por estar siempre dispuesta a echar una mano, por la complicidad en las sesiones Disney... Gracias, gracias y ¡gracias!

A Alex, eres la chispa de este grupo. Gracias por tus bromas, por tu carácter alegre, por estar siempre pendiente de todos y por preocuparte por nosotros. Desde el primer momento fuiste una persona cercana, con la que poder hablar, a quién pedir consejo, en quien confiar, por estar dispuesto tanto a echarnos un cable en el trabajo como a echarnos unas cervecitas... Aunque no lo admitas, ¡sabes que eres nuestro macho alfa!

A Pablo, enseguida supiste encajar a la perfección en este grupo. Gracias por ese carácter bonachón, por ser tan dedicado, por nuestro breve “noviazgo” y así rescatarme

en la cena de navidad, por ser tan buena persona, por tu sentido del humor... Y todo esto, a pesar de ser merengue... ¡Gracias Pablo!

Y a nuestras más recientes incorporaciones: William, Carmen y Ferran. Sir William, gracias por ser tan dulce y por decirnos cada día un piropo (¡eso siempre ayuda a tener un buen día!). Carmen, gracias por ser mi nueva cómplice en las sesiones Disney y por tu carácter amable y divertido. Ferran (o Burger-man), gracias por ser tan liante, tan divertido y por ser tan cercano.

Querría agradecer también a mis amigos y amigas el interés que han mostrado siempre y su apoyo. Por ello, gracias a mis amigos Mar, Cristina, Noemí, Ástrid, Uri, Jordi, Eduardo, RadCrais, Conxins, Marta ITC, Mireia, Tere, Marga, Dani, Alex, Neme, Cristina, Mari Carmen, Ferran y Toni.

Y por último, quisiera agradecer el apoyo incondicional que he recibido de mi familia, siempre a mi lado. A mi padre, por enseñarme a ver siempre el lado bueno de las cosas, por su interés en “¿cómo van los bichos, hija?”; y a mi madre, por transmitirme su pasión por la biología, por enseñarme a valorar un trabajo bien hecho. A mi hermana Paula, por estar siempre que la necesito aunque yo a veces ni lo sepa y por saber siempre qué hacer; a mi cuñado Juanma por ser tan bueno y paciente cuando tengo mis “neuras” con el ordenador y solucionarme siempre el problema. A mi madrina Loly, por ser tan dedicada, por acordarte siempre de mí y facilitarme siempre cualquier información que crea que puede resultarme interesante.

Y al amor de mi vida, a Marino, por soportarme en estos últimos meses. Sé que no he sido una gran compañía con los nervios y demás, pero tú siempre te has mostrado paciente, por saber darme un abrazo cuando lo necesitaba, por alegrarte conmigo cuando me ha salido un experimento, por darme el día más feliz de mi vida un 29 de mayo, por una vida contigo. ¡¡¡LYUC!!

Y por último, quisiera recordar a aquellas personas que he perdido en el camino y que desde que era pequeña me han animado a perseguir mis sueños. Gracias a mis tíos Julio, Antonio y Feliciano.

¡¡¡Mil gracias a todos!!!

## Contenidos

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. El agua.....	3
1.2. Microbiota intestinal.....	7
1.2.1. La importancia de la microbiota intestinal.....	7
1.2.2. Microorganismos indicadores.....	9
1.3. Determinación del origen de la contaminación fecal ( <i>Fecal Source Tracking</i> )....	11
1.3.1. Métodos químicos.....	11
1.3.2. Métodos microbiológicos.....	13
1.3.2.1. Métodos dependientes de librería.....	14
1.3.2.1.1. Métodos fenotípicos.....	14
1.3.2.1.2. Métodos genotípicos.....	15
1.3.2.2. Métodos independientes de librería.....	17
1.4. La relevancia de los géneros <i>Bacteroides</i> y <i>Bifidobacterium</i> como indicadores de la contaminación fecal en estudios de MST.....	29
1.4.1. <i>Bacteroides</i> spp. como microorganismos indicadores de la contaminación fecal.....	29
1.4.2. <i>Bifidobacterium</i> spp. como microorganismos indicadores de la contaminación fecal.....	33
1.5. Estado actual del MST y futuras direcciones.....	37
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>39</b>
<b>3. Publicaciones</b> .....	<b>43</b>
3.1. Uso de bacteriófagos de <i>Bacteroides</i> para estudios de MST.....	45
Resumen artículo 1.....	47
Informe del factor de impacto y de coautoría del artículo 1.....	51
Artículo 1: <i>Isolation of bacteriophage host strains of Bacteroides species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water</i> .....	53

3.2. Diseño de una qPCR de <i>Bifidobacterium</i> asociados a huésped.....	63
Resumen artículo 2.....	65
Informe del factor de impacto y de coautoría del artículo 2.....	69
Artículo 2: <i>New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific Bifidobacteriaceae suitable for microbial source tracking</i> .....	71
3.3. Uso de indicadores y del programa de aprendizaje inductivo en estudios de MST.....	79
Resumen artículo 3.....	81
Informe del factor de impacto y de coautoría del artículo 3.....	87
Artículo 3: <i>Determining fecal sources in waters with diverse pollution loads using traditional and molecular host-specific indicators and applying machine learning methods</i> .....	89
3.4. Uso de la DGGE para el diseño de qPCRs de <i>Bacteroides</i> específicas de huésped.....	125
Resumen artículo 4.....	127
Informe del factor de impacto y de coautoría del artículo 4.....	132
Artículo 4: <i>Study of Bacteroides 16S rRNA gene DGGE pattern-band to develop a new molecular real-time qPCR for the detection of host-specific Bacteroides suitable for microbial source tracking</i> .....	133
<b>4. Discusión.....</b>	<b>157</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>169</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>175</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>201</b>
7.1. Medios de cultivo y soluciones.....	203
7.2. Métodos generales.....	207
7.3. Programas de PCR y qPCR y listado de cebadores y sondas.....	217
7.4. Bacteriófagos y su utilización como indicadores de contaminación fecal vírica en aguas y alimentos.....	219



## Lista de abreviaturas

°C	grados Celsius
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNr 16S	secuencia cromosómica que codifica para el gen del ARNr 16S
AFLP	análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
APS	persulfato amónico
ARA	análisis de resistencia a antibióticos (Antibiotic Resistance Analysis)
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosómico
BBE	<i>B. fragilis</i> bilis esculina agar
BOMITO	marcador de MST basado en ADN mitocondrial de bovinos
BPRM	Bacteroides Phages Recovery Medium
CBA	medio Columbia Blood Agar
CF	coliforms fecales
CG	copias genómicas
CKMITO	marcador de MST basado en ADN mitocondrial de ave de corral
CUP	uso de fuentes de carbono (Carbon Utilization Profile)
C <sub>T</sub>	ciclo de una qPCR en la que la luminiscencia emitida supera la luminiscencia basal
DGGE	electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
EA	medio <i>Enterococcus</i> Agar
EDTA	ácido etilen-diamino-tetraacético
EF	enterococos fecales
EPA	Environmental Protection Agency
HBSA	Human Bifidobacteria Sorbitol-fermenting Agar
MST	Microbial Source Tracking
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	PCR cuantitativa
PFGE	electroforesis en geles de campo pulsado (Pulse Field Electrophoresis)
POMITO	marcador de MST basado en ADN mitocondrial porcino
RAPD	análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados por PCR con cebadores arbitrarios (Random Amplification of Polymorphic DNA)
Rep-PCR	amplificación múltiple (Repetitive element PCR)

Rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
SOMCPH	colifagos somáticos (Somatic Coliphages)
TAE	tampón Tris, ácido acético y EDTA
Taq	polimerasa termoestable utilizada en la PCR. Su nombre proviene de la bacteria de la cual fue extraída <i>Termus aquaticus</i>
TBE	tampón Tris, ácido bórico y EDTA
TGGE	electroforesis en geles de gradiente de temperatura (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
T <sub>m</sub>	temperatura de desnaturalización de una cadena doble de ADN
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
T-RFPL	análisis terminal de polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
TSA	Tryptone Soy Agar
TSB	Tryptone Soy Broth
UFC	unidades formadoras de colonias
UFP	unidades formadoras de calvas de lisis
UV	luz ultravioleta

# 1. Introducción



### 1. Introducción

#### 1.1. El agua

El agua es un recurso renovable y fundamental para el sustento y desarrollo de la vida en el planeta. Es un bien de primera necesidad para los seres vivos puesto que constituye más del 80% de la mayoría de ellos. Aproximadamente el 71% de la superficie terrestre está constituida por agua, el 97% de la cual corresponde a mares y océanos y el 3% restante a agua dulce. La mayor parte de ésta se encuentra en los casquetes polares, glaciares y zonas de alta montaña (aproximadamente constituye un 2,15% del agua total). El agua dulce de los acuíferos, lagos, humedad del suelo y ríos representa alrededor de un 0,63%. Es precisamente en este pequeño porcentaje donde se encuentra la verdadera reserva para el hombre y muchos otros seres vivos.

El agua dulce, además de ser indispensable para el desarrollo de la vida, es necesaria para el desarrollo de sociedades. El hombre necesita el agua tanto para disponer de buena salud (higiene, alimentación y aseo) como para desarrollar actividades económicas y productivas (piscifactorías, actividades agrarias, industria, generación de energía, turismo, etc.) y de ocio (piscinas, fuentes, etc.). Debido al crecimiento de la población humana junto con la expansión de la actividad industrial, la agricultura y ganadería intensivas y el cambio climático, como factores principales, han provocado un gran deterioro en la calidad del agua (USEPA 2004). El agua contaminada no es aceptable para el consumo, actividades agrícolas y ganaderas e industria, por lo que es necesario su saneamiento y una correcta gestión de los residuos antes de poder reutilizarla o verterla de nuevo al medio ambiente. Por ejemplo, en el área metropolitana de Barcelona en el año 2012 se trató un total de 270 millones de m<sup>3</sup> de agua residual (Dades Ambientals Metropolitanas 2012: [www.amb.cat](http://www.amb.cat)).

Los principales factores contaminantes del agua son residuos industriales, químicos, agrícolas (fertilizantes y pesticidas), humanos y ganaderos, ambos de elevada carga microbiológica, y el aporte de compuestos orgánicos y metales pesados, entre otros, por las aguas regeneradas.

La contaminación de origen fecal tanto humana como animal es, por tanto, una de las fuentes más relevantes de la polución del agua. Este tipo de contaminación puede comportar la presencia de microorganismos patógenos, los cuales implican un alto riesgo sanitario y grandes pérdidas económicas (alimentos no aptos para el consumo, piscinas y

## 1. Introducción

playas no aptas para el baño, etc.). La detección y enumeración de microorganismos patógenos no siempre es fácil. Muchos microorganismos presentan complicados requerimientos nutricionales o la disposición de líneas celulares establecidas). Frecuentemente los microorganismos presentes en el medio ambiente son de difícil recuperación, ya que en el medio ambiente están sometidos a un estrés que puede afectar a su viabilidad, lo que disminuye el número de microorganismos capaces de crecer en los medios de cultivo utilizados pero que, a pesar de ello, muchos de ellos a pequeñas dosis ya son capaces de provocar una infección. Los microorganismos patógenos de transmisión hídrica son responsables de numerosos brotes importantes en la Unión Europea en los últimos años (Tabla 1).

**Tabla 1.** Algunos casos de brotes asociados al agua (bebida, riego y limpieza) en países de la Unión Europea. Datos obtenidos de 26 países durante el período de tiempo 2007 a 2013 (<http://regionalnews.safefoodinternational.org>).

País	Número de afectados	Año	Agente etiológico o enfermedad
Alemania	1064, 470	2011	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC), Síndrome urémico hemolítico (HUS)
Bélgica	3	2011	Hepatitis A
Dinamarca	67; 120	2013; 2007	Hepatitis A; <i>Campylobacter</i> spp.
Eslovenia	408	2008	Gastroenteritis
España	100; 38	2011; 2007	<i>Salmonella</i> spp.; Norovirus
Estonia	19	2011	<i>Salmonella</i> spp.
Finlandia	72	2008	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Francia	30; 11	2013; 2011	<i>Legionella</i> spp.; Hepatitis E
Grecia	37	2009	<i>Campylobacter jejuni</i>
Hungría	181	2010	<i>Salmonella</i> spp.
Irlanda	138	2012	<i>E. coli</i>
Italia	16; 299	2013; 2009	<i>E. coli</i> O26 con HUS; gastroenteritis
Países Bajos	1; 33	2009; 2008	<i>Vibrio cholerae</i> ; <i>Salmonella</i> spp.
Portugal	22	2008	Norovirus
Reino Unido	18, 19; 267	2013; 2012	<i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157; <i>Cryptosporidium</i>
Rep. Checa	35	2011	Hepatitis A
Suecia	11000	2010	<i>Cryptosporidium</i> spp.

Las vías de infección más corrientes son la ingestión de las aguas que contienen el patógeno y, en menor medida, la inhalación (aerosoles donde la bacteria patógena se encuentra en suspensión) o el contacto directo. Cada patógeno se transmite principalmente por una o dos de estas vías. Las más corrientes se resumen en la Tabla 2.

Además de las vías de transmisión se indica si el microorganismo es capaz de sobrevivir en el ambiente, es decir, su nivel de persistencia, y si es capaz o no de multiplicarse fuera de su organismo huésped. También se resume la severidad de la infección que provoca cada uno de estos microorganismos, su capacidad infecciosa (si es

necesario un gran número de microorganismos para provocar la infección o, si por el contrario, con un número reducido ya son capaces) y cuál es su reservorio, ya bien sea animal o humano.

## 1. Introducción

**Tabla 2.** Agentes patógenos transmitidos por el agua, su relevancia y su vía de transmisión (OMS 2006).

Agente patógeno	Importancia para la salud	Persistencia sistemas abastecimiento de agua	Infectividad	Origen	Vía de infección
<b>Bacterias</b>					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Baja	Puede proliferar	Baja	Hombre	Contacto
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Alta	Moderada	Moderada	Animal	Ingestión
<i>Escherichia coli</i> (enteropatogénica, toxigénica e invasiva)	Alta	Moderada	Baja	Animal	Ingestión
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Alta	Moderada	Alta	Animal	Ingestión
<i>Legionella</i> spp.	Alta	Prolifera	Moderada	Hombre	Inhalación
Micobacterias no tuberculosas	Baja	Prolifera	Baja	Hombre	Inhalación
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Moderada	Puede proliferar	Baja	Hombre	Contacto
<i>Salmonella typhi</i>	Alta	Moderada	Baja	Hombre	Ingestión
Otras salmonelas	Alta	Puede proliferar	Baja	Animal	Ingestión
<i>Shigella</i> spp.	Alta	Corta	Moderada	Hombre	Ingestión
<i>Vibrio cholerae</i>	Alta	Corta	Baja	Hombre	Ingestión
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alta	Larga	Baja	Animal	Ingestión
<b>Virus</b>					
Adenovirus	Alta	Larga	Alta	Hombre	Ingestión
Enterovirus	Alta	Larga	Alta	Hombre	Ingestión
Virus de la hepatitis A	Alta	Larga	Alta	Hombre	Ingestión
Virus de la hepatitis E	Alta	Larga	Alta	Potencial animal	Ingestión
Norovirus y sapovirus	Alta	Larga	Alta	Potencial animal	Ingestión
Rotavirus	Alta	Larga	Alta	Hombre	Ingestión
<b>Protozoos</b>					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Alta	Larga	Alta	Hombre	Contacto
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Alta	Larga	Alta	Animal	Ingestión
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Alta	Larga	Alta	Hombre	Ingestión
<i>Entamoeba histolytica</i>	Alta	Moderada	Alta	Hombre	Ingestión
<i>Giardia intestinalis</i>	Alta	Moderada	Alta	Animal	Ingestión
<i>Naegleria fowleri</i>	Alta	Puede proliferar	Alta	Hombre	Inhalación
<i>Toxoplasma gondii</i>	Alta	Larga	Alta	Animal	Ingestión
<b>Helmintos</b>					
<i>Dracunculus medinensis</i>	Alta	Moderada	Alta	Hombre	Ingestión
<i>Schistosoma</i> spp.	Alta	Corta	Alta	Animal	Contacto



### 1.2. Microbiota intestinal

#### 1.2.1. La importancia de la microbiota intestinal

Tanto en la nutrición como en la salud, la microbiota intestinal juega un papel muy importante en muchas áreas de la fisiología humana y animal. Este complejo conjunto de microorganismos lleva a cabo una gran cantidad de reacciones metabólicas a lo largo del intestino, sobre todo a través de sus capacidades degradativas. Existen cientos de tipos de bacterias diferentes, con una amplia variedad en su fisiología y bioquímica, como consecuencia de la multitud de microhábitats que se pueden encontrar en el lumen del intestino grueso, en las superficies mucosas y en la capa de mucina. Se considera que tanto la microbiota como el organismo huésped obtienen beneficios de esta asociación aparentemente simbiótica. Por ejemplo, la microbiota intestinal encuentra dentro del huésped los sustratos necesarios a partir de la dieta para crecer y multiplicarse, además de encontrarse en un ambiente de relativa estabilidad donde puede proliferar. El organismo huésped por su parte obtiene ayuda en la digestión de la comida, el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos, la inmunopotenciación del huésped y la protección que le confiere, ya que la microbiota representa una barrera protectora ante la posible infección por parte de un microorganismo patógeno, al dificultar la posible adhesión y proliferación de éste (Fuller 1989; Tannock 1995) y además, en algunos casos la microbiota sintetiza vitaminas como la biotina, la vitamina K (Zocco y col. 2007) o la vitamina B12 (Kinross y col. 2011) que benefician al huésped.

La microbiota intestinal humana está presente en una concentración aproximada de  $10^{11}$ - $10^{12}$  microorganismos por gramo de peso húmedo de heces (Suau y col. 1999), y constituye aproximadamente 1,5 kg de la biomasa de una persona adulta (Faa y col. 2013). De hecho, en términos absolutos de número de células, las personas somos aproximadamente un 10% humanos y un 90% bacterias (Xu y Gordon 2003). Se estima que la microbiota intestinal la forman más de 500 especies bacterianas, aunque aún se desconoce la cifra exacta, ya que menos del 30% de ellas han podido ser cultivadas con las metodologías actuales. Por ello se utilizan otras técnicas moleculares como la DGGE, la TGGE, la FISH, la secuenciación del ADNr 16S o técnicas de secuenciación masiva para conocer la composición de la microbiota fecal (Mai y Morris 2004). Estas técnicas están siendo utilizadas para, además de conocer la composición, estudiar la dinámica de esta compleja comunidad, como puede ser los cambios que sufre según la edad o la dieta del organismo huésped, o los cambios asociados al estrés o a algún tipo de enfermedad.

## 1. Introducción

---

El proceso de colonización del intestino, así como de otras partes del cuerpo como la piel o la boca, por parte de las bacterias que formarán la microbiota es complejo y dinámico, empieza en el nacimiento y evoluciona a lo largo de la vida del organismo. En un primer momento, dentro del vientre materno, el sistema digestivo de un bebé es estéril. En el momento en el que atraviesa el canal del parto y nace, el feto recibe el primer inóculo, que consiste fundamentalmente en *Lactobacillus* spp. y *Prevotella* spp., de la microbiota vaginal de su madre (Donders y col. 2011) y en menor medida *Bacteroides* spp. (Reid 2004). Posteriormente a través de la lactancia adquirirá bacterias anaerobias estrictas como *Bifidobacterium* spp. y finalmente ganará importancia la microbiota que provenga de las interacciones con el ambiente, originando así una microbiota más individualizada que evolucionará con el organismo a lo largo del tiempo (Faa y col. 2013). Durante los tres primeros años de edad se asienta la configuración de la microbiota intestinal del hombre (Koenig y col. 2011), y los géneros predominantes que la forman son *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* y *Fusobacterium* (Matsuki y col. 2002). A lo largo de la vida del individuo la complejidad de la microbiota aumenta, y su composición fluctúa, y algunos géneros reducen su presencia, como es el caso de las bifidobacterias (Blaut y col. 2002; Macfarlane y Macfarlane 1997).

En cuanto a la dieta, se ha comprobado que, en general, las costumbres alimentarias (según la zona geográfica) como la variación de los nutrientes ingeridos puede influenciar la composición de la microbiota intestinal (Finegold y col. 1974; Hentges 1980; Hill 1981). Es más, con una misma alimentación se ha observado una variabilidad entre la microbiota de los individuos, que puede ser debida a la composición de una microbiota subyacente y/o a diferencias genéticas (Mai y Morris 2004).

Igual que para los humanos, la microbiota del tracto intestinal de los animales es fundamental para su salud y desarrollo. Por ejemplo, en el caso de los rumiantes, como las vacas, existe un gran número de bacterias con celulasas en el rumen para degradar la celulosa de las plantas que ingieren, ya que ellos, por sí solos, no pueden generar este tipo de enzimas. De la fermentación de la celulosa y hemicelulosas el animal obtiene entre el 60% y el 80% de su requerimiento energético (Bergman 1990). Las bacterias que componen la microbiota de los rumiantes corresponden a seis filos: *Firmicutes* (51,9%) (familias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Erysipelotrichaceae* y *Clostridiaceae*), *Bacteroidetes* (30,9%) (*Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. ovatus* y *B. xylanisolvens*), *Proteobacteria* (11,1%) (*Proteus*, *Aeromonas*, *Escherichia/Shigella*), *Actinobacteria*

(3,5%) (familias *Actinomycetaceae*, *Micrococcineae*, *Propionibacteriaceae*, *Bifidobacteriaceae* y *Coribacteriaceae*), *Synergistetes* (1,5%) y *Fusobacteria* (1,1%) (Ziemer 2013). Y, al igual que en los humanos, su composición también varía según el tipo de alimentación (Petri y col. 2013).

En el caso de los cerdos, estos animales presentan una microbiota intestinal similar a la de los humanos, pero mientras que en las personas predominan las bacterias del filo *Bacteroidetes* seguidas por las bacterias del filo *Firmicutes*, en el caso de los cerdos es al contrario, encontrándose por este orden *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacterium*. Los géneros predominantes en la microbiota del tracto intestinal del cerdo son *Prevotella*, *Coprococcus*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Propionobacterium*, *Bacteroides*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio*, y *Peptostreptococcus* (Isaacson y Kim 2012).

En lo relativo a las aves de corral, como gallinas o pavos, éstos poseen, en relación con el tamaño corporal, un tracto gastrointestinal mucho más corto que los mamíferos, por lo que la ingesta lo atraviesa rápidamente, y además otra de sus características es que su temperatura corporal ronda los 42°C (Bolzani y col. 1979). Todo ello hace de la microbiota un elemento fundamental para la digestión de los alimentos. Los géneros predominantes en la microbiota de las aves de corral son *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Escherichia coli* (Pan y Yu 2013).

### 1.2.2. Microorganismos indicadores

Puesto que la detección y cuantificación de los microorganismos patógenos es complicada y, por lo general, costosa, a fin de determinar la presencia de contaminación fecal en el agua, y por tanto la potencial presencia de patógenos de transmisión fecal, se utilizan microorganismos indicadores. Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe presentar las siguientes características ideales (Hurst y col. 2007):

- no ser patógeno
- estar presente de forma constante en heces
- ser incapaz de multiplicarse fuera del tracto gastrointestinal
- presentar una persistencia similar a los patógenos, a las condiciones ambientales y a la desinfección
- estar relacionados con la presencia de microorganismos patógenos

## 1. Introducción

---

- detección y enumeración fácil y rápida mediante metodologías sencillas y baratas

Los primeros microorganismos indicadores utilizados fueron los coliformes totales y los estreptococos fecales (American Public Health Association 1971). Posteriormente se empezaron a utilizar microorganismos indicadores alternativos como *E. coli*, enterococos y *Clostridium perfringens* (Griffin y col. 2001).

En el caso de la calidad del agua para el consumo humano, el Real Decreto 140/2003 y su actualización, la Orden SCO/778/2009, establecen un valor aceptable de 0 UFC por cada 100 ml de *E. coli*, enterococos y *Clostridium perfringens*. En este ámbito se incluyen las aguas para beber, cocinar, preparar alimentos, higiene personal, otros usos domésticos y las utilizadas en la industria alimentaria (fabricación, tratamiento, limpieza de superficies, etc.).

Existen diversos problemas al utilizar estos microorganismos como indicadores de la contaminación fecal ya que no siempre cumplen con los criterios necesarios para ser indicadores idóneos. Por ejemplo, la ecología, la prevalencia y la resistencia al estrés de los coliformes difiere de algunos de los microorganismos patógenos a los que en teoría representa (Desmarais y col. 2002; Sobsey y col. 1990), *E. coli* puede replicarse en suelos contaminados (Solo-Gabriele y col. 2000) y los enterococos tienen reservas ambientales donde son capaces de multiplicarse e introducirse de nuevo en el ambiente (Desmarais y col. 2002; Sobsey y col. 1990).

Otro de los problemas principales que presentan algunos indicadores es el hecho de que se les puede relacionar tanto con la microbiota intestinal humana como con la de animales de sangre caliente (Orskov y Orskov 1981). En el caso de que haya relación entre un determinado microorganismo con contaminación fecal humana y animal limitaría (aunque no elimina) su aplicación como indicador, ya que no permitiría determinar si el aporte es humano y/o animal y, por lo tanto, desconocer el impacto y riesgos sanitarios derivados de dicha contaminación. Conocer cuál es la fuente contaminante es imprescindible para poder actuar directamente sobre ella y conocer el impacto y los riesgos sanitarios que conlleva. Por ello, es necesario desarrollar nuevas metodologías capaces de solventar estos inconvenientes y poder discriminar el origen de la contaminación fecal. Respecto a la remediación de zonas contaminadas, conocer el origen de la contaminación permitiría gestionar y mitigar la contaminación en su origen y

así recuperar con mayor eficiencia las zonas afectadas, tomar las medidas legales necesarias y establecer responsabilidades económicas.

El concepto de que el origen fecal de la contaminación pueda ser identificado usando métodos microbiológicos, genotípicos, fenotípicos y químicos se denomina *fecal source tracking*.

### 1.3. Determinación del origen de la contaminación fecal (*Fecal Source Tracking*)

El *fecal source tracking* contempla diferentes metodologías para poder discriminar el origen de la contaminación fecal. Éstas incluyen métodos basados en parámetros químicos o microbiológicos.

#### 1.3.1. Métodos químicos

##### **Cafeína**

La cafeína es un compuesto asociado a ciertas bebidas como el café, té o refrescos y a muchos productos farmacéuticos. Su presencia en el agua puede indicar que ha habido contaminación fecal humana ya que se excreta por la orina de los individuos que la han consumido (Burkhardt 1999). Se estima que la vida media de la cafeína expuesta a luz natural es de 12 días, pero aún existen muchas dudas sobre su persistencia en el ambiente y dónde se deposita (Buerge y col. 2003).

##### **Esteroles y estanoles fecales**

Los estanoles fecales se originan en el intestino de los animales, es un producto del metabolismo de los esteroides. La concentración de los metabolitos finales varía según la dieta y la microbiota intestinal de cada grupo animal (Leeming y col. 1996). En humanos el esteroide predominante es el colesterol y se metaboliza en  $5\beta$ -estanol (coprostanol). Representa el 60% de los estanoles en el intestino humano (MacDonald y col. 1983). En cambio, el porcentaje de coprostanol en heces no humanas es menor. La materia fecal de animales herbívoros, como vacas, caballos u ovejas, contiene una mayor cantidad de  $5\beta$ -campestanol y  $5\beta$ -stigmastanol, productos del metabolismo de los esteroides campesterol y sitosterol respectivamente, ambos muy abundantes en la dieta de los herbívoros (Leeming y col. 1996). Debido a estas diferencias se han establecido ratios de concentraciones de estanoles representativas de diferentes orígenes fecales (Grimalt y col. 1990). A pesar de ello, las medidas directas de la concentración de coprostanol

pueden comportar conclusiones erróneas debido a su aparente ubicuidad, puede encontrarse en grandes cantidades tanto en suelos como en sedimentos (Bull y col. 2002), y a su tendencia a degradarse en ambientes anaerobios (una vida media de 10 días a 20°C) (Isobe y col. 2004). En un estudio europeo donde se compararon diferentes metodologías se observó que se produjeron una cantidad significativa de clasificaciones erróneas de muestras, por lo que se recomendó no utilizar este método de manera exclusiva en la discriminación de la fuente contaminante (Blanch y col. 2006).

### **Productos farmacéuticos y de cuidado personal**

La detección de estos compuestos indica una contaminación exclusivamente humana, ya que no se encuentran de manera natural en el ambiente (Leeming y Nichols 1996). Por ejemplo, se detecta la presencia de productos como ibuprofeno (Buser y col. 1999), carbamazepina, para tratar la epilepsia y desórdenes bipolares (Clara y col. 2004), propranolol, un  $\beta$ -bloqueante (Fono y Sedlack 2005) o triclosan, presente en muchos jabones, detergentes, desodorantes, etc. (Weigel y col. 2004), entre otros. La principal ventaja es su especificidad, puesto que, como se ha dicho anteriormente, sólo están relacionados con la presencia humana, pero aún existen muchos inconvenientes, como que aún no existen protocolos estandarizados para su detección, el alto coste del equipo e instalaciones necesarios, aún no está clara la correlación que existe con los riesgos sanitarios y las bacterias indicadoras de contaminación fecal, y se desconoce las posibles interacciones, la degradación y la persistencia de estos compuestos con diferentes matrices (Hagedorn y Weisberg 2009).

### **Agentes blanqueadores y detergentes**

Estos compuestos orgánicos están presentes en los detergentes para blanquear la ropa y en otros productos como el papel higiénico. El agua sobrante de los lavados se junta con la residual en las cañerías de los hogares, y por ello estos compuestos están vinculados con la contaminación fecal humana. Se pueden detectar tanto en los sistemas sépticos (Boving y col. 2004) como en aguas no tratadas (Poiger y col. 1998). Las principales ventajas son que la presencia de estos compuestos está vinculada a la contaminación humana, ya que no se encuentran de manera natural en el ambiente, los resultados se obtienen rápidamente, la metodología es relativamente sencilla y se puede usar a escala global. Las principales desventajas son los límites de detección, ya que el factor de dilución de grandes masas de agua implicaría que no se pudieran detectar, y además existen potenciales interferencias de factores desconocidos (Hagedorn y Weisberg 2009). Por ello se recomienda su uso conjuntamente con otros métodos para la discriminar la contaminación de origen fecal humana.

### 1.3.2. Métodos microbiológicos

Cuando se aplican métodos microbiológicos para detectar el origen de la contaminación, se habla de *Microbial Source Tracking* (MST) (Tabla 3). Particularmente, las metodologías de MST se han enfocado a encontrar microorganismos capaces de discriminar el origen de la contaminación fecal. Se asume que estos microorganismos relacionados con el tracto gastrointestinal de cada uno de los huéspedes son diferentes unos de otros debido a las condiciones intestinales (temperatura, dieta y sistema digestivo) de cada hospedador, a la selección natural (espacio disponible y nutrientes), y a que la progenie producida por subsiguientes replicaciones es genéticamente idéntica (Scott y col. 2002; USEPA 2005a). Por lo tanto, un grupo de microorganismos relacionados con un huésped particular en un ambiente determinado deben ser similares o idénticos; así mismo deben diferir de aquellos adaptados a otros huéspedes o ambientes.

Entre los propuestos, algunos son dependientes de una biblioteca genómica que debe ser realizada previamente a la aplicación del método. Los resultados obtenidos por el método dependiente de librería generan información por comparación con la librería que nos da información sobre la diversidad del microorganismo diana en una zona geográfica concreta y para un origen fecal determinado. Por el contrario, los métodos independientes de librería no requieren el desarrollo de una librería genética previa para poder obtener información sobre el origen de la contaminación de una determinada muestra.

**Tabla 3.** Métodos más comunes de MST (adaptación de USEPA 2011).

Librería-dependiente		Librería-independiente	
Cultivo-dependiente		Cultivo-independiente	
Fenotípico	Genotípico	Fenotípico o Genotípico	Genotípico
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resistencia a antibióticos (ARA)</li> <li>• Uso de fuentes de carbono (CUP)</li> <li>• Phene System</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR múltiple (rep-PCR)</li> <li>• Electroforesis en campo pulsado (PFGE)</li> <li>• Ribotipado</li> <li>• Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE)</li> <li>• Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacteriófagos</li> <li>• Cultivo bacteriano</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR de bacterias</li> <li>• PCR de ADN mitocondrial</li> <li>• PCR de virus</li> <li>• qPCR</li> </ul>

### 1.3.2.1. Métodos dependientes de librería

#### 1.3.2.1.1. Métodos fenotípicos

##### **Resistencia a antibióticos (ARA: *Antibiotic Resistance Analysis*)**

Este método se basa en la premisa de que las bacterias de la microbiota intestinal están sometidas a una presión selectiva debido al consumo de antibióticos por el organismo hospedador (USEPA 2005a). Se espera que las bacterias de la microbiota humana posean una mayor resistencia a antibióticos determinados que la de los animales, la cual debería presentar una mayor sensibilidad y distinta a los antibióticos de mayor uso comercial (Simpson y col. 2002). Las bacterias son aisladas, replicadas y posteriormente se hacen crecer en una batería de medios que contengan distintas concentraciones de un antibiótico concreto o con una concentración establecida de diferentes antibióticos. Los patrones de resistencia desarrollados y los de las bacterias aisladas de orígenes conocidos se comparan para crear modelos predictivos con el fin de poder clasificar las muestras de fuentes desconocidas. Es un método muy utilizado en estudios de MST por su rapidez, sencillez y por ser relativamente económico. Algunos de los problemas que presenta son que algunos escenarios son difíciles de interpretar, especialmente si la contaminación fecal proviene de distintos organismos hospedadores (Simpson y col. 2002), y que la resistencia a antibióticos es susceptible a una transferencia horizontal entre cepas, como por ejemplo mediante plásmidos, transposones o bacteriófagos (Colomer-Lluch y col. 2011; Scott y col. 2002).

##### **Uso de fuentes de carbono (CUP: *Carbon Utilization Profile*)**

Este método se basa en determinar las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que utiliza cada cepa bacteriana para conseguir energía y multiplicarse. El uso de cada sustrato se puede determinar, por ejemplo, de manera colorimétrica. Gracias a las bases de datos se pueden comparar los patrones de las cepas problema con aquellas ya conocidas y aisladas de muestras de origen conocido. La metodología es sencilla, rápida y no requiere una gran formación del personal. El problema que presentan las muestras ambientales de origen desconocido y/o mixto es que los requerimientos nutricionales de las bacterias pueden verse condicionados y originar una mala clasificación (Griffith y col. 2003).



### **Phene System**

Este es un método sencillo que permite obtener la caracterización bioquímica de las bacterias aisladas de muestras de agua y así elaborar los perfiles de la flora característica de los diversos orígenes. La diversidad que presenta cada muestra proporciona información sobre los grupos de bacterias que son características de la muestra en concreto y cuáles son alóctonas. Toda esta información permite establecer matemáticamente la relación que existe entre distintos cuerpos de agua y si se ha producido un aporte de un cuerpo a otro (Kühn y col. 1991). Esta metodología se ha aplicado con éxito en diversos estudios para el análisis de poblaciones y MST (Blanch y col. 2006; Casanovas-Massana y Blanch 2013).

#### **1.3.2.1.2. Métodos genotípicos**

##### **PCR múltiple (rep-PCR: *Repetitive Extragenic Palindromic PCR*)**

En esta técnica se amplifica por PCR ciertas porciones de ADN que aparecen repetidas en el genoma bacteriano. Posteriormente los fragmentos amplificados son separados por electroforesis en geles de agarosa. Cada cepa tiene un patrón de bandas o *fingerprint* único. Las bacterias de muestras desconocidas que presentan el mismo patrón que una bacteria de la librería de origen conocido se consideran la misma cepa y se determina así su origen. Fundamentalmente esta técnica se basa en el estudio de tres elementos: REP (35-40 pb), ERIC (124-127 pb) y BOX (154 pb) (Versalovic y col. 1994). El método es sencillo y rápido, pero moderadamente caro dado que se necesita un equipo específico y una gran librería para poder distinguir las diversas cepas y orígenes.

##### **Electroforesis en campo pulsado (PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)**

A partir de un cultivo puro se extrae y se purifica el ADN y se digiere mediante enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes se cargan en un gel específico para la electroforesis. Este gel se somete a un campo eléctrico que se orienta en diferentes direcciones durante distintos períodos de tiempo y a distintos voltajes, lo cual permite que los fragmentos se orienten en un patrón de bandas único para cada cepa bacteriana. Esta metodología requiere un equipo específico, personal cualificado, mucho tiempo y es relativamente cara. A pesar de que se ha utilizado ampliamente para la identificación de aislamientos bacterianos en clínica, y también en numerosos estudios epidemiológicos (Cardenas y col. 2013; Ma y col. 2013), no está clara su aplicabilidad al MST, ya que se necesitaría una base de datos muy extensa para poder comparar los resultados. Uno de los laboratorios que poseen una gran base de datos para el estudio de MST es el *Institute*

for *Environmental Health* (IEH), situado en Seattle, Washington, con unos 50.000 patrones de cepas de *E. coli* (USEPA 2011).

### **Ribotipado**

Mediante esta técnica se estudian los patrones de bandas del gen que codifica el 16S ARNr. Para ello se extrae el ADN genómico total de cultivos puros y se digiere mediante enzimas de restricción. Los fragmentos se cargan en geles de agarosa para su electroforesis. Posteriormente se transfieren a membranas de nylon que se analizarán por hibridación *Southern Blot* usando sondas que detectan específicamente el ADNr. El patrón de bandas generado es único para cada cepa bacteriana y específico de cada área geográfica, lo que implica poder disponer de una gran base de datos para cada zona. Esto resulta laborioso y relativamente costoso. Esta metodología se ha aplicado ya en estudios de MST para diferenciar cepas de *E. coli* específicas de hombre de orígenes no humanos (Carson y col. 2003; Parveen y col. 1999).

### **Electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)**

Permite discriminar productos de PCR con tamaño similar según su secuencia. Se somete al ADN a una electroforesis en un gel de acrilamida al que se le aplica un voltaje constante y un gradiente creciente desnaturizante de urea y formamida (Fischer y Lerman 1979). Cada fragmento de doble cadena de ADN llega un momento en que se desnaturaliza y se detiene en el gel (*melting domain*), de modo que cada secuencia de ADN deja un patrón de bandas diferente según su composición nucleotídica. Esta metodología se puede utilizar tanto para analizar la composición de bandas de cepas puras como para el estudio de poblaciones microbianas (Myzer y col. 1993). La elaboración del gel es compleja, requiere material específico y requiere unas veinte horas hasta poder observar los resultados. Esta metodología se ha utilizado tanto para estudiar comunidades bacterianas como para determinar cepas asociadas a un huésped concreto y así poder trazar el origen de la contaminación fecal (Ballesté y Blanch 2011).

### **Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados (AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*)**

Esta metodología se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción que provienen de la digestión del ADN genómico total. Generalmente se obtienen fragmentos de entre 50 y 100 pb que se analizan por electroforesis en geles de gradiente desnaturizante de poliacrilamida (Vos y col. 1995). Este sistema permite analizar los polimorfismos de un genoma y, además, es altamente reproducible. Sin embargo, no deja

de ser un sistema que dependa del cultivo individual de los microorganismos de la muestra de la que se quiere identificar el origen.

### 1.3.2.2. Métodos independientes de librería

#### Enumeración de bacteriófagos para MST

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Se estima que hay en el mundo alrededor de  $10^{31}$ , lo cual los convertiría en los microorganismos más abundantes del planeta. La abundancia de los fagos sugiere que podrían ser útiles en estudios de MST. Éste es el caso de los bacteriófagos que infectan determinadas cepas de bacterias asociadas a un huésped. Estas bacterias normalmente son microorganismos comensales de la microbiota intestinal del huésped.

La mayoría de los bacteriófagos permanecen viables en el ambiente durante períodos de tiempo largos, en ocasiones más que las bacterias huésped, por lo que es posible detectarlos en una muestra con contaminación fecal mediante métodos de cultivo o moleculares. Los bacteriófagos fueron propuestos por primera vez como indicadores alternativos de la contaminación fecal en 1948 (Guelin 1948) y desde entonces han sido utilizados en muchos estudios como indicadores de contaminación fecal y/o viral (Grabow 2001; Jofre y col. 2011).

Dado que su estructura es similar a la de los virus entéricos, constituyen una buena herramienta para establecer un modelo aproximado de su persistencia en modelos ambientales y, lo que es más importante, su comportamiento ante procesos de tratamiento y desinfección de virus patógenos (Grabow 2001; Jofre y col. 2011). Por el momento, se han propuesto tres grupos de bacteriófagos como indicadores de la contaminación fecal. Los colifagos somáticos, los fagos F-específicos de ARN y los bacteriófagos que infectan *Bacteroides*. Las principales familias de virus que forman parte de los bacteriófagos son *Myoviridae*, *Microviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* en lo que concierne a los colifagos somáticos; *Leviviridae* e *Inoviridae* en cuanto a los fagos F-ARN; y en lo que concierne a los bacteriófagos que infectan cepas de *Bacteroides* spp. predomina la familia *Siphoviridae*, virus con cola flexible y ligeramente curvada, mayoritariamente (Jofre y col. 2011).

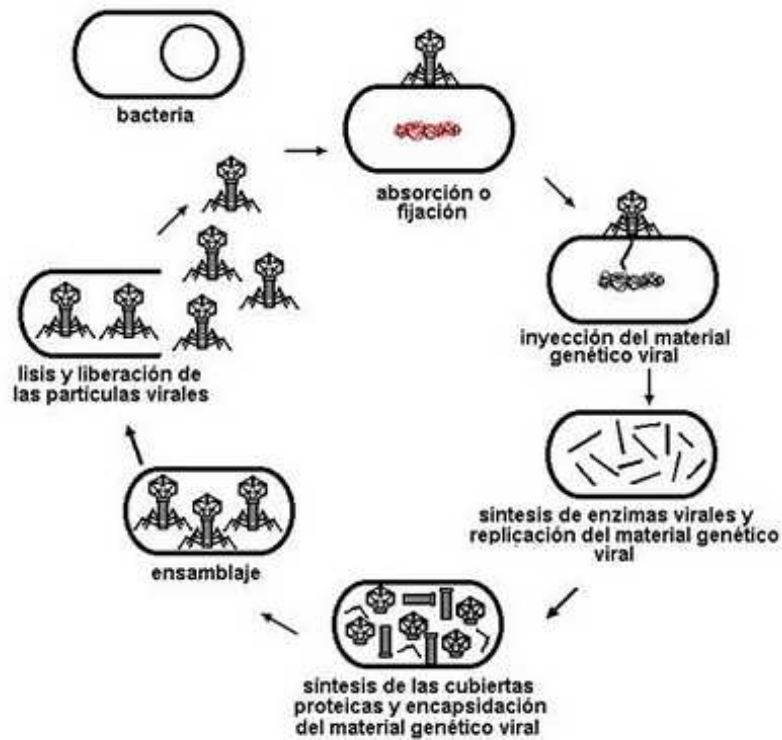
Una de las técnicas principales para su detección es la denominada metodología de la doble capa o titulación (Adams 1959). Esta técnica se basa en la capacidad de los fagos virulentos de infectar las bacterias huésped y desarrollar un ciclo lítico (Figura 1),

## 1. Introducción

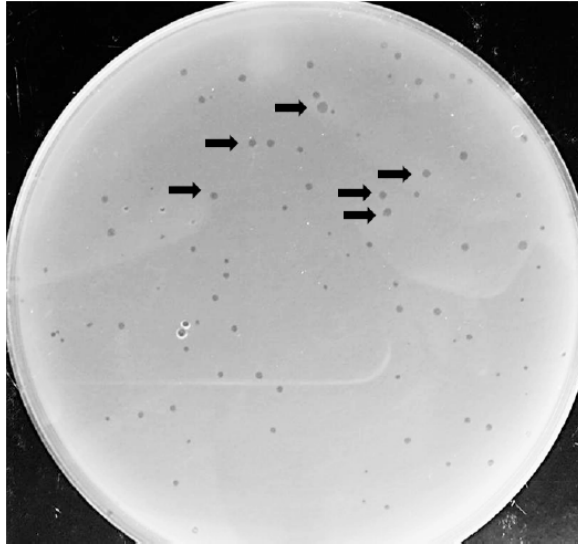
es decir, de lisar a las bacterias cuando se propagan. Se puede observar en una placa las calvas de lisis (Figura 2) donde la bacteria huésped crece por toda la superficie excepto donde un fago se ha propagado, que se observa la zona de lisis generada, que recibe el nombre de calva de lisis. Cada calva de lisis equivale a una unidad formadora de calva de lisis (ufp), de modo que además de ver que la bacteria es susceptible de infección se puede contabilizar el número de fagos que hay en la muestra estudiada.

**Figura 1.** Esquema del ciclo lítico de un bacteriófago

(<http://biologiamedica.blogspot.com.es/2010/09/los-virus-ciclo-litico-y-lisogenico.html>).



**Figura 2.** Aspecto de las calvas de lisis producidas por bacteriófagos líticos sobre la cepa GA17 de *B. thetaiotaomicron* mediante la metodología de la doble capa (Gómez-Doñate y Muniesa en prensa).



Los colifagos somáticos es un método robusto y por ello se usan como indicadores de contaminación fecal, sin embargo no permiten discernir el origen de dicha contaminación fecal. Por ese motivo sólo se han propuesto dos grupos de bacteriófagos en estudios de MST: los colifagos F-específicos de ARN y los bacteriófagos que infectan cepas específicas de *Bacteroides*. Algunos estudios también sugieren los fagos que infectan a cepas de *Enterococcus*, sin embargo el bajo número de fagos que infectan a *Enterococcus* dificulta enormemente su aplicación en MST (Toranzos y col. 2006).

#### Colifagos F-específicos de ARN

Los fagos que infectan cepas de *E. coli* son conocidos como colifagos. Los colifagos somáticos (SOMCPH) las infectan a través de receptores de membrana, mientras que los F-específicos lo hacen por los receptores F del pili. Los colifagos F-ARN específicos son fagos de ARN del grupo *Leviviridae* que infectan a través de los receptores F del pili. Los fagos ARN F-específicos están subdivididos en cuatro genotipos (Hsu y col. 1995) y éstos se utilizan para MST ya que los genotipos II y III están mayoritariamente asociados a orígenes fecales humanos, mientras que los I y IV a animales (Havelaar y col. 1986; Jofre y col. 2011). En la actualidad existen diferentes métodos rápidos para la detección de los colifagos, como un test de aglutinación (Love y Sobsey 2007), reacciones colorimétricas (Ijzerman y Hagedorn 1992) o PCRs (Friedman y col. 2009; Kirs y Smith 2007). Sin embargo, la detección de los genotipos sigue

dependiendo de métodos moleculares como la hibridación de calvas de lisis o *Plaque blot* o por técnicas de PCR.

### Bacteriófagos que infectan *Bacteroides*

Los bacteriófagos que infectan cepas de *Bacteroides*, por sus características morfológicas y genómicas, pertenecen, la mayoría, a la familia *Siphoviridae* (Jofre y col. 2011). Los *Bacteroides* son bacterias anaerobias estrictas que forman parte de la microbiota intestinal de los humanos y otros animales homeotermos. Estas características impiden que los *Bacteroides* se repliquen en el ambiente, lo cual provoca que los fagos que las infectan tampoco se multipliquen fuera del ambiente gastrointestinal (Tartera y Jofre 1987). Esto apoya la teoría de una posible coevolución de los fagos de *Bacteroides* y sus bacterias huésped de origen (Xu y col. 2003).

Una de las primeras cepas de *Bacteroides* propuestas para la detección de fagos y asociada a contaminación fecal humana fue *Bacteroides fragilis* HSP40 (Tartera y Jofre 1987). El problema que presentó dicha cepa fue que su efectividad se restringía a la zona del Mediterráneo, y algún caso en Sud-África, pero no en el norte de Europa ni en EEUU, además presentaba otra limitación que consistía en que detectaba números de fagos muy bajos en algunos tipos de agua. Más adelante, investigadores del mismo grupo (Puig y col. 1999) encontraron dos nuevas cepas de *B. fragilis*, aisladas a partir de muestras hospitalarias, con capacidad de detectar fagos en aguas con contaminación fecal. De estas dos, la cepa RYC2056 se ha usado en repetidas ocasiones en ensayos tendientes a estudiar su utilidad como indicador de la contaminación fecal debido a que presenta significativamente mayor sensibilidad que otras cepas probadas con anterioridad en la detección de mayor número de fagos en aguas contaminadas. A pesar de todo, esta cepa no ha resultado ser útil en la discriminación de la fuente contaminante, ya que no hay diferencias significativas entre el número de fagos que detecta en aguas residuales de origen humano y animal (Blanch y col. 2004).

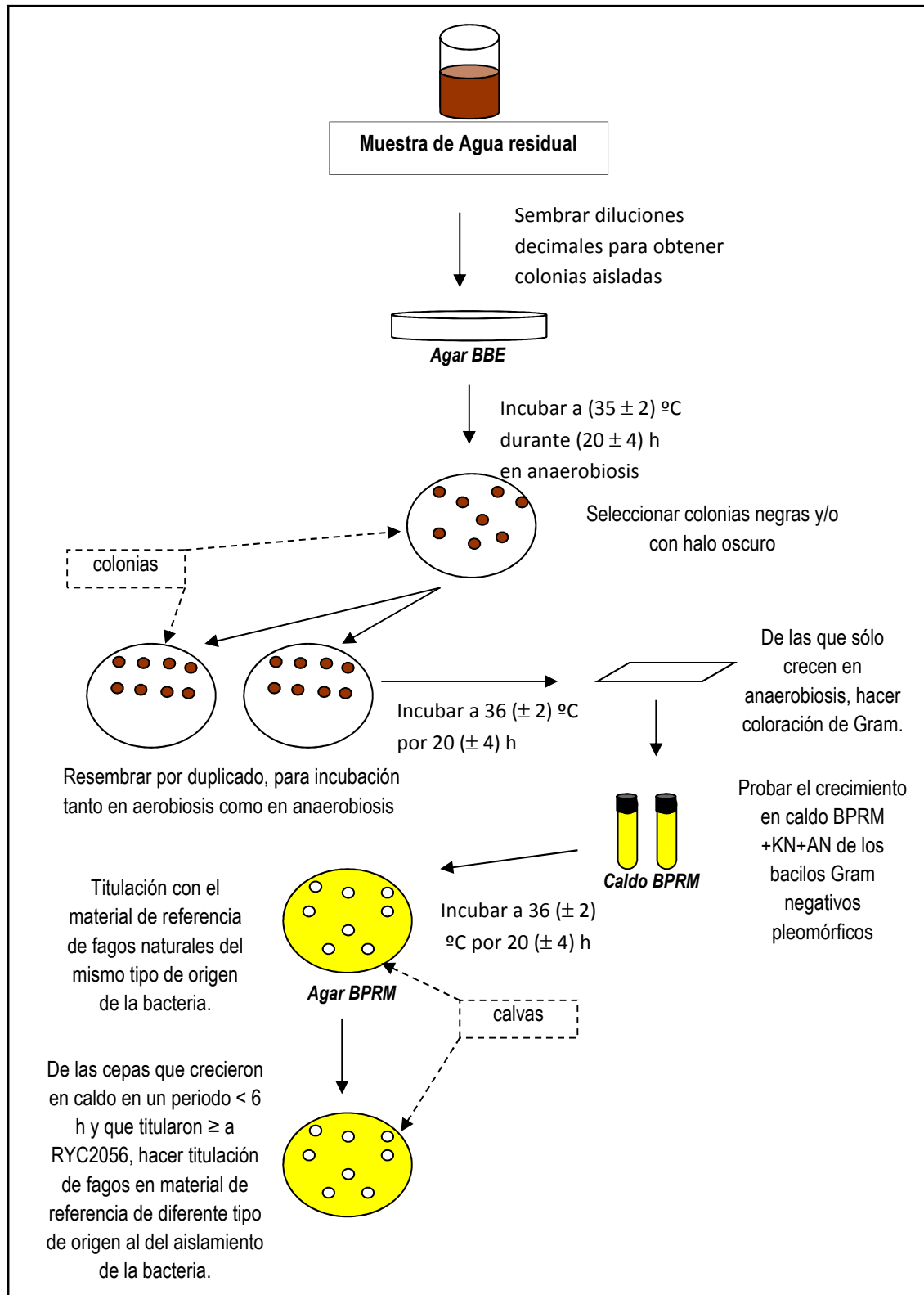
Posteriormente se propuso un nuevo método para el aislamiento de cepas de *Bacteroides* específicas de huésped (Figura 3) y se aisló una nueva cepa de origen humano, *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17, la cual presentaba efectividad en el aislamiento de fagos de diferentes orígenes, presentando una mayor distribución geográfica (Payan y col. 2005). Sin embargo, aún existen zonas geográficas en las que su sensibilidad en la detección de fagos en aguas residuales humanas es menor que en la zona de Barcelona, como es el caso de Inglaterra (Blanch y col. 2006).

A pesar que los colifagos somáticos (SOMCPH) no son útiles para determinar el origen de la contaminación, si que sirven como referencia de los niveles de contaminación. Así, es necesario saber si una muestra negativa para fagos de *Bacteroides* lo es por no ser de un origen determinado o lo es por presentar niveles de contaminación fecal muy bajos. La combinación de los fagos de *Bacteroides* con los SOMCPH en ratios fagos de *Bacteroides*/SOMCPH podría resultar ser una herramienta muy útil para resolver casos de muestras de carga fecal mixta, como la ratio entre los fagos de la GA17 y los SOMCPH (Muniesa y col. 2012).

La detección y enumeración de los bacteriófagos puede llevarse a cabo mediante técnicas simples y asequibles, que no constituyan ningún peligro para la salud y pueden llevarse a cabo en un laboratorio de microbiología básico y a un coste muy bajo.

## 1. Introducción

**Figura 3.** Esquema general de la metodología para el aislamiento de *Bacteroides* spp. para ser empleadas en la determinación del origen de la contaminación fecal. KN: Kanamicina; AN: Ácido Nalidíxico (Payán 2006).





## Cultivo de bacterias para MST

### Enterococcus spp.

Son cocos Gram-positivos que pertenecen al subgrupo de estreptococos fecales. Una de las primeras aproximaciones para identificar el origen de la contaminación fecal del agua fue el cociente entre coliformes fecales y enterococos (CF/EF) (Feachem 1975; Geldreich y Kenner 1969). Cuando el cociente es superior a 4, la contaminación se relacionaba con un posible origen humano, mientras que si es menor de 0,7, con animales. Esta primera aproximación se vio rebatida cuando se cuestionó la diferente viabilidad de los dos grupos bacterianos en el ambiente (Jagals y Grabow 1996) y la diferente capacidad de crecimiento en diferentes ambientes (Sinton y col. 1998). Con mayor actualidad, se han propuesto algunos nuevos métodos como cepas de enterococos como diana de MST en estudios dependientes de bases de datos (Wiggins 1996), *Enterococcus faecalis* se ha utilizado como marcador de contaminación aviar y humana (Kuntz y col. 2004; Wheeler y col. 2002) aunque en estudios posteriores se comprobó que también estaba asociado a heces de otros animales (Ryu y col. 2012), y la detección del gen *esp* que codifica para una proteína de membrana la cual se asocia a contaminación de origen humano (Scott y col. 2005).

### Bacteroidales

Son el grupo de bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas y estrictamente anaerobias, lo cual impide su multiplicación en el medio ambiente. Este orden engloba los géneros *Bacteroides*, *Prevotella* y *Parabacteroides*. *Bacteroidales* constituye, junto con los *Firmicutes*, la microbiota predominante en el intestino de los animales de sangre caliente como humanos, vacas, ovejas, cerdos o aves de corral (Eckburg y col. 2005; Ley y col. 2008; Lu y col. 2007; Shanks y col. 2011), aunque en estas últimas son menos abundantes (Kelty y col. 2012; Lu y col. 2008). La composición de dicha microbiota intestinal también puede variar según la dieta o la edad del animal. La detección de bacterias viables en una muestra ambiental significa, dada su baja viabilidad, que el aporte fecal al ambiente ha sido muy reciente (Tambalo y col. 2012). Algunas de estas bacterias, como cepas de *Bacteroides*, se aíslan de orígenes conocidos y se utilizan como bacteria huésped en ensayos de bacteriófagos como se comenta anteriormente (Payan y col. 2005). También existen metodologías que utilizan estas bacterias como diana, como ensayos de PCR y qPCR que detectan el ARNr 16S (Bernhard y Field 2000; Okabe y col. 2007) entre otros. Más adelante el género *Bacteroides* se desarrolla más extensamente.

## 1. Introducción

---

### *Bifidobacterium* spp.

Un género que engloba bacilos Gram-positivos y anaerobios estrictos, lo cual impide su multiplicación en el medio ambiente. Forman parte de la microbiota intestinal tanto de humanos como de otros animales, así como el orden *Bacteroidales*, pero menos abundantes. Fueron propuestos por primera vez como microorganismos indicadores de la contaminación fecal humana en 1983 (Mara y Oragui 1983). Unas especies que se asocian a contaminación humana son *Bif. adolescentis* y *Bif. dentium*, las cuales tienen capacidad para fermentar el sorbitol, a diferencia de las especies asociadas a animales, como *Bif. saeculare* a aves de corral o *Bif. pseudolongum* a bovino (Ballesté y Blanch 2011). Esta característica se puede observar mediante el medio selectivo y diferencial para las especies fermentadoras de sorbitol Human Bifidobacteria Sorbitol-fermenting Agar (HBSA). Para aislar *Bifidobacterium* spp. del medio ambiente es necesario el uso de medios de cultivo complejos para poder satisfacer todos sus requerimientos nutricionales, su cultivo es lento y en anaerobiosis (Nebra y Blanch 1999), cosa que complica su manipulación en el laboratorio. Dada su baja persistencia medioambiental, la presencia de dichas bacterias en una muestra indica que la contaminación fecal del agua ha sido reciente. Este género se describe en más detalle en próximos apartados.

### *Rodococcus coprophilus*

Bacteria aerobia, no motil, no formadora de esporas y Gram-positiva que pertenece al filo *Actinobacteria* (Rowbotham y Cross 1977a; Rowbotham y Cross 1977b). Fue uno de los primeros actinomicetos en ser propuestos como microorganismos indicadores en MST como trazadores de la contaminación fecal de herbívoros, ya que se encuentran asociados a sus heces, y no se encuentran en otros organismos como los humanos (Mara y Oragui 1981; Oragui y Mara 1983). Su persistencia en el medio acuático y en los sedimentos es muy elevada, ya que pueden permanecer viables unas 17 semanas, al contrario que otros microorganismos indicadores como los enterococos fecales, por lo que su presencia en las muestras no implica que el aporte fecal haya sido reciente y por ello es necesario otro indicador que lo confirme (Sinton y col. 1998). Los métodos para su recuperación y enumeración son lentos y complejos, ya que pueden requerir entre 16 y 21 días (Mara y Oragui 1981).

### **Ensayos de PCR específicos para la detección de bacterias**

Se han desarrollado varias técnicas para la extracción, amplificación y análisis del ADN bacteriano mediante PCR. La PCR convencional permite conocer la presencia o ausencia del ADN específico de un origen contaminante o varias fuentes. Algunas de las

bacterias principales detectadas por este método son *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*.

Las técnicas de PCR presentan ciertas ventajas para la detección de aquellos géneros bacterianos que resultan difíciles de detectar por métodos cultivables. Por ejemplo, *Bacteroides* spp. presenta una baja supervivencia en el medio ambiente dado que es una bacteria anaerobia estricta, por lo que su detección por cultivo bacteriano puede resultar compleja. Por ello se han diseñado numerosas PCRs para detectarla, muchas de ellas tienen por diana el gen que codifica el ARNr 16S (Bernhard y Field 2000), ya que cada célula contiene varias copias, lo cual mejora la su detección en muestras ambientales, y además contiene regiones que permiten discriminar la muestra hasta el nivel de subespecie. Otro ejemplo lo encontramos en el caso de *Bifidobacterium* spp. En varios estudios se escogieron dianas de las cepas *Bif. adolescentis* y *Bif. dentium*, bacterias específicas de humano (Bonjoch y col. 2004; King y col. 2007) para detectarlo en caso de que ese fuera el origen de la contaminación. Por último, en el caso de los enterococos se han diseñado diversas PCRs huésped específicas, como es el caso de la que detecta el gen *esp*, el cual codifica para una proteína de membrana, asociado a contaminación fecal humana (Scott y col. 2005).

### **Ensayos de PCR específicos para la detección de ADN mitocondrial**

El uso de las técnicas de PCR (y qPCR) en conjunción con el ADNmt de células eucariotas ha sido ampliamente utilizado en estudios de filogenia (Awise y col. 1979), forenses (Wilson y col. 1995) y de medicina (Bai y col. 2004). A pesar de llevar tanto tiempo utilizándose, no fue hasta el año 2005 que se aplicara en estudios de MST (Martellini y col. 2005) para diferenciar entre contaminación fecal de origen humano, bovino, porcino y ovino en muestras de aguas contaminadas.

Las principales ventajas de la detección del ADNmt son que la diana a detectar ya corresponde directamente al organismo causante de la contaminación, las heces contienen una gran cantidad de células epiteliales (Iyengar y col. 1991) y cada una de dichas células posee múltiples copias de ADNmt (Andreasson y col. 2002; Gerber y col. 2001) lo cual implica que haya mucha diana a detectar, y que a pesar de que se produzca la muerte celular al poco tiempo el ADN persiste más en el ambiente (Martellini y col. 2005).

### **Ensayos de PCR específicos para la detección de virus**

Los virus con un espectro de huéspedes limitado pueden ser utilizados para diferenciar la fuente de la contaminación fecal, especialmente los virus entéricos que, normalmente, se transmiten por la ruta fecal-oral y que se replican infectando la microbiota intestinal del organismo huésped. Otros virus no asociados a esta vía de transmisión, como los polyomavirus excretados por orina o los adenovirus, que además de la vía fecal-oral pueden transmitirse de individuo a individuo, también se utilizan en estudios de MST (Hundesda y col. 2006; McQuaig y col. 2006). Para ello es necesario aislar los virus de las muestras de agua y posteriormente extraer el ácido nucleico y amplificarlo mediante técnicas de PCR. Los resultados obtenidos pueden confirmarse por la secuenciación de los productos amplificados y posterior comparación de las secuencias con las bases de datos.

Este método ha sido exitoso en la identificación de contaminación fecal humana y bovina en aguas marinas (USEPA 2005b). Otros estudios han demostrado que la detección de estos virus en muestras individuales puede resultar negativa, dado que son patógenos y por tanto no forman parte de la microbiota intestinal de individuos sanos. Cuando se analiza una muestra mixta de una población de individuos numerosa, como por ejemplo las aguas residuales urbanas, la identificación se produce correctamente (Griffith y col. 2003).

Algunos inconvenientes de los virus son que no cumplen algunos de los requisitos necesarios de un indicador de la contaminación fecal ideal como una elevada presencia en la materia fecal, proceso analítico simple, alta supervivencia en el ambiente y a procesos de desinfección, bajo riesgo para el usuario, resultados rápidos y de bajo coste (Yates 2007), y que algunos de ellos, como los adenovirus, pueden presentar diferente distribución según la estación del año, siendo el invierno la estación donde se encuentran en menor cantidad (Fong y col. 2005).

### **PCR cuantitativa a tiempo real (Real Time qPCR: *Real time quantitative PCR*)**

La PCR cuantitativa o también conocida como PCR cuantitativa a tiempo real se basa en los mismos principios que una PCR convencional. La principal diferencia es que a la vez que se amplifica el ADN se cuantifica el número de copias del gen en estudio, por lo que se convierte tanto en una técnica tanto cualitativa como cuantitativa. Para cuantificar la cantidad del gen en estudio de la muestra se utilizan dos posibles estrategias: la primera es el uso de marcadores (o *dyes*) fluorescentes no específicos, como el SYBR Green, que se intercalan en el ADN de doble cadena produciendo

fluorescencia. Como mayor sea el número de fragmentos amplificados, mayor es la fluorescencia producida. La segunda estrategia se basa en el uso de sondas fluorescentes de hidrólisis, como por ejemplo las sondas TaqMan<sup>®</sup> que se unen al ADN que se va a amplificar y que se hidrolizan durante el proceso de amplificación como resultado de la acción exonucleasa de la Taq polimerasa (Holland y col. 1991). En ambos casos, la señal fluorescente aumenta a medida que se producen nuevos amplímeros y este aumento de fluorescencia puede ser medido. La intensidad de dicha señal puede ser relacionada con la cantidad de ADN diana presente en la muestra y que producirá mayor número de copias del gen en estudio.

El número de copias de un gen no es necesariamente proporcional al número de bacterias presentes en la muestra original, ya que cada bacteria puede contener varias copias en su genoma de la secuencia diana, como por ejemplo del ARNr 16S (Candela y col. 2004). La ventaja del uso de la PCR a tiempo real es que los resultados se obtienen en cuestión de pocas horas tras la recogida de la muestra y que pueden procesarse muchas muestras al mismo tiempo. Hay que tener en cuenta sin embargo el límite de detección de la técnica en muestras con bajos niveles de contaminación así como el coste del proceso.

**Tabla 5.** Comparación de los distintos métodos de MST (adaptación de USEPA 2011).

<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
ARA	Rápido y sencillo Poco entrenamiento del personal Discriminación de cepas	Requiere bases de datos Requiere cultivo de la cepa Base de datos puede variar geográfica y temporalmente Variación del método en distintos estudios
CUP	Rápido y sencillo Poco entrenamiento del personal	Requiere bases de datos Requiere cultivo de la cepa Base de datos puede variar geográfica y temporalmente Variación del método en distintos estudios En ocasiones resultados inconsistentes
Phene System	Automático Poco entrenamiento del personal Discriminación de cepas	Requiere bases de datos Requiere cultivo de la cepa Base de datos puede variar geográfica y temporalmente
Rep-PCR	Altamente reproducible Rápido y sencillo Poco entrenamiento del personal Discriminación de cepas	Requiere bases de datos Requiere cultivo de la cepa Base de datos puede variar geográfica y temporalmente
PFGE	Alta discriminación Altamente reproducible Sensible a pequeñas	Requiere cultivo del microorganismo Laborioso Requiere base de datos

## 1. Introducción

	diferencias genéticas	Personal especializado Base de datos puede variar geográfica y temporalmente
Ribotipado	Altamente reproducible Puede ser automático Discriminación de cepas	Laborioso (a no ser que sea automático) Requiere cultivo de la cepa Requiere bases de datos Personal especializado Variantes en la metodología Base de datos puede variar geográfica y temporalmente
DGGE	Funciona tanto para analizar cultivos puros como comunidades microbianas	Laborioso Personal especializado
AFLP	Alta discriminación Reproducible Automático Resultados concluyentes Funciona con muchas cepas	Personal especializado Equipo costoso Requiere base de datos
Bacteriófagos	Distingue humano de animal Subtipos con características estables Sencillo No requiere base de datos	Requiere cultivo de fagos En ocasiones hay más de una cepa huésped En bajo número en algunos ambientes
Cultivo bacteriano	Distingue humano de animal Sencillo, en muchos casos	Requiere cultivo de la cepa En algunas ocasiones las bacterias son anaerobias estrictas Requiere bases de datos Variantes en la metodología
PCR de bacterias	Distingue humano de animal Específico de huésped Rápido y sencillo No requiere el cultivo del microorganismo diana No requiere base de datos	Se tiene poco conocimiento sobre la supervivencia y distribución en los sistemas de agua No existen cebadores para todos los huéspedes relevantes
PCR de ADNmt	Distingue humano de animal Específico de organismo Rápido y sencillo No requiere base de dato	No existen cebadores para todos los organismos relevantes
PCR de virus	Distingue humano de animal Específico de huésped No requiere el cultivo del microorganismo diana No requiere base de datos	Normalmente presentes en bajo número; requiere un gran volumen de muestra Puede resultar negativo en muestras fecales de individuos aislados
Real time qPCR	Rápido Reproducible Automático Resultados concluyentes Procesar muchas muestras al mismo tiempo	Requiere bases de datos Base de datos puede variar geográfica y temporalmente Límite de detección Material y equipo caro

#### 1.4. La relevancia de los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium* como indicadores de la contaminación fecal en estudios de MST

Un buen microorganismo indicador de la contaminación fecal en el agua es aquel que se encuentra siempre presente en las heces del organismo causante de la contaminación, lo que por tanto implica que debe formar parte de su microbiota intestinal. Cada organismo huésped posee una microbiota específica, cosa que posibilita la trazabilidad de la contaminación fecal del agua. Muchas especies de los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium* forman parte de la microbiota intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, lo cual los convierte en buenos candidatos para ser indicadores de la contaminación fecal. A continuación se desarrolla con mayor detalle sus propiedades y características.

##### 1.4.1. *Bacteroides* spp. como microorganismos indicadores de la contaminación fecal

El género *Bacteroides* forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, estableciendo con ellos una relación de mutualismo (Backhed y col. 2005). De hecho, el filo de los *Bacteroidales* junto con el de los *Firmicutes* representan en muchas ocasiones entre el 80% e incluso más del 90% de la microbiota de los animales de sangre caliente (Eckburg y col. 2005; Ley y col. 2008; Wei y col. 2013; Ziemer 2013).

##### Características del género *Bacteroides*

El género *Bacteroides* forma parte de la familia *Bacteroidaceae*, la cual pertenece al orden de los *Bacteroidales* junto con las familias *Marinilabiaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae*. El orden *Bacteroidales* pertenece a la clase *Bacteroidetes* y ésta en el filo *Bacteroidetes*. Dentro del género *Bacteroides* se engloban muchas especies (tabla 6).

Son bacilos Gram-negativos, no formadores de esporas, anaerobios (aunque algunas especies son más aerotolerantes que otras (Baughn y Malamy 2004)), resistentes a la bilis (pueden crecer hasta una concentración de bilis del 20%) y móviles o no móviles según la especie. Hasta la fecha se ha secuenciado el genoma de *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. helcogenes*, *B. salinitronis*, *B. xylanosolvens* y *P. distasonis* ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)) que varía entre 6,3Mb de *B. thetaiotaomicron* y 4Mb de *B. helcogenes*. Está compuesto por una baja cantidad de GC, 40-48%. Algunas especies como *B. fragilis* son resistentes a ciertos antibióticos como kanamicina, vancomicina o

## 1. Introducción

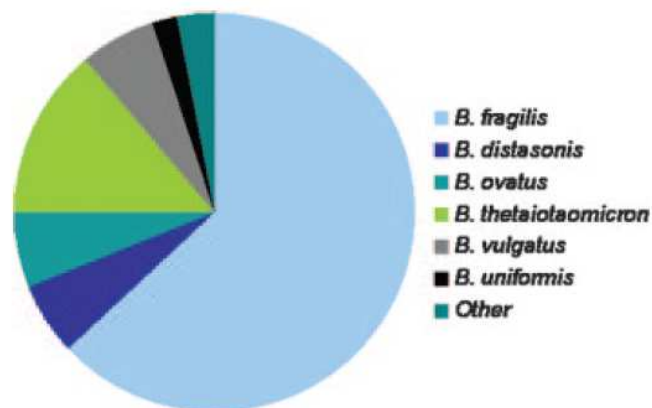
---

colistina. Además poseen una pared celular que consiste en múltiples capas con moléculas que se entrelazan entre sí, formando así una estructura muy compleja que protege a la bacteria (Wexler 2007).

*Bacteroides* spp. son las especies predominantes en el colon de los humanos. Son capaces de degradar tanto azúcares simples como complejos (celulosa, hemicelulosa o almidón) ayudando así a la digestión de fibras vegetales y proporcionando a su vez azúcares más sencillos que aprovechan otras bacterias de la microbiota que no disponen de enzimas (glicosilhidrolasas) para degradar los más complejos (Sonnenburg y col. 2004). La fermentación de los carbohidratos por parte de *Bacteroides* y otras especies de la microbiota proporciona al organismo huésped una porción significativa de su requerimiento diario de energía (Hooper y col. 2002). De hecho, una mayor cantidad de las bacterias pertenecientes al filo *Bacteroidetes* están asociadas con una menor proporción de la obesidad, y eso es gracias a la capacidad degradativa de sus glicosilhidrolasas (Wexler 2007).

A pesar de que *Bacteroides* se considera un microorganismo habitual de la microbiota intestinal, este género además puede causar patologías en determinadas condiciones. Entre otras forma abscesos (en abdomen, hígado, cerebro, pelvis o pulmones) y bacteriemias en el caso que atraviesen las células de la pared intestinal y lleguen a la sangre, como podría suceder, por ejemplo, durante una cirugía (Wexler 2007). Es más, este género representa dos tercios de las bacterias anaerobias aisladas en clínica (Smith y col. 2006), especialmente *Bacteroides fragilis* es la más frecuentemente aislada y la más virulenta (Wexler 2007) (Figura 4).

**Figura 4.** Proporciones de especies de *Bacteroides* aisladas en clínica (Wexler 2007).





### Presencia de *Bacteroides* en la microbiota intestinal de humanos y animales

*Bacteroides* spp. representa aproximadamente entre un 35-40% de la microbiota intestinal humana (Matsuki y col. 2002; Suau y col. 1999). En el caso de la microbiota bovina el filo *Bacteroidetes* representa un 30%, del cual el 46% son especies de *Bacteroides* (Ziemer 2013). En cuanto la composición de la microbiota porcina, *Bacteroides* corresponde alrededor de un 11% (Leser y col. 2002). En el caso de aves de corral como gallinas y pollos, la cantidad del filo *Bacteroidetes* es mucho menor, equivale al 12,3%, y concretamente *Bacteroides* a un 1% (Wei y col. 2013).

**Tabla 6.** Especies de *Bacteroides* spp. y *Parabacteroides* spp. y hábitat donde fueron descritas.

Especie	Hábitat	Origen
<i>B. acidifaciens</i>	Ciego de ratón	Miyamoto e Itoh 2000
<i>B. barnesi</i>	Ciego de gallina	Lan y col. 2006
<i>B. caccae</i>	Heces de humano	Johnson y col. 1986
<i>B. cellulosilyticus</i>	Intestino de humano	Robert y col. 2007
<i>B. cellulosolvens</i>	Lodos de agua residual	Murray y col. 1984
<i>B. clarus</i>	Heces de humano	Watanabe y col. 2010
<i>B. coagulans</i>	Heces de humano	Eggerth y Gagnon 1933
<i>B. coprocola</i>	Heces de humano	Kitahara y col. 2005
<i>B. coprophilus</i>	Heces de humano	Hayashi y col. 2007
<i>B. coprosuis</i>	Heces de cerdo	Whitehead y col. 2005
<i>B. dorei</i>	Heces de humano	Bakir y col. 2006c
<i>B. eggerthii</i>	Heces de humano	Holdeman y Moore 1974
<i>B. faecichinchillae</i>	Heces de <i>Chinchilla lanigera</i>	Kitahara y col. 2012
<i>B. faecis</i>	Heces de humano	Kim y col. 2010
<i>B. finegoldii</i>	Heces de humano	Bakir y col. 2006b
<i>B. fluxus</i>	Heces de humano	Watanabe y col. 2010
<i>B. fragilis</i>	Heces de humano	Veillon y Zuber 1898
<i>B. galacturonicus</i>	Intestino de humano	Jensen y Canale-Parola 1986
<i>B. gallinarum</i>	Ciego de gallina	Lan y col. 2006
<i>B. graminisolvens</i>	Residual de vaca	Nishiyama y col. 2009
<i>B. helcogenes</i>	Abscesos y heces de cerdo	Benno y col. 1983
<i>B. intestinalis</i>	Heces de humano	Bakir y col. 2006a
<i>B. massiliensis</i>	Sangre de neonato	Fenner y col. 2005
<i>B. nordii</i>	Intestino de humano	Song y col. 2004
<i>B. oleiciplenus</i>	Heces de humano	Watanabe y col. 2010
<i>B. ovatus</i>	Heces de humano	Eggerth y Gagnon 1933
<i>B. paurosaccharolyticus</i>	Residual de vaca	Ueki y col. 2011
<i>B. pectinophilus</i>	Intestino de humano	Jensen y Canale-Parola 1986
<i>B. plebeius</i>	Heces de humano	Kitahara y col. 2005
<i>B. propionicifaciens</i>	Residual de vaca	Ueki y col. 2008
<i>B. pyogenes</i>	Abscesos y heces de cerdo	Benno y col. 1983
<i>B. reticulotermitis</i>	Intestino de <i>Reticulitermes speratus</i>	Sakamoto y Ohkuma 2013
<i>B. rodentium</i>	Heces de <i>Chinchilla lanigera</i>	Kitahara y col. 2011
<i>B. ruminicola</i>	Rumen	Bryant y col. 1958
<i>B. salanitronis</i>	Ciego de gallina	Lan y col. 2006
<i>B. salyersiae</i>	Intestino de humano	Song y col. 2004
<i>B. stercorisoris</i>	Heces de <i>Chinchilla lanigera</i>	Kitahara y col. 2012
<i>B. stercoris</i>	Heces de humano	Johnson y col. 1986
<i>B. suis</i>	Abscesos y heces de cerdo	Benno y col. 1983
<i>B. tectus</i>	Tejido blando de perro y gato	Love y col. 1986
<i>B. thetaiotamicron</i>	Intestino de humano	Distaso 1912
<i>B. uniformis</i>	Heces de humano	Eggerth y Gagnon 1933
<i>B. ureolyticus</i>	Fluido amniótico humano	Jackson y Goodman 1978

## 1. Introducción

<i>B. vulgatus</i> <i>B. xylanisolvens</i> <i>B. xylanolyticus</i>	Heces de humano Heces de humano Heces de vaca	Eggerth y Gagnon 1933 Chassard y col. 2008 Scholten-Koerselman y col. 1986
<i>P. distasonis</i> <i>P. goldsteinii</i> <i>P. johnsonii</i> <i>P. merdae</i>	Heces de humano Intestino de humano Heces de humano Heces de humano	Eggerth y Gagnon 1933; Sakamoto y Benno 2006 Sakamoto y Benno 2006; Song y col. 2005 Sakamoto y col. 2007 Johnson y col. 1986; Sakamoto y Benno 2006

### Métodos para la detección de *Bacteroides*

Este género acostumbra a detectarse con metodologías independientes de cultivo, ya que al ser una bacteria anaerobia su viabilidad en el ambiente es muy reducida (Fiksdal y col. 1985). Algunos estudios han concluido que con el incremento de la temperatura su viabilidad disminuye con mayor rapidez (Ballesté y Blanch 2010; Okabe y Shimazu 2007; Sokolova y col. 2012), mientras que con un aumento en la salinidad del agua su supervivencia parece que incrementa (Okabe y Shimazu 2007). Debido a su incapacidad de multiplicarse en el ambiente y a su fuerte vínculo con la contaminación de origen fecal, han sido propuestos como indicadores de la contaminación fecal. Su manipulación en el laboratorio es compleja dada su estricta anaerobiosis, por ello es más común utilizar metodologías independientes de cultivo para detectarlos.

Los medios de cultivo donde crecen estas bacterias necesitan recrear el ambiente natural donde habitan. Por ello es necesario que contengan azúcares fermentables, hemina, vitamina B<sub>12</sub>, amonio como fuente de nitrógeno, dióxido de carbono y sulfato (Smith y col. 2006). Los medios de cultivo que se han utilizado para su aislamiento y caracterización han sido *Bacteroides Bilis Esculina* (BBE), presentado por primera vez por Livingston y sus colaboradores en 1978 para el aislamiento y caracterización presuntiva de *B. fragilis*; el medio Kanamicina-Vancomicina Brucella Sangre Agar (KVLB) que permite el aislamiento tanto de *Bacteroides* como *Prevotella* (Summanen y col. 1993); Kanamicina-Esculina Bilis Agar (KEB) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Bacteroides* (Chan y Porschen 1977), el medio selectivo para el grupo *B. fragilis* (FRAG) (Lyznicki y col. 1982); y el Medio de Recuperación de Fagos de *Bacteroides* (BPRM) que se utiliza tanto para el cultivo de *Bacteroides* como para recuperar los fagos que los infectan (Tartera y col. 1992). Su manipulación en el laboratorio debe ser rápida para exponerlos al oxígeno el menor tiempo posible y siempre deben incubarse en ambientes libres de oxígeno como en jarras de anaerobiosis.

#### 1.4.2. *Bifidobacterium* spp. como microorganismos indicadores de la contaminación fecal

##### Características del género *Bifidobacterium*

La primera mención del nombre “*bifidus*” se produjo en 1990, cuando Tissier descubrió en las heces de bebés lactantes unas bacterias con forma de “Y” a las que denominó *Bacillus bifidus*. En 1924, Orla-Jensen reconoció la existencia del género *Bifidobacterium*, aunque fueron incluidas dentro del género *Lactobacillus* en la séptima edición del *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology* (Breed y col. 1957). En su octava edición (Buchanan y col. 1974) ya se clasificaron como un género propio (Biavati y Mattarelli 2006).

El género *Bifidobacterium* pertenece al filo *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, subclase *Actinobacteridae*, orden *Bifidobacteriales* y a la familia *Bifidobacteriaceae*. Otros géneros que pertenecen a esta familia son *Aeriscardovia*, *Gardnerella*, *Parascardovia*, *Alloiscardovia*, *Metascardovia* y *Scardovia*.

Las bifidobacterias son bacilos irregulares (con forma de Y o V) Gram-positivos, no formadores de esporas, no móviles y no filamentosas. Son anaerobias y quimiorganotrofas, con un tipo de metabolismo fermentativo. Producen ácido pero no gas de la fermentación de una gran variedad de carbohidratos. Son catalasa negativos, con la excepción de *Bif. indicum* y *Bif. asteroides* cuando crecen en presencia de aire (Dellaglio y Felis 2005). Se ha secuenciado el genoma de 31 cepas de *Bifidobacterium* y en todos los casos su tamaño es de entre 1,9Mb (*Bif. animalis* subsp. *animalis*) y 2,6Mb (*Bif. dentium*) ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)) y contiene entre un 55% y un 67% de GC (Biavati y Mattarelli 2006). Además en otros estudios se ha comprobado que las especies del género *Bifidobacterium* tienen entre 1 y 5 copias del gen que codifica el ARNr 16S (Ballesté y Blanch 2011; Candela y col. 2004).

Las bifidobacterias degradan las hexosas a través de una ruta metabólica particular gracias a que poseen la enzima fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa (Scardovi y Trovatelli 1965), que rompe la hexosa-6-fosfato a acetil fosfato y a eritrosa-4-fosfato y que a través de sucesivas acciones transforma en ácido láctico y ácido acético en una proporción 2:3 (Biavati y col. 2000). Esta enzima también se encuentra presente en *Gardnerella vaginalis* (Gavini y col. 1996), pero ambos géneros son fáciles de distinguir por sus características fenotípicas (Biavati y col. 2000).

## 1. Introducción

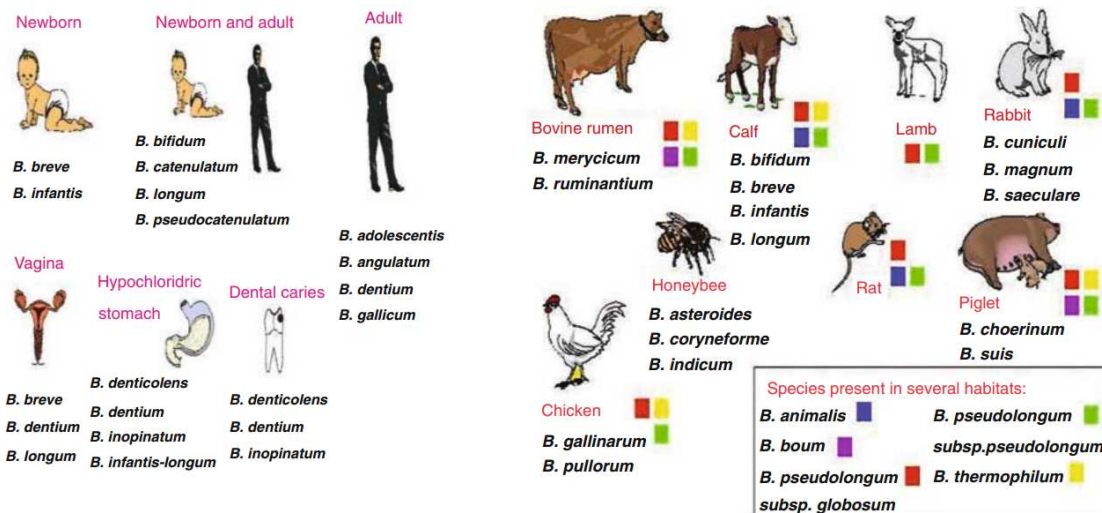
Su crecimiento óptimo es entre 37°C y 41°C para las cepas asociadas a humanos y 45°C en caso de las animales; y a un pH entre 6,6 y 7. No se observa crecimiento a menos de 20°C y/o 4,5 de pH y por encima de 46°C y/o 8,5 de pH.

### Presencia de *Bifidobacterium* en la microbiota intestinal de humanos y animales

Muchas de las especies del género *Bifidobacterium* están asociadas al microbioma de humanos y otras especies animales. Se pueden encontrar formando parte de las heces de bebés, niños y de personas adultas, por lo tanto se encuentran en su microbiota intestinal, y también se encuentran en la microbiota vaginal y en las caries (Biavati y col. 2000), lo que demuestra su capacidad adaptativa a diferentes hábitats dentro del microbioma del ser humano. De hecho, se ha observado cierta especificidad de algunas especies de *Bifidobacterium* con la edad y el tipo de alimentación, por ejemplo, *Bif. breve* y *Bif. infantis* predominan en las heces de bebés lactantes, mientras que *Bif. bifidum*, *Bif. catenulatum*, *Bif. longum* y *Bif. pseudocatenulatum* se encuentran tanto en bebés como adultos. *Bif. adolescentis* por su parte se encuentra en las heces de adultos.

En animales ocurren situaciones similares. Existen cepas de *Bifidobacterium* que están fuertemente relacionadas con un organismo huésped concreto, como por ejemplo *Bif. magnum* y *Bif. cuniculi* a conejo, *Bif. pullorum* y *Bif. gallinarum* a aves de corral (gallinas y pollos) o *Bif. asteroides* en abejorros. En la Figura 5 y en la Tabla 7 se puede observar una lista con las especies y el hábitat donde fueron descritas.

**Figura 5.** Hábitats del género *Bifidobacterium* en humanos y animales (Biavati y Mattarelli 2006).



Dada su fisiología anaerobia y a su dificultad en multiplicarse por debajo de los 30°C hacen que resulte muy improbable su crecimiento en el medio ambiente y eso ha permitido la coevolución de algunas especies con su organismo huésped y, en algunos casos, su exclusividad. Todo ello lo hizo un buen candidato de trazador de la contaminación fecal (Mara y Oragui 1983). De todos modos se han descrito dos especies solamente aisladas en el medio ambiente (*Bif. minimum* y *Bif. subtile*), lo cual ha incrementado el interés por el posible desarrollo de las bifidobacterias fuera del ambiente gastrointestinal (Biavati y Mattarelli 2006).

**Tabla 7.** Especies de *Bifidobacterium* spp. y hábitat donde fueron descritas (adaptada de Annals of Microbiology (Biavati y col. 2000)).

Espece	Hábitat	Origen
<i>Bif. actinocoloniiforme</i>	Tracto digestivo del abeja	Killer y col. 2011
<i>Bif. adolescentis</i>	Heces de humanos adultos, rumen bobino; vagina	Reuter 1963
<i>Bif. angulatum</i>	Heces de humanos adultos	Scardovi y Crociani 1974
<i>Bif. animalis</i>	Heces de rata, pollo, conejo, ternera y cobaya	Scardovi y Trovatelli 1974
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Heces de rata	Masco y col. 2004
<i>Bif. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Leche fermentada	Masco y col. 2004
<i>Bif. asteroides</i>	Intestino de <i>Apis mellifera</i>	Scardovi y Trovatelli 1969
<i>Bif. bifidum</i>	Heces de humanos adultos, niños y terneras lactantes; vagina	Orla-Jensen 1924
<i>Bif. bohemicum</i>	Tracto digestivo del abeja	Killer y col. 2011
<i>Bif. bombi</i>	Tracto digestivo del abeja	Killer y col. 2009
<i>Bif. boum</i>	Rumen bobino, heces de cerdo	Scardovi y col. 1979
<i>Bif. breve</i>	Heces de niños, terneras lactantes; vagina	Reuter 1963
<i>Bif. catenulatum</i>	Heces de niños y adultos; vagina	Scardovi y Crociani 1974
<i>Bif. choerium</i>	Heces de cerdo	Scardovi y col. 1979
<i>Bif. coryneforme</i>	Intestino de <i>Apis mellifera</i>	Biavati y col. 1982
<i>Bif. crudilactis</i>	Leche y queso	Delcenserie y col. 2007
<i>Bif. cuniculi</i>	Heces de conejo	Scardovi y col. 1979
<i>Bif. dentium</i>	Caries dental humana y cavidad oral; heces de adultos	Scardovi y Crociani 1974
<i>Bif. gallicum</i>	Heces humanas	Lauer 1990
<i>Bif. gallinarum</i>	Ciego y heces de pollo	Watabe y col. 1993
<i>Bif. indicum</i>	Intestino de <i>Apis cerana</i> y <i>A. dorsata</i>	Scardovi y Trovatelli 1969
<i>Bif. infantis</i>	Heces de niños y terneras lactantes; vagina	Reuter 1963
<i>Bif. kashiwanohense</i>	Heces de niños	Morita y col. 2011
<i>Bif. longum</i>	Heces de adultos, niños, cerdo y terneras lactantes	Reuter 1963
<i>Bif. magnum</i>	Heces de conejo	Scardovi y Zani 1974
<i>Bif. merycicum</i>	Rumen	Biavati y Mattarelli 1991
<i>Bif. mínimum</i>	Agua residual	Biavati 1982
<i>Bif. mongoliense</i>	Leche de yegua	Watanabe y col. 2009
<i>Bif. pseudocatenulatum</i>	Heces de niños y terneras lactantes	Scardovi y col. 1979
<i>Bif. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	Heces de cerdo, terneras lactantes, rata, conejo y cordero; rumen	Yaeshima 1992

## 1. Introducción

<i>Bif. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Heces de cerdo, pollo, buey, ternera, rata y cobaya; rumen	Mitsuoka 1969
<i>Bif. psychraerophilum</i>	Ciego porcino	Simpson y col. 2004
<i>Bif. pullorum</i>	Heces de pollo	Trovatelli y col. 1974
<i>Bif. ruminantium</i>	Rumen	Biavati y mattarelli 1991
<i>Bif. saeculare</i>	Heces de conejo	Biavati 1992
<i>Bif. scardovii</i>	Orina y sangre de humanos	Hoyles y col. 2002
<i>Bif. subtile</i>	Agua residual	Biavati 1982
<i>Bif. thermacidophilum</i>	Heces de cerdo, pollo y terneras lactantes; rumen	Mitsuoka 1969
<i>Bif. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Heces de cerdos	Zhu y col. 2003
<i>Bif. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Digestivo anaeróbico	Dong y col. 2000
<i>Bif. tsurumiense</i>	Placa dental de hámster	Okamoto y col. 2008

### Métodos para la detección de *Bifidobacterium*

Este género tiene una baja persistencia en el medio ambiente, una  $T_{90}$  de 15 a 20 horas en invierno y de 7 a 10 en verano (Bonjoch y col. 2009). Presenta también muchos requerimientos nutricionales como nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. Además es de crecimiento lento y anaerobio, lo que dificulta su manipulación en el laboratorio y consume mucho tiempo hasta poder observar los resultados. Por ello, al igual que sucede con *Bacteroides*, es frecuente encontrar métodos basados en su cultivo pero también otras metodologías independientes de cultivo.

Algunos de los medios de cultivo selectivos y diferenciales que se utilizan para su aislamiento son Human Bifid Sorbitol Agar (HBSA) (Mara y Oragui 1983), *Bifidobacterium* iodoacetato médium (BIM) (Muñoa y Pares 1988), *Bifidobacterium* Medium (BFM) (Nebra y Blanch 1999) entre otros. En segundo lugar, algunas de las técnicas independientes de cultivo que se usan para su detección son técnicas de PCR con diana en las cepas asociadas a humano (Bonjoch y col. 2004; King y col. 2007) o análisis de comunidades por DGGE (Ballesté y Blanch 2011) entre otros.

Este género, junto con *Lactobacillus*, tiene mucha importancia dada su aplicabilidad como probiótico. Es un microorganismo vivo que se utiliza como suplemento y que beneficia al organismo huésped mejorando su balance microbiano (Fuller 1989). Se ha descrito que las bifidobacterias alivian la intolerancia a la lactosa (Vesa y col. 1996), previenen la diarrea y que son capaces de excretar al medio factores bacteriocidas o bacteriostáticos contra bacterias potencialmente patógenas (Biavati y col. 2000).

### 1.5. Estado actual del MST y futuras direcciones

Actualmente existen numerosos métodos para identificar la fuente de contaminación fecal, aunque mayoritariamente se observa una tendencia a sustituir las técnicas dependientes de cultivo por metodologías moleculares en las cuales la fuente de la contaminación es directamente identificada de la extracción de ADN de la muestra de agua. Muchos de estos nuevos métodos están basados en técnicas de PCR o qPCR para la detección de marcadores específicos de huésped.

La mayoría de los métodos de MST más recientes se han centrado en el análisis de las secuencias del gen que codifica el ARNr 16S, debido a su alto nivel de especificidad con su cepa huésped. Por ejemplo se han empezado a utilizar microarrays basados en este gen (Dubinsky y col. 2012), qPCRs (Reischer y col. 2013) o estudios mediante el uso de la metagenómica (Lu y col. 2007; Shanks y col. 2007). A pesar de esto, los marcadores tradicionales y algunos métodos basados en el cultivo de microorganismos, como los bacteriófagos, se continúan analizando debido a su utilidad (Harwood y col. 2013).

A pesar de todos los esfuerzos realizados, hasta la fecha, **no existe ningún método de MST ideal, único o universal**. Los que se basan en el aislamiento e identificación de microorganismos indicadores son laboriosos y requieren mucho tiempo. Los métodos basados en la detección de compuestos químicos no siempre correlacionan con las bacterias indicadoras de la contaminación fecal y las técnicas de PCR no tienen marcadores para todas las especies. Otro de los principales problemas es que muchas de las técnicas desarrolladas pueden estar **limitadas a una determinada área geográfica**, incluso a un determinado espacio de tiempo. Por ello es necesario realizar ensayos inter-laboratorio y analizar muestras a ciegas y comprobar así la eficacia de los métodos, cosa que están empezando a realizar muchos laboratorios (Harwood y col. 2013; Reischer y col. 2013).

Se ha observado que ninguno de los métodos propuestos hasta la fecha tiene la suficiente capacidad y fiabilidad para identificar por sí solo el origen de la contaminación fecal del agua de forma universal (Blanch y col. 2006; Griffith y col. 2003). Por ello se ha sugerido la combinación de distintos marcadores para proporcionar robustez a los resultados y una mayor fiabilidad (Blanch y col. 2006). La selección del conjunto de métodos adecuados para una mejor detección del origen fecal en una muestra determinada representa un problema importante. Además, en los estudios es necesario

## 1. Introducción

---

considerar el **efecto de la dilución** de los microorganismos diana en las aguas que reciben el aporte fecal, porque su detección se verá afectada por el **límite de detección** de la técnica o técnicas usadas. Por otro lado es importante considerar cómo **afecta el paso del tiempo** a la muestra y al microorganismo que se pretende detectar (Blanch y col. 2006), ya que la diferente persistencia de este microorganismo a la inactivación natural de una muestra con contaminación fecal antigua puede afectar directamente a su detección y por tanto a su aplicabilidad para determinar el origen fecal de dicha muestra.

En este estudio se propone el uso de un programa de aprendizaje inductivo que permita considerar todos estos factores, parámetros de dilución y antigüedad, para así poder proporcionar una mayor fiabilidad a los resultados y poder seleccionar aquellos indicadores que proporcionen una información más fiable (Sánchez y col. 2011).



## 2. Objetivos



**2. Objetivos**

Este trabajo experimental se ha centrado en el estudio de diversas metodologías de MST con el objetivo de identificar la fuente de la contaminación fecal. En particular se ha centrado en cuatro organismos principales como orígenes contaminantes: hombre, vaca, cerdo y aves de corral; y en dos géneros bacterianos como microorganismos indicadores: *Bacteroides* y *Bifidobacterium*. Con este propósito se establecieron los siguientes objetivos para cada estudio, coincidiendo con los capítulos de esta tesis:

- 1) Uso de bacteriófagos de *Bacteroides* para estudios de MST (capítulo 1):
  - Aislar cepas de *Bacteroides* spp. a partir de agua residual.
  - Identificar las cepas aisladas.
  - Estudiar la capacidad de las cepas aisladas de detectar fagos que discriminen el origen de la contaminación fecal.
  - Determinar la capacidad de las cepas aisladas para detectar fagos de origen fecal en aguas con el mismo origen de contaminación que las cepas huésped aisladas.
  - Determinar la capacidad de las cepas aisladas para no detectar fagos de origen fecal en aguas con distinto origen de contaminación que las cepas huésped aisladas.
  
- 2) Diseño de una qPCR de *Bifidobacterium* asociadas a huésped (capítulo 2):
  - Diseñar un juego de cebadores comunes y sondas específicas de huésped (humano, bovino, porcino y aviar) para PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), a partir de la información obtenida de las bandas de DGGE específicas de huésped seleccionadas.
  - Aplicar los nuevos ensayos de qPCR para la detección y cuantificación de las cepas de *Bifidobacterium* específicas de huésped en muestras de agua con contaminación fecal de origen conocido.
  - Verificar la especificidad de los ensayos para no detectar cepas de *Bifidobacterium* específicas de huésped en muestras de agua con contaminación fecal de origen diferente.
  - Comprobar la efectividad de las qPCRs con o sin extracción de ADN de las muestras y observar si existen diferencias significativas entre ambas metodologías.

## 2. Objetivos

---

- 3) Uso de indicadores y del programa de aprendizaje inductivo en estudios de MST (capítulo 3):
  - Comparar la eficiencia de diversos indicadores de MST, incluidos los desarrollados en esta tesis, con muestras de diversa carga fecal (punto de origen, moderada y baja).
  - Aplicar el programa de aprendizaje inductivo Ichnaea con el fin de obtener predicciones precisas tanto en muestras antiguas como con contaminación fecal diluida.
  - Determinar qué indicadores de MST son más relevantes para determinar el origen de la contaminación en cada tipo de muestra.
  
- 4) Uso de la DGGE para el diseño de qPCRs de *Bacteroides* específicas de huésped (capítulo 4):
  - Obtener mediante la metodología DGGE los perfiles de bandas mayoritarias y únicas del ADNr 16S para cada origen de contaminación fecal (humano, bovino, porcino y aviar).
  - Diseñar un juego de cebadores comunes y sondas específicas de huésped (humano, bovino, porcino y aviar) para PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), a partir de la información obtenida de las bandas de DGGE específicas de huésped seleccionadas.
  - Aplicar esta nueva qPCR para la detección y cuantificación de las cepas de *Bacteroides* específicas de huésped en muestras de agua con contaminación fecal de origen conocido.

### 3. Publicaciones



### 3.1. Uso de bacteriófagos de *Bacteroides* para estudios de MST





**Aislamiento de cepas de *Bacteroides* específicas de huésped para la detección de bacteriófagos usados como método de identificación del origen la contaminación fecal animal en agua.**

Marta Gómez-Doñate<sup>1</sup>, Andrey Payán<sup>2</sup>, Ivania Cortés<sup>1</sup>, Anicet R. Blanch<sup>1</sup>, Francisco Lucena<sup>1</sup>, Juan Jofre<sup>1</sup> y Maite Muniesa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona-Institut de l'aigua, Avenida Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

<sup>2</sup>Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 3ª #36B-05, Edificio 134, Espacio 206. Cali, Colombia.

## **Introducción**

Las enfermedades relacionadas con la ruta fecal-oral y transmitidas por el agua comprenden una gran parte de las patologías descritas a nivel mundial (WHO 2008) y, por consiguiente, la contaminación fecal del agua es un problema de salud pública a escala mundial. La contaminación fecal de las aguas puede deberse a las descargas directas de carga fecal, descarga de efluentes secundarios de plantas de tratamiento de aguas, descarga de instalaciones sanitarias, descargas de actividades relacionadas con ganadería, mataderos y contaminación fecal por parte de animales salvajes, entre otros (USEPA 2004).

La detección directa de los microorganismos patógenos en el agua puede ser muy compleja, ya que pueden encontrarse de forma intermitente y normalmente a bajas concentraciones. Esto ha propiciado el uso de otros microorganismos no patógenos que indican que se ha producido una contaminación de origen fecal y que informan de la eficacia de los tratamientos de depuración a los que se ha sometido una muestra de agua; los llamados microorganismos indicadores. Los microorganismos indicadores clásicos de contaminación fecal son grupos bacterianos, entre los que destacan los coliformes fecales, *Escherichia coli*, enterococos o clostridios reductores de sulfitos (Anónimo 1998). Aunque estos indicadores aportan información sobre la calidad microbiológica del agua y los niveles de contaminación fecal, no pueden identificar el origen de dicha contaminación. Por ello, se han propuesto nuevos métodos basados en

### 3.1. Uso de bacteriófagos de *Bacteroides* para estudios de MST

---

microorganismos capaces de discriminar el origen de la contaminación fecal del agua, los cuales se engloban con el término *Microbial Source Tracking* (MST).

Uno de los métodos propuestos son los bacteriófagos que infectan cepas de *Bacteroides* (Blanch y col. 2006; Grabow y col. 1995; Puig y col. 1999; Tartera y col. 1989). Las cepas de *Bacteroides* varían en su capacidad de discriminación entre fagos de distintos orígenes fecales. Existen cepas que no son capaces de distinguir entre distintos orígenes de contaminación, como es el caso de la cepa de *Bacteroides fragilis* RYC 2056 (Puig y col. 1999), y otras que son muy específicas para un origen fecal concreto, como la cepa *Bacteroides thetaiotamicron* GA17 (Payán y col. 2005) que detecta exclusivamente fagos presentes en la contaminación fecal de origen humano. Siguiendo el método de aislamiento de cepas de *Bacteroides* adecuadas para la detección de fagos de un origen fecal determinado (Payán y col. 2005), se propuso encontrar una cepa o cepas de *Bacteroides* adecuadas para discriminar separadamente los orígenes fecales bovino, aviar y porcino.

#### Objetivos

- Aislar cepas de *Bacteroides* spp. a partir de agua residual.
- Comparar y establecer sus proporciones con otros indicadores microbiológicos de la calidad del agua (coliformes fecales y colifagos somáticos).
- Estudiar la capacidad de las cepas aisladas de detectar fagos que discriminen el origen de la contaminación fecal.
- Determinar la presencia de fagos de origen fecal en aguas con este tipo de contaminación que infecten a las cepas huésped aisladas.
- Identificar las cepas aisladas.

#### Resultados

En primer lugar se aislaron cepas de *Bacteroides* de muestras de agua con contaminación fecal de origen animal (porcino, vacuno y aviar). Se seleccionaron las colonias que crecían en condiciones de estricta anaerobiosis. Usando el medio BBE agar, las cepas de *Bacteroides* se seleccionaron porque forman colonias negras con halo negro (Livingston 1978). Las colonias con esta morfología, anaeróbicas estrictas, se cultivaron en el medio BPRM líquido, sugerido por la norma ISO para la enumeración de fagos de

*Bacteroides*. Aquellas que mostraron un buen crecimiento en BPRM se seleccionaron para la enumeración de fagos. Se comparó la capacidad de estas cepas de ser infectadas por fagos aislados de muestras de su mismo origen fecal, y se compararon los recuentos con los resultados de RYC 2056. El análisis de fagos se realizó mediante el método de doble capa de agar. Las cepas con resultados más similares a RYC 2056, es decir, las que mostraban detección de igual o mayor número de fagos que RYC 2056, se seleccionaron. A continuación se comprobó su especificidad con suspensiones de fagos de aguas de otros orígenes animales. Las más específicas para su propio origen y que no detectaban fagos de otros orígenes fecales se escogieron para estudios posteriores. Éstas fueron CW18 y CW50 para origen bovino, PG76 y PG1226 para porcino y PL122 para aviar (ver tabla 1).

Dichas cepas se identificaron tanto por métodos moleculares, analizando el ARNr 16S, como por métodos bioquímicos. Ambas metodologías coincidieron en que todas las cepas eran *B. fragilis* excepto CW18, que se identificó como *Bacteroides thetaiotamicron* (ver tabla 2).

Se observó la morfología de los bacteriófagos que infectaba a cada cepa mediante microscopía electrónica. Todos ellos pertenecían a la familia *Siphoviridae* (Van Regenmortel y col. 2000) (ver figura 1).

Las cepas de *Bacteroides* seleccionadas fueron testadas con aguas de contaminación fecal de un único origen conocido (agua de plantas depuradoras urbanas y de distintos mataderos). Todas ellas detectaban fagos que originaban calvas de lisis claras y bien definidas, excepto la cepa PL122, que mostraba algunas calvas turbias. A pesar de ello se seleccionó porque fue la que mostró mayor discriminación y los mejores valores de recuento de fagos. Todas las cepas mostraron una detección del número de fagos coincidente con las muestras de suspensiones fágicas de su mismo origen. PG76, PG1226 (cerdos) y GA17 (descrita previamente para origen humano) (Payán y col. 2005), identificaron el 100% de las muestras de su mismo origen, y mostraron una mayor detección de fagos que la cepa de referencia RYC 2056. Las cepas CW18, CW50 y PL122 detectaron entre el 70% y el 83% de las muestras de su mismo origen, con detección del número de fagos algo menor que la cepa de referencia RYC2056, pero sin mostrar diferencias significativas ( $P > 0,005$ ) (ver figura 2 y tabla 3).

Al testar las cepas con aguas de diferente origen se observaron algunas identificaciones cruzadas. PG76 y PG1226 detectaron fagos de muestras de origen

humano, pero con valores entre 2 y 3 unidades logarítmicas menos que la cepa humana GA17. CW18 y CW50 también detectaron fagos en agua de origen porcino, pero 3 unidades logarítmicas menos que las cepas específicas (ver figura 2).

Posteriormente se analizaron muestras del río Llobregat, el cual tiene un nivel de contaminación moderada y de origen mixto. Las muestras se tomaron en un tramo que circula por una zona urbana con descargas de secundario de plantas depuradoras de agua. La cepa GA17 identificó el 100% de las muestras testadas, mientras que se observaron detección de fagos ocasionales y en bajo número por el resto de las cepas (ver tabla 4). Estos resultados coinciden con datos previos de la Agencia Catalana del Agua (<http://aca-web.gencat.cat/aca>) sobre la contaminación del río Llobregat, que puede presentar contaminación fecal animal esporádica.

## Discusión

La eficiencia en el aislamiento de cepas específicas de *Bacteroides* resultó similar a las descritas previamente para las humanas (Ebdon y col. 2007; Payán y col. 2005).

Las cepas seleccionadas por el método descrito mostraron una alta detección de fagos en las muestras con carga fecal elevada de su mismo origen. En algunos casos no se produjo detección de ningún fago, como en el caso de la PL122, al analizar algunas muestras de origen aviar. Este hecho puede deberse a que en el mismo matadero se sacrifican distintas especies animales (gallinas y pavos). De forma similar se observaron resultados negativos con las cepas de vaca, lo cual podría deberse a que las reses sacrificadas tengan distinta alimentación (pasto libre o ganadería intensiva), cosa que cambiaría la composición de la microbiota gastrointestinal (Dethlefsen y col. 2006; Mai 2004; Zoetendal y col. 2004) y por lo tanto condicionaría el tipo de bacteriófagos presentes.

En el caso de las muestras de agua de río, con una carga fecal moderada, predominó la detección de fagos de la cepa GA17, y el resto sólo ocasionalmente. Esto es debido a que la contaminación en esta zona del río es mayoritariamente humana, con algún aporte ocasional animal.

Las cepas en general no detectaron fagos en aguas de origen fecal diferente al suyo propio, salvo algunas excepciones. En el caso de estos falsos-positivos, la densidad

de fagos detectados fue mucho menor a los de la cepa específica, cosa que permite la correcta identificación del origen de la muestra.

Los bacteriófagos detectados con todas las cepas seleccionadas mostraron una morfología *Siphoviridae*, la cual es la predominante dentro de los fagos que infectan especies de *Bacteroides* (Booth y col. 1979; Lasobras y col. 1997; Queralt y col. 2003).

En conclusión, las cepas de *Bacteroides* específicas de huésped son una herramienta muy útil y prometedora para la detección del origen de la contaminación fecal. En la región estudiada se seleccionaron los huéspedes humano, bovino, porcino y aviar por ser las fuentes contaminantes predominantes (ciudades, ganadería e industria cárnica). Las cepas seleccionadas deberán ser testadas con aguas de diferentes orígenes geográficos para comprobar su utilidad más allá de la región de estudio. Estudios anteriores indican que no todas las cepas tienen la misma capacidad de detección de fagos específicos de diferentes orígenes geográficos, como es el caso de GA17, la cual proporcionó una elevada detección en muestras de zonas del sur europeo y, en menor medida, en Suecia (Payán y col. 2005).

Como se ha descrito previamente, la combinación de diferentes indicadores de MST proporcionará una mejor discriminación del origen contaminante (Belanche-Muñoz y Blanch 2008; Blanch y col. 2006). Los fagos de cepas de *Bacteroides* específicas de humano, por su especificidad y precisión, han sido incluidos como parámetros en programas de aprendizaje inductivo desarrollados para MST (Belanche-Muñoz y Blanch 2008).

El método escogido presenta unas ventajas importantes dentro de MST. Es un método sencillo, barato, requiere equipamiento básico de laboratorios de microbiología, rápido y no requiere personal altamente cualificado.

#### **Informe del factor de impacto**

El artículo *Isolation of bacteriophage host strains of Bacteroides species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water* fue publicado en junio de 2011 en la revista *Environmental Microbiology* (**13**:1622-1631).

Esta revista se encuentra dentro del primer cuartil del área temática de Microbiología (14/114) con un factor de impacto para el año 2011 de 5,843.

#### **Informe de coautoría**

La doctoranda llevó a cabo la mayor parte de las tareas experimentales, incluyendo el aislamiento de muchas de las cepas, su caracterización y los análisis de infectividad posteriores. Además participó en la redacción del artículo y la elaboración de las tablas y figuras.

Dr. Anicet R. Blanch

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Muniesa

# Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water

Marta Gómez-Doñate,<sup>1</sup> Andrey Payán,<sup>2</sup>  
Ivania Cortés,<sup>1</sup> Anicet R. Blanch,<sup>1</sup>  
Francisco Lucena,<sup>1</sup> Juan Jofre<sup>1</sup> and Maite Muniesa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, University of  
Barcelona-Institut de l'aigua, Diagonal 645, E-08028,  
Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico.  
Facultad de Salud. Universidad del Valle. Calle 3A  
#36B-05. Edificio 134. Espacio 206. Cali, Colombia.

## Summary

Microbial source tracking (MST) methods allow the identification of specific faecal sources. The aim is to detect the sources of faecal pollution in a water body to allow targeted, efficient and cost-effective remediation efforts in the catchment. Bacteriophages infecting selected host strains of *Bacteroides* species are used as markers to track faecal contaminants in water. By using a suitable *Bacteroides* host from a given faecal origin, it is possible to specifically detect bacteriophages of this faecal origin. It can thus be used to detect specific phages of *Bacteroides* for MST. With this objective, we isolated several *Bacteroides* strains from pig, cow and poultry faeces by applying a previously optimized methodology used to isolate the host strains from humans. The isolated strains belonged to *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*. These strains, like most *Bacteroides* species, detected phages of the *Siphoviridae* morphology. Using the newly isolated host strains for phage enumeration in a range of samples, we showed that these detect phages in faecal sources that coincide with their own origin (70–100% of the samples), and show no detection or very low percentages of detection of phages from other animal origins (from 0 to 20% of the samples). Only strains isolated from pig wastewater detected phages in 50% of human sewage samples. Nevertheless, those strains detecting phages from faecal

origins other than their own detected fewer phages (2–3 log<sub>10</sub> pfu·100 ml<sup>-1</sup>) than the phages detected by the specific strain of the same origin. On the basis of our results, we propose that faecal source tracking with phages infecting specific *Bacteroides* host strains is a useful method for MST. In addition, the method presented here is feasible in laboratories equipped with only basic microbiological equipment, it is more rapid and cost-effective than other procedures and it does not require highly qualified staff.

## Introduction

Water-borne diseases transmitted by the faecal–oral route make a significant contribution to the burden of diseases worldwide (WHO, 2008). Consequently, faecal pollution is a global public health concern. For example, in the USA the pathogen load is one of the main causes of freshwater body impairment (USEPA, 2004). Microbial pollutants can reach water bodies through direct discharge of faecal waste or raw wastewater, secondary effluents from wastewater treatment works, combined sewer and sanitary overflows, animal husbandry activities, the wastewaters of abattoirs and the meat industry, and wildlife (USEPA, 2004). The contribution of each of these faecal sources to the pathogen load varies strongly from watershed to watershed.

The determination of individual faecal pathogens in environmental samples is limited by the relatively costly analyses and the relatively low concentration of pathogens expected in water bodies (IAWPRC, 1991; Leclerc *et al.*, 2001; Harwood *et al.*, 2005). To avoid this problem, the use of indicator microorganisms, which are not themselves dangerous to health but indicate a health risk, is recommended (Anonymous, 1998). Traditionally, enumeration of faecal indicator bacteria (e.g. faecal coliforms, *Escherichia coli*, enterococci, etc.) is used, since it allows the assessment of microbial water quality (Anonymous, 1998). In addition, certain viruses that infect enteric bacteria have been proposed and studied as indicators for viruses (IAWPRC Study Group, 1991; Armon and Kott, 1996; Grabow, 2001; Jofre, 2002; 2007; Lucena and Jofre, 2010), and some have recently been included in a number of regulations on water quality (Anonymous,

Received 18 October, 2010; accepted 23 February, 2011. \*For correspondence. E-mail mmuniesa@ub.edu; Tel. (+34) 93 4039386; Fax (+34) 93 4039047.

2001b; Queensland Government, 2005; USEPA, 2006). These parameters are indicative of the potential presence of pathogens of faecal origin in a water resource (WHO, 2008).

The use of faecal indicators, however, does not provide information about the source of the pollution because indicators may originate from humans (usually wastewater), livestock or wild animals. Microbial source tracking (MST) methods allow the identification of specific faecal source groups. The aim is to detect the sources of faecal pollution in a water body (Malakoff, 2002) to allow targeted, efficient and cost-effective remediation efforts in the catchment. Increasing awareness of the importance of methods to distinguish between the sources of faecal pollution has led to the development and introduction of numerous novel faecal source-tracking techniques, many of which have recently been reviewed (Field and Samadpour, 2007; Santo-Domingo and Sadowsky, 2007; Stoeckel and Harwood, 2007).

Among these methods, bacteriophages that infect *Bacteroides* are potential tools for MST (Tartera *et al.*, 1989; Grabow *et al.*, 1995; Puig *et al.*, 1999; Blanch *et al.*, 2006). *Bacteroides* host strains vary in their capacity to discriminate between phages from different sources. Some strains do not discriminate between sources of pollution, such as *Bacteroides fragilis* strain RYC2056 (Puig *et al.*, 1999), while others are very specific for human faecal pollution, such as *Bacteroides thetaiotaomicron* strain GA17 (Payán *et al.*, 2005). A method has been described for the isolation of a suitable host with the capacity to detect bacteriophages from a given source (Payán *et al.*, 2005). This method has been successfully applied in several geographical areas to isolate strains that discriminate phages from human faeces (Payán *et al.*, 2005; Ebdon *et al.*, 2007; Vijayavel *et al.*, 2010).

The limitations of current source-tracking methods (Harwood, 2007; Ballesté *et al.*, 2010), combined with the satisfactory source-tracking performance of human-specific *Bacteroides* strains in several regions (Payán *et al.*, 2005; Ebdon *et al.*, 2007; Vijayavel *et al.*, 2010),

prompted our search for new *Bacteroides* host strains detecting phages from faecal sources of animal origin. Here we describe new strains isolated for MST that showed discriminatory capability for the bacteriophages from cattle, pig and poultry, thereby confirming the suitability of the method for isolating and further testing *Bacteroides* host strains.

## Results

### *Procedure for isolation of new hosts for phages infecting Bacteroides from a range of animal faecal sources*

The number of samples used to isolate strains from each faecal origin is summarized in Table 1. Fifty per cent of the putative *Bacteroides* colonies from *Bacteroides* bile esculine agar (BBEA) (black colonies with a black-dark halo) (Livingston, 1978) were Gram-negative rods, strictly anaerobic, and showed good growth in BPRM liquid culture (Table 1). They were therefore used for bacteriophage detection. Those detecting phages of the same faecal origin were first selected. Strain RYC2056, which does not have discriminatory capabilities, was used to assess the densities of bacteriophages of *Bacteroides* in the samples. In order to select those specific strains able to detect the largest densities of phages in the samples of the same origin, the number of phages detected by the specific isolates were compared with those detected with RYC2056. Those specific strains detecting phages in similar densities to RYC2056 were selected (specific isolates in Table 1).

To check for discriminatory capability, these isolates were used for phage enumeration of reference phage suspensions of wastewaters from other animal origins. Those unable to propagate phages from other faecal origins, therefore showing no plaques or very low pfu, were finally selected and used for further analysis of a large set of natural samples containing faecal pollution of a single origin. The selected strains were CW18 and

**Table 1.** *Bacteroides* isolates obtained using waters contaminated with faecal wastes of different animals.

Faecal origin	<i>n</i> <sup>a</sup>	FC (cfu·100 ml <sup>-1</sup> )	SOMCPH (pfu·100 ml <sup>-1</sup> )	Number of potential <i>Bacteroides</i> growing in BPRM	Number of specific isolates <sup>b</sup>	Selected strains
Cattle	10	1.7 × 10 <sup>7</sup> (2.5 × 10 <sup>7</sup> )	1.1 × 10 <sup>6</sup> (1.4 × 10 <sup>6</sup> )	151	5	CW18 CW50
Pig	10	1.2 × 10 <sup>8</sup> (1.3 × 10 <sup>8</sup> )	7.6 × 10 <sup>7</sup> (1.1 × 10 <sup>8</sup> )	90	6	PG76 PG1226
Poultry	18	9.4 × 10 <sup>7</sup> (3.6 × 10 <sup>7</sup> )	1.8 × 10 <sup>6</sup> (1.8 × 10 <sup>6</sup> )	118	18	PL122

a. Number of samples used for isolation of *Bacteroides* strains.

b. Strains detecting phages specifically for its faecal origin and detecting numbers of phages similar to those detected by strain RYC2056. SD in brackets.

FC, faecal coliforms, SOMCPH, somatic coliphages, BPRM, *Bacteroides* phage recovery medium.



**Table 2.** Biochemical and genotypic identification of the *Bacteroides* strains.

Strain	Origin	API 20a % ID	16S rDNA % ID	Size of sequenced fragment (bp)	Identification	Sequence homologue (GenBank code)
CW18	Cattle	90.0	98.0	1300	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	AY895188.1
CW50	Cattle	90.0	99.0	1340	<i>Bacteroides fragilis</i>	AB510701.1
PG76	Pig	89.1	99.0	1400	<i>Bacteroides fragilis</i>	X83937.1
PG1226	Pig	89.1	99.0	1441	<i>Bacteroides fragilis</i>	X83937.1
PL122	Poultry	99.7	98.0	1390	<i>Bacteroides fragilis</i>	EU136678.1

CW18, CW50: specific strains for cattle faecal pollution; PG76, PG1226: specific strains for pig faecal pollution; PL122: specific strain for poultry faecal pollution.

CW50 for specific detection of bacteriophages from wastewater with faecal contamination from cattle, strains PG76 and PG1226 for phages from faecal pollution from pigs and PL122 for those from poultry (Table 1).

#### Identity of the *Bacteroides* strains selected

Strains CW18, CW50, PG76, PG1226 and PL122 were identified by molecular methods using the sequence of 16S rRNA and biochemical identification (Table 2). Both analyses showed coincident results, with percentages of identity higher than 98% for 16S rDNA sequencing and higher than 89.1% for biochemical identification. All strains were identified as *Bact. fragilis*, except one isolated from cattle wastewater, which was identified as *B. thetaiotaomicron*.

#### Morphology of bacteriophages infecting the strains selected

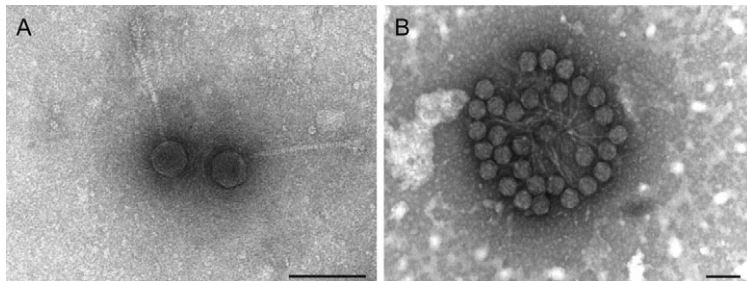
Five phages from wastewater samples infecting each isolated strain were characterized by electron microscopy. All 25 phages belong to *Siphoviridae* (Van Regenmortel *et al.*, 2000) morphological type and showed long non-contractile tails approximately 150 nm long and isometric heads of 53–55 nm in diameter (Fig. 1A). Some variability was observed in the length and shape of the tail. Moreover, after enrichment, many phage isolates exhibited wheel-shaped clusters composed of many phages linked by the tips of their tails (Fig. 1B).

#### Evaluation of the discriminatory capacity of the *Bacteroides* strains in natural wastewater containing faecal pollution of a single origin

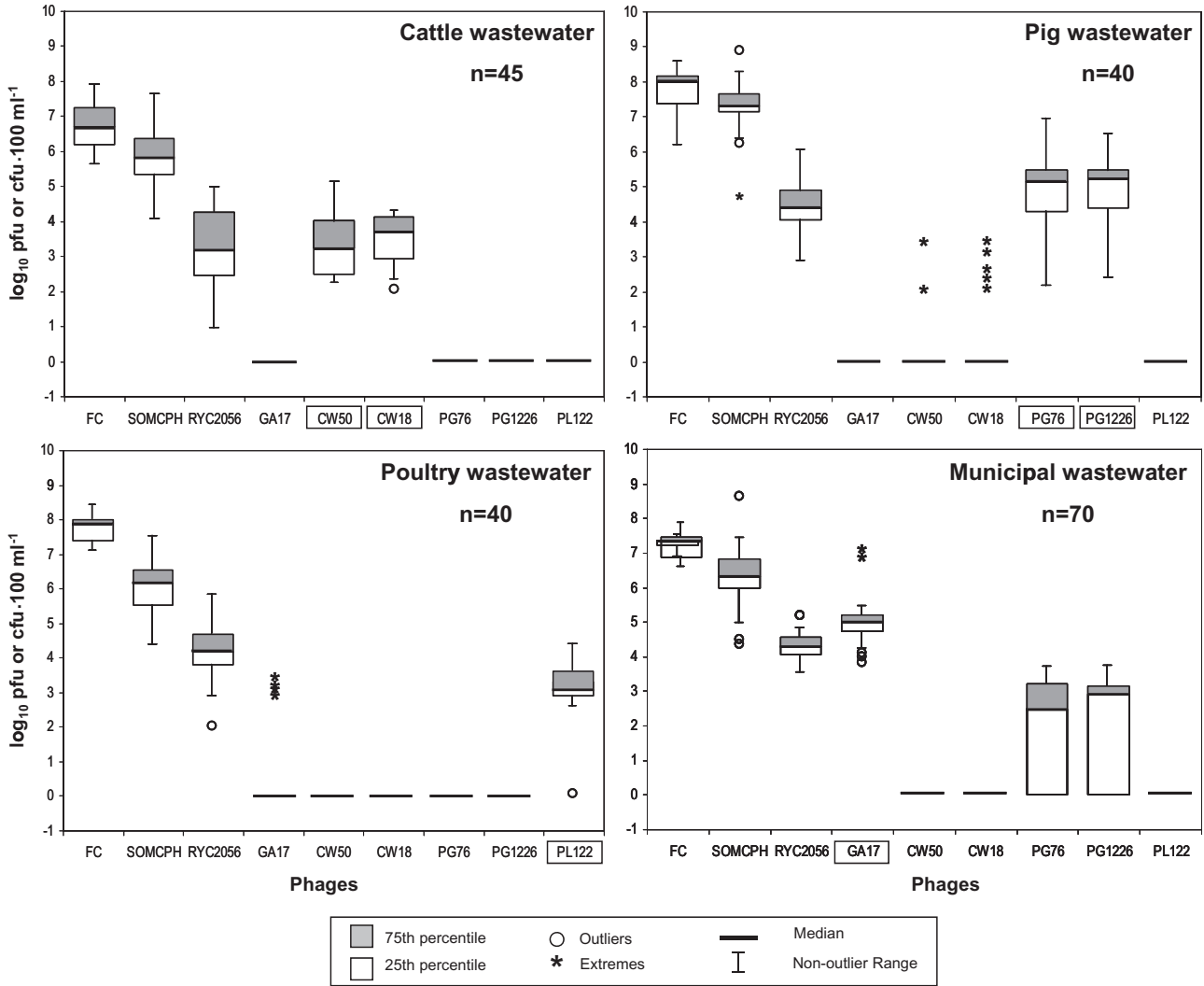
The five strains mentioned above were further used as host strains to quantify phages from wastewater samples containing faecal waste from cattle, pigs and poultry and municipal raw sewage of mostly human origin (Fig. 2). The five host strains provided clear plaques, with the exception of strain PL122, which gave some turbid ones. However, in most samples tested up to this point, the turbid plaques were still visible and the presence of few turbid plaques did not impair the interpretation of results. Despite the presence of few turbid plaques, strain PL122 was selected since it gave the best results regarding discriminatory capability and levels of phages detected.

**Detection of phages from the same faecal origin.** The five strains detected a significant ( $P < 0.05$ ) number of phages in samples containing animal faecal pollution of the same origin as that from which they were isolated, compared with the strains from other origins. While strains PG76 and PG1226, or strain GA17, described previously (Payán *et al.*, 2005), detected phages in 100% of samples of the same origin, strains CW18, CW50 and PL122 showed a lower percentage of positive samples from their own origin (Table 3).

The densities of phages detected by the selected strains was similar to that of reference strain RYC2056, which does not discriminate between the origins of faecal



**Fig. 1.** Electron micrographs showing the *Siphoviridae* morphological type of the phages infecting *Bacteroides* strains. A. Phages infecting *Bacteroides* strain PG76. B. Wheel-shaped clusters of phages infecting *Bacteroides* strain GA17. Bar 100 nm.



**Fig. 2.** Box plots of phages concentrations detected by the five selected *Bacteroides* strains (CW18, CW50, PG76, PG1126 and PL122) in cattle, pig and poultry wastewater samples and in municipal raw sewage samples. Phages infecting strain RYC2056 and somatic coliphages (SOMCPH) were included as representative of the levels of faecal pollution in the samples. Phages infecting *Bacteroides* strain GA17 were included as representative of the levels of human faecal pollution in the samples. Values beneath the detection limit (20 pfu per 100 ml) were assigned a value of zero. Extreme values are defined as observations in a sample, so far separated in value from the remainder as to suggest that they may be from a different population, or the result of an error in measurement. Extreme values are subdivided into outliers: extreme values detected between the 95% and 99% confidence levels; and extremes: extreme values at > 99% confidence level. Those samples showing 0 pfu·100 ml<sup>-1</sup> were transformed to log<sub>10</sub> (+1) pfu·100 ml<sup>-1</sup> in the figure.

**Table 3.** Percentage of samples where bacteriophages have been detected with the respective *Bacteroides* strain.

Faecal origin of sample	Number of samples	<i>Bacteroides</i> strains						
		RYC2056	GA17	CW50	CW18	PG76	PG1126	PL122
Municipal sewage (human)	70	100.0	100.0	0.0	0.0	50.0	57.0	0.0
Cattle wastewater	45	100.0	0.0	75.0	70.0	0.0	0.0	0.0
Pig wastewater	40	100.0	0.0	7.5	20.0	100.0	100.0	0.0
Poultry wastewater	40	100.0	12.5	0	0	0.0	0.0	83.0

RYC2056: *Bacteroides* strain not specific for any faecal source; GA17: *Bacteroides* strain specific for human faecal pollution; CW18, CW50: specific strains for cattle faecal pollution; PG76, PG1226: specific strains for pig faecal pollution; PL122: specific strain for poultry faecal pollution.

pollution, indicating that they are useful for tracking purposes. Thus, strains PG76 and PG1226 detected significantly ( $P < 0.05$ ) greater numbers of phages than RYC2056 in wastewaters contaminated with pig faecal waste. In contrast, strains deriving from cows (CW18 and CW50) and poultry (PL122) detected slightly lower numbers of phages than RYC2056 in the faecal wastewaters of these animals, respectively, although the differences among cattle strains and RYC2056 was not significant ( $P > 0.05$ ).

*Discrimination of phages from other faecal origins.* All the strains showed the capacity to discriminate between animal faecal sources and mostly failed to detect bacteriophages in animal wastewaters of origins other than their own. None of the five strains of animal origin detected bacteriophages in municipal wastewater at concentrations similar to, or higher than, those observed using strain RYC2056 or the human-specific strain GA17. Indeed, CW18, CW50 and PL122 did not detect any phages in human samples. Only strains PG76 and PG1226 detected some bacteriophages in wastewater samples (Table 3), although the values detected were from 2 to 3 log<sub>10</sub> units lower than those detected using strain GA17 (Fig. 2). In addition, the animal strains did not detect phages in wastewater of animal origin other than their own, except a few pig wastewater samples where phages were detected with strains CW50 and CW18 in pig wastewater (Table 3). Again these strains showed a mean of phage densities 3 log<sub>10</sub> units lower (Fig. 2) than the densities of phages detected with the specific pig isolates.

#### Analysis of river water

The selected *Bacteroides* strains were used to detect bacteriophages in river water containing mixed faecal pollution. This point of the river goes through an industrial area and receive discharges of secondary effluents of municipal wastewater treatment plants, therefore the samples held an intermediate level of faecal contaminants, as shown by the concentrations of traditional microbial indicators (Table 4). The number of samples

containing phages infecting strain GA17 (100%), the concentration of these phages and their numerical relationship with the traditional faecal indicators indicate that the largest input of faecal contaminants is of human origin. This observation is consistent with our knowledge of the Llobregat River and the information supplied by regional water authority (Catalan Water Agency, ACA <http://aca-web.gencat.cat/aca>). Low and occasional amounts of contamination from cattle, pigs and poultry were also detected by the specific strains.

#### Discussion

The efficiency of the method to isolate specific *Bacteroides* strains from animal origin suitable for source tracking is similar to that described previously for human-specific strains (Payán *et al.*, 2005; Ebdon *et al.*, 2007; Vijayavel *et al.*, 2010). The discriminatory capability of the selected strains for their own faecal source is clearly demonstrated in this study, in highly polluted wastewaters but also in river water, with a lower faecal content and some faecal animal inputs. As mentioned above, some strains fail to detect phages in a few samples from their own origin. Several explanations could account for these observations. In the case of PL122, most of the samples tested corresponded to wastewater from abattoirs that slaughter different species, mostly hens and turkeys. In the case of CW18 and CW50, most of the samples tested contained faecal contamination from cows with different feeding patterns. Some were fed in extensive husbandry and some were pasturing freely. As described, differences in feed cause variations in the composition of gut microbiota (Mai, 2004; Zoetendal *et al.*, 2004; Dethlefsen *et al.*, 2006), and consequently in the type of bacteriophages present.

The strains do not detect phages from faecal origins different than their own origin, with few exceptions. In these exceptions the densities of phages detected by strains from other origins were lower than the densities of phages detected by the strain from the same origin, allowing identification of the source of pollution. These false-positive results could be attributable to the strains or to low levels of cross contamination from other sources in

**Table 4.** Values (cfu and pfu·100 ml<sup>-1</sup>) of faecal coliforms, somatic coliphages and phages infecting *Bacteroides* in Llobregat river water.

	FC	SOMCPH	RYC2056	GA17	CW50	CW18	PG76	PG1126	PL122
No. of positive samples/ total samples	27/27	27/27	23/27	27/27	0/15	2/15	6/15	0/15	5/15
Maximum value	$7.9 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$1.2 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	0	$2.5 \times 10^2$	$5 \times 10^1$	0	$5 \times 10^1$
Minimum value	$1.2 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	0	$5 \times 10^1$	0	0	0	0	0
Median	$2.5 \times 10^3$	$6.3 \times 10^3$	$7.9 \times 10^0$	$4.0 \times 10^2$	0	0	0	0	0

FC: faecal coliforms; SOMCPH: somatic coliphages; RYC2056: *Bacteroides* strain not specific for any faecal source; GA17: *Bacteroides* strain specific for human faecal pollution; CW18, CW50: specific strains for cattle faecal pollution; PG76, PG1226: specific strains for pig faecal pollution; PL122: specific strain for poultry faecal pollution.

the studied samples. However, the information available indicates that in the studied samples, the faecal input from an origin other than that indicated would be very unlikely and the densities would be too low to be detected by our strains.

The phages detected by the selected strains show *Siphoviridae* morphology, which is by far the most frequently described for phages infecting *Bacteroides* species (Booth *et al.*, 1979; Lasobras *et al.*, 1997; Queralt *et al.*, 2003). These phages form wheel-shaped clusters, as shown in Fig. 1. This characteristic trend has been previously reported in bacteriophages infecting *Bacteroides* species (Lasobras *et al.*, 1997).

In conclusion, *Bacteroides* host strains are useful for discriminating sources of faecal contamination of human and animal origin, and emerge as promising tools for MST studies in our region, where faecal contamination is due mostly to the human population, pig, cattle and poultry husbandry and derived meat industries. The strains selected should be tested in future studies to evaluate their usefulness in different geographical locations. Previous experience indicates that not all strains have the same ability to detect specific phages from different geographical areas. As an example, strain GA17 is extremely promising for the future of source tracking in Southern Europe, and to a lesser extent in Sweden (Payán *et al.*, 2005). In contrast, data for the UK were not as promising. Therefore, by using the same methodology, another strain, which showed excellent discriminatory capability for human faecal sources, was isolated from UK municipal sewage (Ebdon *et al.*, 2007). Similarly, this methodology has been applied successfully in other non-EU countries (Vijayavel *et al.*, 2010), and again an excellent discriminatory host strain (HB-73) has been isolated for a practical implementation of the enumeration of faecal source-specific bacteriophages in the local area. The methodology described can be applied in each country for the isolation of the most suitable strain for specific bacteriophage detection, which is the ultimate objective of this study. The appropriate host strain should then be used in a standard method (Anonymous, 2001a).

As our group has already described (Blanch *et al.*, 2006; Belanche-Muñoz and Blanch, 2007) but also in agreement with other authors, the combination of several MST indicators is required for assessing faecal sources. This combination will give a more accurate result in the identification of the source of pollution than the use of a single method and in addition, will allow the detection of different faecal sources of pollution, if present in the sample. Host-specific *Bacteroides* phages related to faecal origins (human-related) have been selected by inductive learning machine methods among many proposed MST indicators because of their specificity and accuracy (Belanche-Muñoz and Blanch, 2007). We

propose that the detection of phages of *Bacteroides* with specific strains should be included as a complement to other MST methods. Moreover, phages, those proposed as indicators (somatic coliphages, F-specific RNA phages or phages infecting *Bacteroides*) among others, have been shown to survive successfully in aquatic environments (Durán *et al.*, 2002), sometimes better than their bacterial hosts (Muniesa *et al.*, 1999).

The method presented here is feasible for use in laboratories equipped with only basic microbiological apparatus as it is more rapid and cost-effective than other procedures and, in addition, it does not require expertise in molecular biology.

## Experimental procedures

### Strains and bacteriophages

*Bacteroides fragilis* RYC2056 (ATCC700786) (Puig *et al.*, 1999) and *B. thetaiotaomicron* GA17 (Payán *et al.*, 2005) were used as host strains for phage detection in this study. Strain RYC2056 does not discriminate between faecal sources and was used as a control, while strain GA17 is specific for the detection of phages from human faecal sources. Bacteriophage B56-3 (ATCC700786-B1) was used as reference bacteriophage specifically infecting strain RYC2056 and used as control of the method, as indicated in the ISO standardized method (Anonymous, 2001a). *Escherichia coli* WG5 was used as host strain for the detection of somatic coliphages (Anonymous, 2000).

### Media and culture conditions

*Bacteroides* bile esculine agar (BBEA) (Livingston, 1978) was used for the recovery of *Bacteroides* from wastewater samples. The BBEA composition in 1 l was as follows: bile, 20.0 g; tryptone soy agar, 40.0 g; esculine, 1.0 g; ammonium ferric citrate, 0.5 g; and haemin, 10 ml of a 0.1% (w/v) solution, made up in NaOH 0.02%. The medium was sterilized at 121°C for 15 min. The pH was adjusted to  $6.8 \pm 0.5$  by aseptically adding HCl 35%. Finally, 10 ml of 1% gentamicin (w/v) was added to 1 l of the medium after sterilization.

*Bacteroides* phage recovery medium (BRPM) was used to culture the host strain as well as for phage assays, as indicated in the ISO standardized method (Anonymous, 2001a). *Bacteroides* is an obligate anaerobe. However, this genus does not require handling under strict anaerobic conditions. Manipulation was performed in aerobic conditions while incubation of cultures and agar plates was performed at 36°C for 18 or 48 h in anaerobic jars (GasPak; BBL, Hampshire, UK) with CO<sub>2</sub> atmosphere generators (Anaerocult A; Merck, Darmstadt, Germany). When using liquid media, the containers were completely filled and sealed with a screw cap lid.

For detection of somatic coliphages, 1 ml of serial decimal dilutions of the respective wastewater samples in Ringer solution were analysed using Modified Scholten's Broth or Modified Scholten's agar and strain WG5 as host as described in ISO standard methods (Anonymous, 2000).



### Wastewater samples

Wastewater samples from slaughterhouses and farms were collected in sterile containers, transported to the laboratory within 2 h of collection and processed immediately for bacterial isolation as described below. An aliquot of each sample was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  with glycerol added to a final concentration of 10% and used for bacteriophage enumeration with the selected strains.

The information available from slaughterhouses and farms and our previous experience in other MST studies (Blanch *et al.*, 2006), allowed us to rule out the possibility that the wastewaters collected had received any input of faecal contaminants from animals other than those considered in this study. These samples, which contained faeces from cattle (45 samples collected from two slaughterhouses and four farms), pigs (40 samples from nine different farms) and poultry (40 samples from two slaughterhouses) were collected during a period of 3 years. Samples were used as a source of *Bacteroides* strains and bacteriophages infecting either the reference host strain RYC2056, GA17 or the new *Bacteroides* host strains isolated. Seventy raw influent samples from two municipal wastewater treatment plants receiving municipal wastewater were collected during a period of 3 years and were also included in the study as a source of bacteriophages from human origin. Bacteriophages infecting the *Bacteroides* strains were determined in 5 ml of samples.

Levels of faecal contamination present in the samples used to isolate *Bacteroides* strains were established by enumerating faecal coliforms (FC) using membrane filtration, as described in standard methods of the APHA (Anonymous, 1998) while somatic coliphages (SOMCPH) were enumerated following ISO Anonymous (2000) (Table 1).

### River water samples

Twenty-seven samples were collected from the lower course of the river Llobregat. According to the regional water authority (<http://aca-web.gencat.cat/>), this watercourse is subjected to heavy anthropogenic pressure, mostly via discharges of secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. The scarce and irregular contribution of animal faecal contaminants is from husbandry activities, mostly swine, in the upper course and occasional wild birds in the lower course. Grab samples were collected approximately every 2 months over 2 years from mid-stream in the lower course of the river. Bacteriophages in 100 ml of Llobregat river water were concentrated by adsorption to nitrate-acetate membrane filters, followed by elution using the method first described by Sobsey and colleagues (1990). Briefly,  $\text{MgCl}_2$  was added to the water sample to reach a final concentration of  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$ . The amended sample was then passed through an acetate-nitrate cellulose ester membrane filter,  $0.22 \mu\text{m}$  pore size, 47 mm diameter, at a filtration rate of about  $2 \text{ l h}^{-1}$ . Thereafter, the membrane was cut into eight fragments and placed in a glass flask containing 5 ml eluting solution (1% beef extract,  $0.05 \text{ mol l}^{-1}$  NaCl and 3% Tween 80). The flask was placed in an ultrasound cleaning bath for 4 min. and the eluted bacteriophages were enumerated as described above.

### Bacteriophage enumeration

Phages infecting *Bacteroides* were enumerated using the double agar layer plaque assay, as previously described (Anonymous, 2001a). *Bacteroides fragilis* strain RYC2056 was used as a host control. Wastewater samples containing pollution of each origin was used as a source of bacteriophages. Only those host strains showing bacteriophage densities similar to or higher than RYC2056 were selected for further analysis.

### Preparation of reference phage suspensions

When necessary, reference suspensions of phages naturally occurring in wastewater samples from each faecal origin were prepared as previously described (Mendez *et al.*, 2002). Briefly, wastewater samples were centrifuged at  $1000 g$  for 20 min. and bacteriophages were enumerated using *Bact. fragilis* RYC2056 as described above. Samples were diluted when necessary in order to reach between 100 and 300 pfu per ml. Glycerol was then added to a final concentration of 10%. These phage suspensions were distributed to vials (2 ml) and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . These reference materials were tested for *intra* and *inter* vial homogeneity (number of pfu  $\text{m}^{-1}$  was equivalent in all vials) and stability (number of pfu  $\text{ml}^{-1}$  remained stable after storage at  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Homogeneity and stability were very high. The reference phage suspensions were used for an initial rapid evaluation of the potential host isolates as described below.

### Procedure for isolation of new hosts for phages infecting Bacteroides

*Bacteroides* host strains were isolated using the method previously described (Payán *et al.*, 2005). The method is divided in three steps: first, isolation of *Bacteroides* strains; second, specificity of the isolates to detect phages from their own origin; and third, capability of the selected isolates to discriminate phages from different faecal origins.

*Isolation of Bacteroides strains.* Decimal dilutions of environmental samples were plated onto BBFA plates and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 48 h in anaerobic conditions, as described above. The isolation method used for *Bacteroides* strains of poultry faecal contamination was adjusted during this study. Given the higher avian body temperature, which reaches an average of  $42\text{--}43.5^{\circ}\text{C}$  (Proctor and Lynch, 1993), several degrees warmer than most mammals, the *Bacteroides* strains were isolated and grown at  $42^{\circ}\text{C}$  instead of  $37^{\circ}\text{C}$ , the latter used for the strains from the other faecal sources. Our results showed a larger number of black colonies grown in BBFA. This observation increased the likelihood of isolating a suitable strain for our purposes. This approach was not used for the other animal sources since no differences were observed in the number of colonies grown at  $37^{\circ}\text{C}$  and  $42^{\circ}\text{C}$ .

Colonies suspected to be *Bacteroides* (Livingston, 1978) were picked and plated for pure culture on BBFA plates under aerobic and anaerobic conditions, as described (Payán *et al.*, 2005). The Gram stain of those strains growing only under strict anaerobic conditions was determined. All

Gram-negative obligate anaerobic rods were grown in BPRM broth as described above.

*Specificity of the selected strains for phages from their own faecal origin.* Cultures showing good growth after overnight incubation were used for bacteriophage enumeration using a reference phage suspension of the same animal origin. Twenty reference phage suspensions prepared from different samples of each origin were used at this stage. Those strains detecting phages from their own origin were selected. Since the aim was to select those isolates detecting the largest densities of phages, the number of phages detected by each strain was compared with the number of phages detected by the control not-discriminatory strain RYC2056 in the same reference material. The criterion was to select as many isolates as possible showing similar phage densities as RYC2056. Those isolates were processed for further analyses. The number of isolates detected at this stage can vary from sample to sample.

*Discriminatory capability of the selected strains for phages from other faecal origins.* To assess the discriminatory capability of the selected strains for different faecal origins, the ones selected in the previous section were used to enumerate bacteriophages from reference material of phages from municipal sewage and from wastewater samples from other faecal origins. Those isolates unable to propagate phages from different faecal origin, therefore showing no plaques or very low number of pfu with these samples, were selected as potential new hosts for faecal source tracking. When possible, more than one isolate was selected. The selected isolates were then used to enumerate phages in natural wastewaters samples contaminated with human or animal (cattle, pig and poultry) faecal waste.

#### Identification of the bacterial isolates

Bacterial isolates were biochemically identified using the API 20A biochemical test strip (Biomérieux, France) following the manufacturer's instructions. Further characterization was achieved by amplification and sequencing of the 16S rDNA. Chromosomal DNA from the bacterial isolates was extracted following Hofmann and Brian (1991), and 1 µl of DNA was used for PCR amplification. This procedure for the detection of the 16SrDNA gene was performed with the following primers: Upper Bact16S GCTACCTTCTTACGACTT and Lower Bact16S GAGCCAGAATCAAACCTC (Weisburg *et al.*, 1991), as previously described (Payán *et al.*, 2005). The 1488 bp amplicons were electrophoretically analysed in a 1% agarose gel and bands were viewed by ethidium bromide staining. The bands were excised from the gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, USA), following the manufacturer's instructions. The purified amplicons were used as a template for sequencing. Sequencing was performed with the ABI PRISM Big Dye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Spain) in an ABI PRISM 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Spain), following the manufacturer's instructions. All sequences were performed in duplicate. BLAST analysis searches for homologous DNA sequences in

the GenBank database libraries were carried out with the tools available on the National Institutes of Health (NIH) webpage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### Electron microscopy

Five plaques of the bacteriophages infecting each *Bacteroides* strain were isolated from the agar plate and propagated to achieve a high titre phage suspension ( $10^9$  pfu ml<sup>-1</sup>) of each bacteriophage, as previously described (Queralt *et al.*, 2003). A drop of this phage suspension was deposited on copper grids with carbon-coated Formvar films and stained with 2% KOH phosphotungstic acid (pH 7.2) for 2.5 min. Samples were examined in a Hitachi E.M. 800 electron microscope operating at 80 kV.

#### Statistical analyses

A non-parametric Kruskal–Wallis test was used to assess differences in medians of bacteriophage concentrations. Alpha levels of 0.05 were used to evaluate the differences. The data corresponding to wastewaters are presented as box plot. All statistical calculations were performed using STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. StatSoft (2007) <http://www.statsoft.com>.

#### Acknowledgements

Authors thank Sergi Ramirez, from PADESA (PAVOS Y DERIVADOS, S.A.), for providing the poultry samples used in this study. This study was supported by the Generalitat de Catalunya (2009SGR1043), by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2007-65980-C02-01) and by the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB). M. Gómez-Doñate is a recipient of a grant FI from the Generalitat de Catalunya.

#### References

- Anonymous (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edn. Washington, DC, USA: American Public Health Association.
- Anonymous (2000) *ISO 10705-2: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages – Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages*. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardisation.
- Anonymous (2001a) *ISO 10705-4: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages – Part 2: Enumeration of Bacteriophages Infecting Bacteroides fragilis*. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardisation.
- Anonymous (2001b) Loi sur la qualité de l'environnement: règlement sur la qualité de l'eau potable c. Q-2, r.18.1.1. *Gazette Officielle du Québec* **24**: 3561.
- Armon, R., and Kott, Y. (1996) Bacteriophages as indicators of pollution. *Crit Rev Environ Sci Technol* **26**: 299–335.
- Ballesté, E., Bonjoch, X., Belanche, L.A., and Blanch, A.R. (2010) Molecular indicators used in the development of

- predictive models for microbial source tracking. *Appl Environ Microbiol* **76**: 1789–1795.
- Belanche-Muñoz, L., and Blanch, A.R. (2007) Machine learning methods for microbial source tracking. *Environ Model Soft* **23**: 741–750.
- Blanch, A.R., Belanche-Muñoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., *et al.* (2006) Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5915–5926.
- Booth, S.J., Van Tassell, R.L., Johnson, J.L., and Wilkins, T.D. (1979) Bacteriophages of *Bacteroides*. *Rev Infect Dis* **1**: 325–334.
- Dethlefsen, L., Eckburg, P.B., Bik, E.M., and Relman, D.A. (2006) Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* **21**: 517–523.
- Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., and Jofre, J. (2002) Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J Appl Microbiol* **92**: 338–347.
- Ebdon, J., Muniesa, M., and Taylor, H. (2007) The application of a recently isolated strain of *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water Res* **41**: 3683–3690.
- Field, K.G., and Samadpour, M. (2007) Faecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res* **41**: 3517–3538.
- Grabow, W.O.K. (2001) Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* **27**: 251–268.
- Grabow, W.O.K., Neubrech, T.E., Holtzhausen, C.S., and Jofre, J. (1995) *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages. Excretion by humans and animals. *Water Sci Technol* **31**: 223–230.
- Harwood, V.J. (2007) Assumptions and limitations of microbial source tracking methods. In *Microbial Source Tracking*. Santo-Domingo, J., and Sadowsky, M. (eds). Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 33–64.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrar, S.R., and Rose, J.B. (2005) Validity of the indicator organisms paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3163–3170.
- Hofmann, M.A., and Brian, D.A. (1991) Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *Biotechniques* **11**: 30–31.
- IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (1991) Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res* **25**: 529–545.
- Jofre, J. (2002) Bacteriophages as indicators. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, Vol. 1. Bitton, G. (ed.). New York, USA: John Wiley and Sons, pp. 354–363.
- Jofre, J. (2007) Indicators of waterborne enteric viruses. In *Human Viruses in Water (Series Perspectives in Medical Virology)*. Bosch, A. (ed.). London, UK: Elsevier, pp. 227–249.
- Lasobras, J., Muniesa, M., Frias, J., Lucena, F., and Jofre, J. (1997) Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. *Water Sci Technol* **35**: 11–12.
- Leclerc, H., Mossel, D.A., Edberg, S.C., and Struijk, C.B. (2001) Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol* **55**: 201–234.
- Livingston, S.J. (1978) New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *J Clin Microbiol* **7**: 448–453.
- Lucena, F., and Jofre, J. (2010) Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. In *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*. Sabour, P.M., and Griffiths, M.W. (eds). Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 103–118.
- Mai, V. (2004) Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr Rev* **62**: 235–260.
- Malakoff, D. (2002) Microbiologists in the trail of polluting bacteria. *Science* **295**: 2352–2353.
- Mendez, J., Jofre, J., Lucena, F., Contreras, N., Mooijman, K., and Araujo, R. (2002) Conservation of phage reference materials and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. *J Virol Methods* **106**: 215–224.
- Muniesa, M., Lucena, F., and Jofre, J. (1999) Comparative survival of free shiga toxin 2-encoding phages and *Escherichia coli* strains outside the gut. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5615–5618.
- Payán, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., *et al.* (2005) Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophages host strains suitable for tracking sources of faecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5659–5662.
- Proctor, N.S., and Lynch, P.J. (1993) *Manual of Ornithology*. New Haven, CT, USA: Yale University Press.
- Puig, A., Queralt, N., Jofre, J., and Araujo, R. (1999) Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from faecally polluted wastewater. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1172–1176.
- Queensland Government (2005) Queensland Water Recycling Guidelines. Environmental Protection Agency. The State of Queensland. Australia [WWW document]. URL [http://www.derm.qld.gov.au/water/regulation/recycling/pdf/recycle\\_guidelines.pdf](http://www.derm.qld.gov.au/water/regulation/recycling/pdf/recycle_guidelines.pdf).
- Queralt, N., Jofre, J., Araujo, R., and Muniesa, M. (2003) Homogeneity of the morphological groups of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* strain HSP40 and strain RYC2056. *Curr Microbiol* **46**: 163–168.
- Santo-Domingo, J.W., and Sadowsky, M.J. (2007) *Microbial Source Tracking*. Washington, DC, USA: ASM Press.
- Sobsey, M.D., Schwab, K.J., and Handzel, T.R. (1990) A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male-specific RNA coliphages. *J Amer Wat Works Asso* **82**: 52–59.
- Stoeckel, D.M., and Harwood, V.J. (2007) Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2405–2415.
- Tartera, C., Lucena, F., and Jofre, J. (1989) Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2696–2701.
- USEPA (2004) Report to Congress. Impacts and control of CSOs and SSOs. EPA 833-R-04-001. Washington, DC, USA.
- USEPA (2006) National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule; Final Rule; 40 Cfr Parts 9, 141 and

142. In Federal Register, 71(26). Washington, DC, USA. pp. 65574–65660.
- Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., *et al.* (2000) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh ICTV Report.* San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Vijayavel, K., Fujioka, R., Ebdon, J., and Taylor, H. (2010) Isolation and characterization of *Bacteroides* host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. *Water Res* **44**: 3714–3724.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* **173**: 697–703.
- WHO (2008) *The Global Burden of Disease. 2004 Update.* Geneva, Switzerland: World Health Organization [WWW document]. URL [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/).
- Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koike, S., Mackie, R.I., and Gaskins, H.R. (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* **134**: 465–472.



### 3.2. Diseño de una qPCR de *Bifidobacterium* asociados a huésped



**Nuevo ensayo de PCR cuantitativa para la detección de *Bifidobacteriaceae* específicas de huésped para su uso en *Microbial Source Tracking*.**

Marta Gómez-Doñate, Elisenda Ballesté, Maite Muniesa y Anicet R. Blanch.

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona-Institut de l'aigua, Avenida Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

**Introducción**

La contaminación fecal del agua es un problema de salud pública a nivel mundial. El origen de dicha contaminación puede provenir de diversas fuentes: descarga directa de material fecal, efluentes secundarios de plantas de tratamiento de aguas, sanitarios, actividades ganaderas, mataderos, industria cárnica y fauna salvaje (USEPA 2004). Los microorganismos indicadores de contaminación fecal tradicionales (coliformes fecales, *Escherichia coli*, enterococos y clostridios reductores de sulfitos) no son capaces de discriminar el origen de dicha contaminación, cosa que impide la actuación y remediación directa sobre el foco contaminante. Por ello se utilizan microorganismos indicadores alternativos que puedan determinarlo. Estos microorganismos y nuevas metodologías se engloban con el término *Microbial Source Tracking* (MST).

En el capítulo anterior se estudió la aplicabilidad de los fagos de *Bacteroides* en MST. Este segundo capítulo se centra en el uso de bacterias del género *Bifidobacterium* para el desarrollo de nuevas metodologías aplicables en MST.

*Bifidobacterium* se propuso por primera vez como indicador de MST en 1983, cuando se asoció la fermentación del sorbitol a contaminación humana (Mara y Oragui 1983). *Bifidobacterium* spp. son bacterias anaerobias Gram-positivas que forman parte de la comunidad bacteriana del tracto digestivo de los mamíferos (Zoetendal y col. 2004). También se ha descrito que pueden estar presentes en la microbiota gastrointestinal de otros animales de sangre caliente como es el caso de las aves, y más concretamente, las aves de corral (Trovatelli y col. 1974).

La viabilidad de las bifidobacterias en el medio ambiente es limitada (Hagedorn y col. 2011), por lo que su presencia indica un aporte de carga fecal reciente (Bonjoch y

col. 2009). Esta baja prevalencia de bacterias viables comporta una gran limitación para los métodos dependientes de cultivo y, por tanto, implica una mayor importancia de las técnicas independientes de cultivo. Se han determinado marcadores moleculares, mayoritariamente asociados a secuencias del ARNr 16S, que han mostrado una gran efectividad en la detección e identificación del género (Kaufmann y col. 1997) o de especies concretas de *Bifidobacterium* en poblaciones mixtas (O’Riordan y Fitzgerald 1997; Satokari y col. 2001; Ventura y col. 2001; Yamamoto y col. 1992). Otros métodos moleculares como las PCR anidadas seguidas de una electroforesis en geles de gradiente desnaturizante (DGGE) han demostrado que existen cepas de *Bifidobacterium* específicas de huésped (Ballesté y Blanch 2011). Éste es el caso de *Bif. adolescentis* y *Bif. dentium*, asociadas a humanos, *Bif. saeculare* a aves de corral, *Bif. pseudolongum* a vaca y otras especies de la familia *Bifidobacteriaceae*, como *Neoscardovia arbecensis* (García-Aljaro y col. 2012), a cerdo.

#### Objetivos

- Diseñar un juego de cebadores comunes y sondas específicas de huésped (humano, bovino, porcino y aviar) para PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), a partir de la información obtenida de las bandas de DGGE específicas de huésped seleccionadas (Ballesté y Blanch 2011).
- Aplicar esta nueva qPCR para la detección y cuantificación de las cepas de *Bifidobacterium* específicas de huésped en muestras de agua con contaminación fecal de origen conocido.
- Comprobar la efectividad de las qPCRs con o sin extracción de ADN de las muestras y observar si existen diferencias significativas entre ambas metodologías.

#### Resultados

Las bandas específicas de huésped obtenidas de la DGGE correspondían a las cepas *Bif. adolescentis* en el caso de humano, *Bif. saeculare* para ave de corral, *Bif. pseudolongum* para bovino y, para porcino, *N. arbecensis*, tal y como fue identificada con posterioridad (García-Aljaro y col. 2012). A partir de la amplificación y posterior clonaje en el vector pGEM T-easy de los fragmentos del ARNr 16S seleccionados de las bandas de la DGGE de las cepas tipo, se obtuvieron las cuatro rectas patrón (ver figura 2). Éstas

resultaron ser repetibles, con una desviación estándar cercana a -3,3 y con una eficiencia de amplificación entre el 94 y el 104%. Los límites de detección en copias genómicas (CG) por reacción para cada sonda fueron 45 CG en la qPCR humana, 21 CG en la porcina, 25 CG en la qPCR para ave de corral y 46 CG en qPCR bovina. Se consideró que *Bifidobacterium* posee tres copias del gen que codifica para el ARNr 16S (Ballesté y Blanch 2011; Candela y col. 2004) y que, por tanto, los límites de detección correspondían a 75 UFC/ml en humano, 41,5 UFC/ml en porcino, 77 UFC/ml en ave de corral y 35 UFC/ml en bovino.

Se testó cada qPCR específica con muestras de ADN extraído de su cepa huésped tipo y con el de las cepas tipo de diferente origen. En todos los casos sólo se produjo la amplificación con las muestras de su mismo origen.

En estudios anteriores (Fode-Vaughan y col. 2001) se contemplaba la posibilidad de analizar las muestras por PCR sin realizar un paso previo de extracción y purificación de ADN. Para evaluar esta posibilidad en los ensayos de qPCR desarrollados, se realizó un estudio donde se realizaron diluciones decimales seriadas de cada una de las cepas tipo en dos matrices distintas, PBS y agua residual humana. Posteriormente se analizaron mediante las cuatro qPCRs específicas para cada origen, con y sin extracción previa de ADN. Los mejores resultados se obtuvieron siempre con la extracción previa de ADN. Tanto en PBS como en agua residual, la amplificación del ADN mostró una disminución lineal y regular en todas las réplicas si se extraía el ADN previamente. La señal de amplificación desaparecía antes en el caso de usar el agua residual humana como matriz (dilución -4). Esto podía atribuirse a la presencia de partículas que interfirieran con la eficiencia de extracción del ADN del kit comercial. En el caso de las muestras sin extracción previa de ADN, los resultados no presentaban una decaída lineal de las CG coherente con las diluciones realizadas. En ausencia de extracción previa de ADN, los resultados fueron desiguales y no repetitivos, por lo que se decidió proseguir con el paso previo de extracción y purificación del ADN en los experimentos posteriores (ver figura 3).

Para comprobar la especificidad y eficiencia de cada qPCR de *Bifidobacteriaceae* específica de origen fecal se prosiguió a analizar muestras de elevada carga fecal de origen único y conocido. Para ello se recogieron muestras de una planta depuradora de aguas residuales urbanas (contaminación humana) y de mataderos de ave, vaca y cerdo. También se recogieron muestras del río Llobregat, de menor carga fecal, pero mayoritariamente humana. Todas las muestras fueron analizadas con las cuatro qPCRs

específicas. Los resultados mostraron una gran especificidad de las sondas, ya que sólo se observó amplificación con las muestras de su mismo origen (ver tabla 2). En el caso del agua de río sólo se obtuvieron resultados positivos con la qPCR de humano. Estos resultados eran los esperados ya que las muestras fueron tomadas en la parte final del río, que transcurre por zonas urbanas con descargas de efluentes secundarios de plantas depuradoras.

## Discusión

*Bifidobacterium* ha sido propuesto como microorganismo indicador ya que cumple muchos de los requisitos necesarios para ser un indicador de contaminación fecal (Bahaka y col. 1993; Beerens 1998; Mara y Oragui 1983; Resnick y Levin 1981). Además existen especies asociadas a humanos y otras exclusivas de origen animal (Lynch y col. 2002; Mushi y col. 2010; Nebra y col. 2003; Sinton y col. 1998). La persistencia de dichas bacterias en el ambiente es muy corta, por lo que los métodos dependientes de cultivo no son válidos para la detección de la contaminación fecal antigua, contrariamente a los métodos moleculares (Bonjoch y col. 2009), como es el caso de la qPCR.

Nuestros resultados indicaron que la extracción y purificación del ADN, era necesaria para la correcta consistencia y reproducibilidad de los resultados, contrariamente a lo sugerido en otros estudios (Fode-Vaughan y col. 2001). Los mejores resultados se obtuvieron con el PBS como matriz, probablemente debido a que en el agua residual hubiera partículas que interfiriesen en el proceso de purificación del ADN del kit, y que por tanto sólo se detectara en las primeras diluciones decimales.

Los análisis de las muestras de elevada carga fecal de origen fecal único y conocido con cada una de las qPCR diseñadas, confirmaron que cada una de las sondas específicas permitía discriminar el origen de la contaminación, sin producirse en ningún caso reacciones cruzadas. En las muestras de río, donde la carga fecal era menor, también se produjo una correcta identificación de la fuente de contaminación.

El alto grado de sensibilidad y especificidad demostrado en este nuevo conjunto de qPCRs específicas de huésped (ave de corral, humano, bovino y porcino) lo convierten en una herramienta muy útil para estudios de MST en muestras de elevada y de moderada carga fecal. Además, este nuevo método podría incluirse, junto con los

microorganismos indicadores tradicionales, como parámetros en los estudios de desarrollo de modelos predictivos de MST (Belanche-Muñoz y Blanch 2008).

#### **Informe del factor de impacto**

El artículo *New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific Bifidobacteriaceae suitable for microbial source for microbial source tracking* fue publicado en agosto de 2012 en la revista *Applied and Environmental Microbiology* (78:5788-5795).

Esta revista se encuentra dentro del primer cuartil del área temática de Biotecnología y Microbiología Aplicada (30/160) con un factor de impacto para el año 2012 de 3,678.

#### **Informe de coautoría**

La doctoranda llevó a cabo la mayor parte de las tareas experimentales, incluyendo la recogida de muestras, diseño del juego de cebadores comunes y sondas específicas, y el análisis de las muestras por qPCR. Además participó activamente en la redacción del artículo y la elaboración de las tablas y figuras.

Dr. Anicet R. Blanch

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Muniesa





# New Molecular Quantitative PCR Assay for Detection of Host-Specific *Bifidobacteriaceae* Suitable for Microbial Source Tracking

Marta Gómez-Doñate, Elisenda Ballesté, Maite Muniesa, and Anicet R. Blanch

Department of Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

*Bifidobacterium* spp. belong to the commensal intestinal microbiota of warm-blooded animals. Some strains of *Bifidobacterium* show host specificity and have thus been proposed as host-specific targets to determine the origin of fecal pollution. Most strains have been used in microbial-source-tracking (MST) studies based on culture-dependent methods. Although some of these approaches have proved very useful, the low prevalence of culturable *Bifidobacterium* strains in the environment means that molecular culture-independent procedures could provide practical applications for MST. Reported here is a set of common primers and four *Bifidobacterium* sp. host-associated (human, cattle, pig, and poultry) probes for quantitative-PCR (qPCR) assessment of fecal source tracking. This set was tested using 25 water samples of diverse origin: urban sewage samples, wastewater from four abattoirs (porcine, bovine, and poultry), and water from a river with a low pollution load. The selected sequences showed a high degree of host specificity. There were no cross-reactions between the qPCR assays specific for each origin and samples from different fecal origins. On the basis of the findings, it was concluded that the host-specific qPCRs are sufficiently robust to be applied in environmental MST studies.

Waterborne diseases transmitted by the fecal-oral route make a significant contribution to the burden of disease worldwide (49). Consequently, fecal pollution in water is a global public health concern. This pollution has several origins: direct discharge of fecal waste or raw wastewater, secondary effluents from wastewater treatment works, combined sewer and sanitary overflows, animal husbandry activities, wastewater from abattoirs and the meat industry, and wildlife (47). Source-tracking methods allow the origin of fecal pollution in a particular body of water to be determined (19). The identification of fecal-pollution sources accompanied by appropriate water resource management policies could contribute to improving the microbial quality of water (9, 22).

Several chemical and microbiological methods have been proposed for tracking the origin of fecal pollution in water (10). Unfortunately, the most commonly used fecal indicators of microorganisms, such as fecal coliforms (FC), *Escherichia coli*, enterococci, and sulfite-reducing clostridia (SRC), are found in both human and animal feces, and thus, they are of limited use in identifying the origin of waste. Alternative microbial indicators may provide information about the presence and origin of fecal pollution. They include antibiotic-resistant enterococcus phenotypes (18), bacteriophages of *Bacteroides* spp. (17, 23, 38), F-RNA bacteriophage subgroups (21), *Rhodococcus coprophilus* (41), *Bacteroides* group (8, 39), *Bifidobacterium* spp. (3, 6, 7, 11, 25, 31), and biochemical fingerprinting of bacterial populations (32).

*Bifidobacterium* spp. were first proposed as microbial-source-tracking (MST) indicators in 1983, when sorbitol fermentation was related to a possible human source (33). *Bifidobacterium* spp. are anaerobic Gram-positive bacteria that belong to the group *Actinobacteria*, and they also form part of the bacterial community of the mammalian digestive tract (51). In addition, these bacteria are present in the intestines of many other warm-blooded animals, such as poultry (46).

Viable bifidobacteria persist in the environment for shorter periods than other MST targets (aerobic bacteria or viruses, for example) (19), and their presence indicates recent fecal disposal in

catchments (13). Qualitative *Bifidobacterium* sp. molecular-based targets have also been developed for MST purposes. Based mostly on 16S rRNA sequences, these targets are effective for the detection and identification of the genus (26) or individual species of *Bifidobacterium* in mixed populations (37, 43, 48, 50). Molecular methods, such as nested PCRs followed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), have demonstrated that some bifidobacterial strains are host specific (6). For instance, *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium dentium* are found exclusively in humans and have been successfully used in MST in Europe and some parts of the United States (10, 11). *Bifidobacterium saeculare* is associated with poultry and *Bifidobacterium pseudolongum* with cattle, and some unidentified species have been related to pigs (6). However, suitable host-specific qPCR-based methods for *Bifidobacterium* spp. for MST have not been developed to date.

Here, the design of a set of common primers and host-related specific probes for qPCR is reported. The set was based on sequence information obtained from the DGGE host-selected bands (6) that allow culture-independent detection and quantification of host-specific *Bifidobacterium* species in water polluted by feces. The effectiveness of the qPCRs with and without DNA extraction from bifidobacterial strains of defined origin was also checked to determine whether there are significant differences between the two approaches or to refute claims of such differences (16).

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, media, and plasmids.** The following reference strains were used to design the set of common primers and specific probes: *B. adolescentis* (DSM 20083<sup>T</sup>), related to humans; *B. saeculare* (DSM 6531<sup>T</sup>),

Received 20 March 2012 Accepted 30 May 2012

Published ahead of print 8 June 2012

Address correspondence to Anicet R. Blanch, ablanch@ub.edu.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00895-12

TABLE 1 Primers and probes used in PCR and qPCR assays

Name	Sequence (5' to 3')	Use	Target <sup>a</sup>	Reference
Lm26	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	PCR and sequencing	<i>Bifidobacterium</i> genus specific	26
Lm3	CGGGTGTICCCACTTTCATG	PCR and sequencing	<i>Bifidobacterium</i> genus specific	26
Bif164	GGGTGTAATGCCGGATG	DGGE-PCR and sequencing	<i>Bifidobacterium</i> genus specific	28
Bif662	CCACCGTTACACCGGAA	PCR and sequencing	<i>Bifidobacterium</i> genus specific	28
Bif662-GC	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGC ACGGGGGG-CCACCGTTACACCGGAA	DGGE-PCR	<i>Bifidobacterium</i> genus specific	43
pGEMup	TGTAATACGACTCACTAT	PCR and sequencing	pGEM plasmid	44
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	PCR and sequencing	Most eubacteria	29
1492r	TACGGTTACCTTGTTACGAC	PCR and sequencing	Enterics and most eubacteria	29
Bif-F	TTCGGGTTGTAACCGCTTTT	qPCR	<i>Bifidobacterium</i> genus specific	This study
Bif-R	TACGTATTACCGCGGCTGCT	qPCR	<i>Bifidobacterium</i> genus specific	This study
HMprobe	TCGGGGTGAGTGTACCT	qPCR probe	Human <i>Bifidobacterium</i>	This study
PLprobe	GAGAGTGAGTGTACCCGTT	qPCR probe	Poultry <i>Bifidobacterium</i>	This study
PGprobe	CGCAAGTGAGTGTACCTT	qPCR probe	Pig <i>Bifidobacterium</i>	This study
CWprobe	TTCGGCCGTGTTGAGT	qPCR probe	Cattle <i>Bifidobacterium</i>	This study

<sup>a</sup> Species that match the probes according to the Basic Local Alignment Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) match analysis.

related to poultry; and *B. pseudolongum* (DSM 20099<sup>T</sup>), related to cattle. The unidentified strain PG10, related to pigs (6), was also used. This strain is a member of the *Bifidobacteriaceae*, and studies to determine whether it is a new genus are currently ongoing.

Bifidobacterial strains were grown using reinforced *Clostridium* medium (RCM) broth (Oxoid, Hampshire, England) and Columbia blood agar (CBA) (Difco, Le Pont de Claix, France) with the addition of L-cysteine hydrochloride at 0.5 g/liter (Merck, Darmstadt, Germany) and glucose at 5 g/liter. The strains were then incubated anaerobically at 37°C for between 48 and 72 h, as previously reported (35).

The pGEM-T Easy vector (Promega, Barcelona, Spain) was used to clone the PCR products obtained from the control strains. The pGEM-T Easy vector containing the PCR products was transformed on *E. coli* strain DH5 $\alpha$ . LB agar plates containing ampicillin (100  $\mu$ g/ml) were used to screen for transformants.

**Determination of microbial indicators.** Two fecal indicators were measured: *E. coli* as a bacterial fecal indicator and somatic coliphages (SOMCPH), proposed as viral fecal indicators. Standardized methods were applied to count the indicators (1, 2).

For *E. coli* counts, water samples were filtered through 0.45- $\mu$ m-pore-size membranes (Millipore, Molsheim, France). The filters were then incubated on Chromocult agar (Merck, Darmstadt, Germany) at 44.5°C for 24 h for *E. coli*. For SOMCPH, water samples were passed through low-protein-binding 0.22- $\mu$ m-pore-size membranes (Millex-GP; Millipore, Molsheim, France). Next, 1 ml of the filtrate and 1 ml of the exponential-growth-phase culture (optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>] = 0.3) of the host strain *E. coli* WG5 (ATCC 700078) (2) in modified Scholten's broth (MSB) were mixed and placed together in 2.5 ml of semisolid modified Scholten's agar (MSA) in MSA plates following the double-agar-layer plaque assay.

**Enumeration of bifidobacterial strains studied.** The cell concentration of overnight cultures in RCM was determined by 10-fold dilutions in phosphate-buffered saline (PBS) and plating on CBA. Inoculated CBA plates were incubated for 48 h at 37°C under anaerobic conditions as indicated above. The strains were also enumerated using the quantitative PCR (qPCR) assays described below.

**Samples.** A total of 25 wastewater samples from various sources were obtained from February 2009 to December 2011. Five sewage samples were collected from an urban wastewater treatment plant (WTP), which is described elsewhere (4, 12). Five samples were from two poultry slaughterhouses, each receiving 60,000 animals a week. Five samples were collected from a porcine slaughterhouse that receives approximately 15,000 pigs per week. Five samples were from a bovine slaughterhouse receiving between 900 and 7,000 animals weekly. In addition, five surface water samples were collected from a Mediterranean river (Llobregat) located in

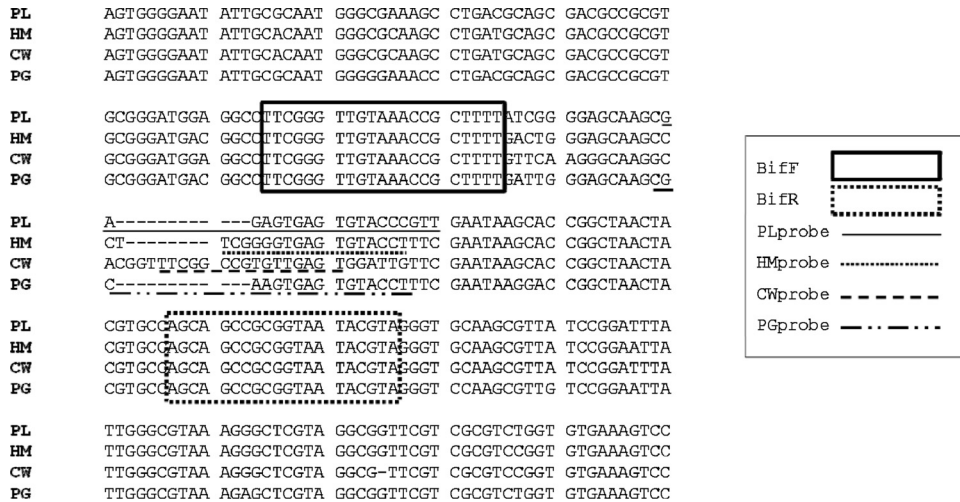
the metropolitan area of Barcelona, Spain. The river samples were expected to present values of contamination 3 or 4 orders of magnitude lower than those of wastewater samples. The watercourse sampled receives mostly human fecal pollution, although some minor domestic animal input cannot be ruled out (15). Samples were collected aseptically, kept at 4°C until analysis, and processed within 12 h.

**Nucleic acid isolation.** Genomic DNA from bacterial strains for DGGE analysis was obtained using a protocol described elsewhere (27). For the qPCR assays, in the experiments using dilution of the bacterial cultures or environmental samples, 200  $\mu$ l of each sample was used to extract DNA with the QIAamp DNA blood minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. The DNA extracted was evaluated by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. DNA was suspended in a final volume of 200  $\mu$ l of double-distilled water, and 7  $\mu$ l was used for qPCR amplification.

To verify the best method for DNA amplification, cultures of the four bifidobacterial strains (*B. adolescentis*, *B. saeculare*, *B. pseudolongum*, and strain PG10) containing  $5 \times 10^7$  CFU/ml were serially diluted (1:10) in PBS or in wastewater from the urban WTP. Two hundred microliters of each dilution was used for DNA extraction as described above, and 7  $\mu$ l of the extracted DNA was used for qPCR amplification. In parallel, 7  $\mu$ l of each dilution, without previous DNA extraction, was directly used as the template for qPCR amplification (as described by Fode-Vaughan et al. [16]). The results were corrected for gene copies (GC)/ml and used to compare the sensitivity and robustness of the methods.

**Standard PCR procedures and clone library construction.** The Bif164 and Bif662 primer pair (Table 1) was used to amplify a fragment of the 16S rRNA genes from the DNA extracted from each of the four bacterial control strains (*B. adolescentis*, *B. saeculare*, strain PG10, and *B. pseudolongum*). Each 25  $\mu$ l of PCR mixture contained the following: 12.5  $\mu$ l 2 $\times$  DreamTaq Green DNA Polymerase (Fermentas, Madrid, Spain), 0.5  $\mu$ l of each primer (30 mM), 2.5  $\mu$ l of DNA, and 9  $\mu$ l of double-distilled nuclease-free water (Fermentas, Madrid, Spain). PCRs were performed with a GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) as follows: an initial denaturation step at 94°C for 5 min and 35 cycles consisting of 94°C for 30 s, 62°C for 20 s, and 68°C for 40 s, followed by a final 7-min extension at 68°C (30, 43). A negative no-template control was included in each experiment. An aliquot of 25  $\mu$ l of each PCR product was analyzed by agarose (1.5% [wt/vol]) gel electrophoresis, and the bands were visualized via ethidium bromide staining. When necessary, DNA was extracted and purified from the agarose gel using the Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen).

**DGGE analysis of PCR products.** DGGE analysis of PCR amplicons obtained from 16S rRNA genes was performed as previously described (6) using the DCode system apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA). Briefly, the



**FIG 1** Alignment of the sequences of the 16S rRNA genes from isolated DGGE bands (6) of *B. saeculare* (poultry, PL), *B. adolescentis* (human, HM), *B. pseudolongum* (cattle, CW), and strain PG10 (pig, PG). The locations of the primers BifF and BifR and the set of probes (PLprobe, HMprobe, CWprobe, and PGprobe) are indicated.

PCR product was analyzed in 8% (wt/vol) polyacrylamide gels (30% acrylamide-bisacrylamide [37.5:1]). These gels were run in 1× Tris-acetate-EDTA (TAE) (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA; pH 7.4) with an increasing concentration gradient ranging from 45% to 55% (under 100% denaturing conditions, the gel contains 7 M urea and 40% [vol/vol] formamide). The PCR amplicons were separated by electrophoresis at 85 V at 60°C for 16 h.

The gels were stained for 45 min in 1× sodium chloride-Tris-EDTA buffer (STE) (100 mM sodium chloride, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) with SybrGold nucleic acid stain (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) and viewed under UV by Image Master (Amersham Pharmacia Biotech). The gels were scanned, and the PCR profiles were analyzed using unweighted-pair group method analysis (UPGMA), and three distance measures were used (Pearson, Dice, and Jaccard). Jackknife analysis was performed to assess the relative support for the tree topology. Clustering analyses were performed using Fingerprinting II software (Bio-Rad, Hercules, CA), showing significant distances between the DGGE profiles for PCR amplicons obtained from 16S rRNA genes, as expected and in agreement with previous studies (6). Similar distance measures were obtained with the different clustering algorithms used.

**Sequence analysis of DGGE bands and qPCR amplicons.** 16S rRNA gene sequencing from the DGGE bands was performed as previously described and submitted to GenBank (6). Briefly, the bands were excised with a sterile razor blade. DNA was extracted using a Qiaex II gel extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The product was reamplified with the primers Bif164 and Bif662 (Table 1). PCR and qPCR amplicons were purified via QIAquick PCR purification (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and visualized with agarose gel. The sequencing reaction was performed using a BigDye Terminator cycle-sequencing ready-reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and adding between 1 µl and 5 µl of DNA, depending on the DNA concentration. The reaction was performed under the following conditions: 35 cycles of 96°C for 10 s, 55°C for 5 s, and 60°C for 4 min. The product was purified and analyzed with an automated DNA sequencer (ABI Prism 3700; Perkin Elmer [service provided by Serveis Científicotècnics, University of Barcelona]).

The 16S rRNA gene sequences were edited and assembled using version 7.0.1 of the BioEdit program (20). BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to subject the sequences to similarity search analysis and the Ribosomal Database Project II for species identification.

**qPCR procedures.** (i) **Preparation of standard curves.** A plasmid construct was used to generate standards for the qPCR assays. The 16S rRNA gene fragments from the four strains were cloned with a pGEM-T

Easy vector following the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). The construct was transformed by electroporation (2.5 kV, 25 F capacitance, and 200 V resistance) into *E. coli* DH5α electrocompetent cells. The vector containing the insert in ampicillin-resistant colonies was purified using the Qiagen Plasmid Midi purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), and its concentration was quantified with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE).

To calculate the number of construct GC of the stock prepared for each gene, the following equation was used: [concentration of pGEM-T Easy::insert (ng/µl)/molecular mass (ng/mol)] × 6.022 × 10<sup>23</sup> molecules/mol = number of molecules of pGEM-T Easy::insert/µl. Serial decimal dilutions of this stock were made in double-distilled water to prepare the standard curve for qPCR. The standard dilutions were then aliquoted and stored at −20°C until use. This stock was amplified in triplicate in five independent experiments, and the average of the threshold cycle (C<sub>t</sub>) results was used to elaborate the standard as described above. Three replicates of each dilution were added to each qPCR mixture in each experiment.

(ii) **Bif-F and Bif-R primer and probe sets.** Using the software tool Primer Express 3.0 (Applied Biosystems), primers and probes were selected for use in a standardized amplification protocol (Fig. 1). Common UP/LP primers for the four types of fecal source (human, poultry, cattle, and porcine) and a specific probe for each origin were designed. All primers and 6-carboxyfluorescein (FAM)- or VIC-labeled fluorogenic hydrolysis probes were commercially synthesized by Applied Biosystems (Spain). HMprobe was a minor groove binding (MGB) probe with a VIC reporter and a nonfluorescent quencher (NFQ), and PLprobe, PGprobe, and CWprobe were MGB probes with a FAM reporter and an NFQ. The primers and probes were used under standard conditions in a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Spain). The homology of primer and probe sequences with the target genomes was determined by sequence alignments using BLAST and NCBI (National Center for Biotechnology Information) data entries for *Bifidobacterium* spp. The primer and probe sets specific for each host were tested for cross-reactions using DNAs isolated from the four strains as negative controls.

Amplification was performed in a 20-µl reaction mixture with TaqMan Environmental Real-Time PCR Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Spain). The mixture contained 900 nM each primer, 250 nM the corresponding probe, and 7 µl of the DNA sample or quantified plasmid DNA. The thermal-cycler conditions were as follows: an initial setup of 2 min at 50°C, followed by 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s of denaturation



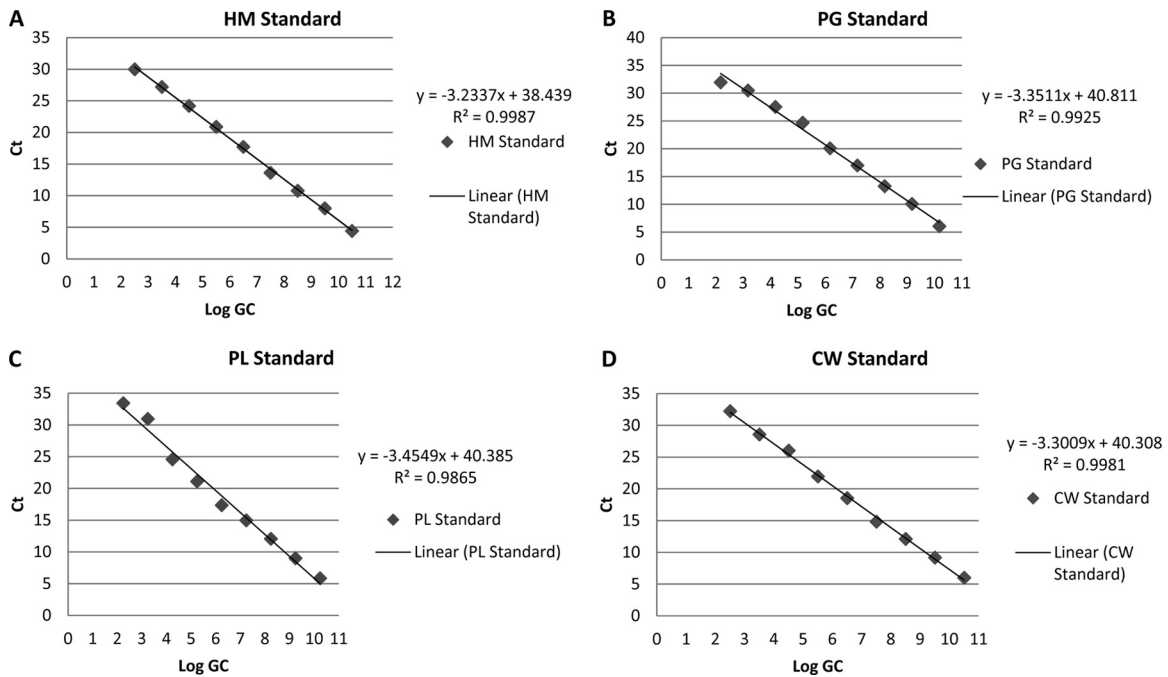


FIG 2 qPCR standard curves done with recombinant plasmids as described in the text. HM, *B. adolescentis* (human); PG, strain PG10 (pig); PL, *B. saeculare* (poultry); CW, *B. pseudolongum* (cattle). The data presented are the averages of three replicates in five independent experiments.

at 95°C, and 1 min of annealing/extension at 60°C. All the samples, standards, and positive and negative controls were run in triplicate. The  $C_t$  obtained was defined as the average of the triplicate data obtained.  $C_t$  data were expressed as the number of GC according to the values obtained with the standard for each qPCR.

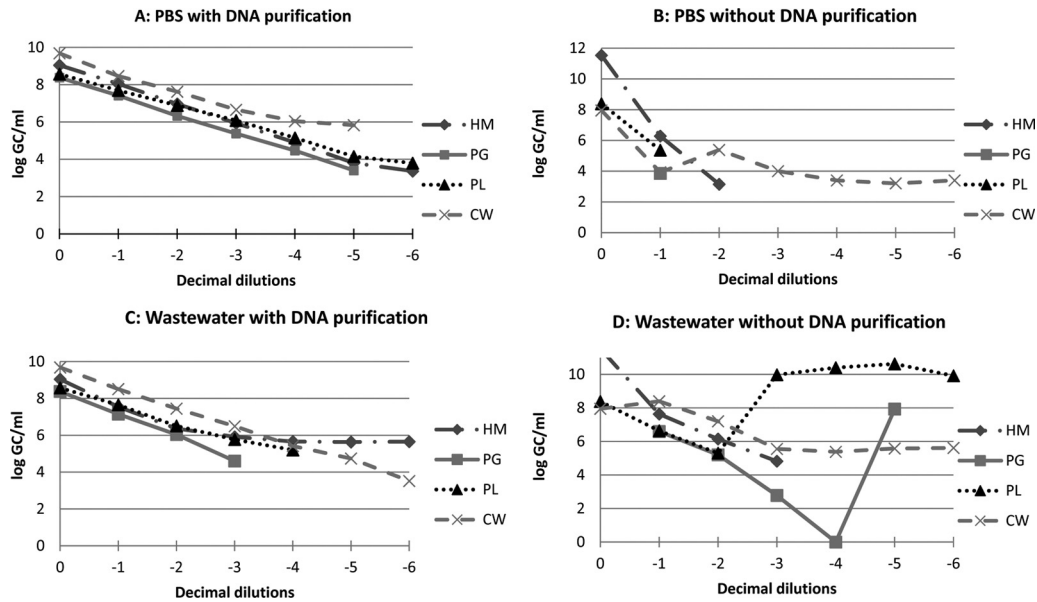
## RESULTS

**qPCR standards of *Bifidobacterium*-type strains.** To explore the potential of qPCR to discriminate the origin of the fecal contamination in environmental samples, four standard curves were plotted (Fig. 2), one for each qPCR assay targeting one fecal source. The standard curves presented are the averages of five independent experiments. The 16S rRNA gene PCR fragments amplified from each strain were as follows: 502 bp for *B. adolescentis* (human), 506 bp for PG10 (pig), 511 bp for *B. saeculare* (poultry), and 419 bp for *B. pseudolongum* (cattle). The vector pGEM-T Easy containing each fragment was used to generate the standard curves for the qPCR. The amplicon size of each target using primers Bif-F and Bif-R was 104 bp for *B. adolescentis* (human), 100 bp for PG10 (pig), 100 bp for *B. saeculare* (poultry), and 112 bp for *B. pseudolongum* (cattle). Standard curves were repeatable, and the averaged slopes of the three replicates of five independent amplifications were as follows:  $-3.2337$  with a standard deviation (SD) of 0.056 for humans,  $-3.3511$  (SD, 0.058) for pigs,  $-3.4549$  (SD, 0.054) for poultry, and  $-3.3009$  (SD, 0.017) for cattle. The amplification efficiencies ( $E$ ) for the assays were as follows: 103.8% (range, 100.2 to 107.2) for humans, 98.8% (range, 97.4 to 100.6) for pigs, 94.7% (range, 91.2 to 96.9) for poultry, and 100.9% (range, 100.2 to 101.9) for cattle. The detection limits were 45 GC per reaction using the human probe, 21 GC for the pig probe, 25 GC for the poultry probe, and 46 GC for the bovine probe. Considering the whole protocol of DNA extraction and amplification, and assuming that *Bifidobacterium* possesses between 1 and 5 cop-

ies of the 16S rRNA gene (6, 14), three copies were considered in this study, as was reported by other authors. Thus, the calculated limits of detection correspond to 75 CFU/ml of human *Bifidobacterium*, 35 CFU/ml for cattle, 41.5 CFU/ml for pig, and 77 CFU/ml for poultry strains.

Each hydrolysis probe was tested with DNA extracted from the respective host strain and against the DNAs of the strains of different origin. The results of each probe against its respective strain can be seen in Fig. 2A and C in nondiluted samples (dilution 0). No amplification was observed for each qPCR assay when the DNAs of the bacterial cultures from other origins were tested.

**Detection of bifidobacterial strains by qPCR with and without DNA extraction.** Previous reports (16) indicated that qPCR amplification of environmental samples is successfully achieved without DNA extraction. To evaluate this possibility, we performed dilutions of the four bacterial cultures in PBS and in raw human sewage. Two hundred microliters of each dilution was processed for DNA extraction, as explained in Materials and Methods. In parallel, 7  $\mu$ l of each dilution, without previous DNA extraction, was directly used as the template for the qPCR assays. Three replicates of each experiment were performed, and the results of one representative experiment are presented as GC/ml of each type of sample (Fig. 3). The decimal dilutions in samples with purified DNA showed a regular linear decrease in the logarithmic values of GC for dilutions both in PBS and in raw urban wastewater, and the replicates were consistent. We calculated the slope for each of the three replicates and the average of the three slopes and their corresponding standard deviations. In experiments with dilution in PBS and with DNA extraction, the averaged slope for the human assay was  $-0.97$  (SD, 0.01); for pigs,  $-0.86$  (SD, 0.04); for poultry,  $-0.85$  (SD, 0.02); and for cattle,  $-0.84$  (SD, 0.07). The dilutions performed with PBS as the diluting buffer and with pre-



**FIG 3** Evaluation of DNA extraction methods. The results show the GC/ml obtained with decimal dilutions of the reference strains in PBS (A and B) and urban sewage (B and C) with previous DNA extraction (A and C) and without previous DNA extraction (B and D). Shown are the results of one representative experiment among three replicates.

vious DNA extraction showed better results than those in raw urban wastewater with DNA extraction, since qPCR detection was achieved at the same or higher dilutions (Fig. 3). These experiments were also repetitive among replicates. The averaged slope for the human assay was  $-0.84$  (SD, 0.07); for pigs,  $-1.11$  (SD, 0.14); for poultry,  $-0.94$  (SD, 0.02); and for cattle,  $-0.97$  (SD, 0.06). The lack of signal in samples diluted in urban sewage, for example, for PGprobe and PLprobe after dilution ( $-4$ ), was attributed to the particles present in sewage water, which could interfere with the efficiency of the DNA extraction kit (Fig. 3).

Nonextracted DNA samples did not present a linear decay of GC with the dilutions. Uneven and nonrepetitive results were obtained, with peaks that differed from the number of GC expected on the basis of the dilution (Fig. 3).

We concluded that the extraction and purification of DNA produced better qPCR performance. This observation supports the use of this step when analyzing environmental samples.

**Application of host-specific qPCR assays on known-origin wastewater samples.** The specificity of the primer and probe sets for a host from each fecal origin (human, cattle, pig, or poultry) was evaluated by processing samples containing fecal pollution of known origin. Amplicons obtained in the qPCR were sequenced and were confirmed as *Bifidobacterium* spp. Wastewater from slaughterhouses and the WTP allowed the testing of water samples with high fecal contamination, while river samples were representative of water with a low fecal load. Wastewater and river water samples allowed us to check their specificity and to establish the absence of cross-reactions in samples containing lower concentrations of fecal contaminants.

All the samples were confirmed to be polluted from a single fecal source, with the exception of river samples, in which human pollution predominated but animal input could not be excluded.

All the probes showed high specificity for their respective hosts (Table 2). For example, for an urban sewage sample (HM1 to

HM5), the HMprobe detected levels of  $10^5$  GC/ml, while the other probes did not. As expected, the wastewater samples had a higher fecal load than the river samples, as reflected by the difference in the number of *E. coli* bacteria and SOMCPH (Table 2).

The qPCR assays showed high specificity for their respective host origins (Table 2). In addition, they did not show amplification in samples from the other fecal origins. The assays are useful in highly polluted wastewater and also in samples with lower pollution, such as river samples. River samples were positive only for human targets, as expected, because these samples were collected in the final stretch of the river, where the largest inflows are in the form of treated urban wastewater.

## DISCUSSION

*Bifidobacterium* has been proposed as a microbial indicator for MST in water, as the genus fulfills most of the requirements of a fecal indicator (3, 7, 33, 40). Moreover, some species are associated with human feces, whereas others have an exclusively animal origin (31, 34, 36, 45). Culture and molecular methods have been developed for the specific detection of species to trace fecal pollution in water (6, 9, 11, 35). Additionally, the enumeration of bifidobacterial populations and the detection of some *Bifidobacterium* spp. have been used to define the parameters of recently developed predictive MST models (10). The persistence of bifidobacterial populations in the extraintestinal environment is so short that culture methods are not as useful for “aged fecal pollution” as molecular approaches (13). Although qPCR molecular targets show moderate sensitivity (24), these MST molecular indicators could be useful for the development of predictive models, as previously reported (5, 42). Furthermore, enhanced recovery of the molecular target is essential for most molecular methods when applied to environmental samples, where the concentrations of the target could be close to the detection limit (24).

In this study, the 10-fold dilutions in PBS and in WTP waste-

TABLE 2 Microbial indicators and qPCR results for wastewater and Llobregat river samples

Sample	Microbial indicators		Bifidobacterium real-time qPCR			
	<i>E. coli</i> (CFU/ml)	Somatic coliphages (PFU/ml)	HMprobe (human) (GC/ml) <sup>a</sup>	PGprobe (pigs) (GC/ml) <sup>a</sup>	PLprobe (poultry) (GC/ml) <sup>a</sup>	CWprobe (cattle) (GC/ml) <sup>a</sup>
Urban WW-1	1.65 × 10 <sup>4</sup>	6.90 × 10 <sup>3</sup>	4.10 × 10 <sup>5</sup>	0 <sup>b</sup>	0	0
Urban WW-2	4.50 × 10 <sup>4</sup>	8.80 × 10 <sup>3</sup>	4.50 × 10 <sup>5</sup>	0	0	0
Urban WW-3	6.00 × 10 <sup>4</sup>	1.90 × 10 <sup>4</sup>	2.40 × 10 <sup>5</sup>	0	0	0
Urban WW-4	4.50 × 10 <sup>4</sup>	1.77 × 10 <sup>4</sup>	2.50 × 10 <sup>5</sup>	0	0	0
Urban WW-5	4.25 × 10 <sup>4</sup>	2.52 × 10 <sup>4</sup>	1.10 × 10 <sup>5</sup>	0	0	0
Porcine WW-1	7.00 × 10 <sup>4</sup>	2.40 × 10 <sup>5</sup>	0	4.10 × 10 <sup>7</sup>	0	0
Porcine WW-2	7.00 × 10 <sup>4</sup>	5.63 × 10 <sup>5</sup>	0	1.00 × 10 <sup>8</sup>	0	0
Porcine WW-3	1.35 × 10 <sup>4</sup>	2.84 × 10 <sup>4</sup>	0	1.10 × 10 <sup>7</sup>	0	0
Porcine WW-4	1.50 × 10 <sup>5</sup>	1.48 × 10 <sup>5</sup>	0	3.00 × 10 <sup>5</sup>	0	0
Porcine WW-5	1.85 × 10 <sup>4</sup>	9.30 × 10 <sup>4</sup>	0	3.70 × 10 <sup>5</sup>	0	0
Poultry WW-1	7.76 × 10 <sup>4</sup>	5.50 × 10 <sup>2</sup>	0	0	1.20 × 10 <sup>6</sup>	0
Poultry WW-2	2.00 × 10 <sup>5</sup>	7.40 × 10 <sup>2</sup>	0	0	9.70 × 10 <sup>5</sup>	0
Poultry WW-3	6.01 × 10 <sup>4</sup>	2.34 × 10 <sup>1</sup>	0	0	1.30 × 10 <sup>6</sup>	0
Poultry WW-4	6.31 × 10 <sup>4</sup>	2.70 × 10 <sup>2</sup>	0	0	9.20 × 10 <sup>5</sup>	0
Poultry WW-5	1.58 × 10 <sup>5</sup>	7.40 × 10 <sup>2</sup>	0	0	8.80 × 10 <sup>5</sup>	0
Bovine WW-1	3.31 × 10 <sup>4</sup>	2.00 × 10 <sup>-1</sup>	0	0	0	1.30 × 10 <sup>4</sup>
Bovine WW-2	4.75 × 10 <sup>4</sup>	6.22 × 10 <sup>1</sup>	0	0	0	1.60 × 10 <sup>3</sup>
Bovine WW-3	3.40 × 10 <sup>4</sup>	1.06 × 10 <sup>5</sup>	0	0	0	9.80 × 10 <sup>6</sup>
Bovine WW-4	6.31 × 10 <sup>4</sup>	7.40 × 10 <sup>4</sup>	0	0	0	1.10 × 10 <sup>7</sup>
Bovine WW-5	2.51 × 10 <sup>4</sup>	1.00 × 10 <sup>0</sup>	0	0	0	3.10 × 10 <sup>3</sup>
River-1	1.80 × 10 <sup>1</sup>	5.00 × 10 <sup>1</sup>	5.30 × 10 <sup>3</sup>	0	0	0
River-2	8.00 × 10 <sup>0</sup>	1.16 × 10 <sup>2</sup>	5.50 × 10 <sup>2</sup>	0	0	0
River-3	1.45 × 10 <sup>1</sup>	2.20 × 10 <sup>2</sup>	4.20 × 10 <sup>3</sup>	0	0	0
River-4	8.20 × 10 <sup>1</sup>	2.56 × 10 <sup>1</sup>	1.30 × 10 <sup>3</sup>	0	0	0
River-5	2.50 × 10 <sup>1</sup>	3.50 × 10 <sup>1</sup>	5.90 × 10 <sup>2</sup>	0	0	0

<sup>a</sup> Each *Bifidobacterium* strain has between 1 and 5 GC of 16S rRNA gene (14).

<sup>b</sup> Zero values are those below the detection limit.

water showed that samples processed without previous DNA extraction (as suggested by Fode-Vaughan et al. [16]) did not show consistent results. Moreover, the values obtained were considerably lower than those from the corresponding samples subjected to DNA extraction. Better results were observed when using PBS at lower dilutions, probably due to the lack of interfering substances that could be present when wastewater is used as a diluting agent.

In the first analysis of the water samples containing porcine and bovine fecal pollution, a positive result for the human target was obtained (data not shown). The analysis was repeated, and the same results were obtained. Then, we searched for additional contributors to the septic tank sampled and found a mixture from corrals and toilets. Similar circumstances have been reported in other studies (11). Given this observation, the sampling site for this slaughterhouse was changed to one upstream of the pipes leading to the septic tank, thereby avoiding the contribution from toilets, and no human input was detected, as expected.

The qPCR procedures developed for quantifying host-specific bifidobacteria in water samples were straightforward, rapid, and accurate. The set of primers and host-specific probes allowed identification of the organism responsible for the fecal pollution of the water. The detection limit of the qPCR technique for *Bifidobacterium* spp., as well as those developed for other microorganisms, may hinder its application in samples from bodies of water with a low degree of pollution and with reduced concentrations of the target microbe.

The results obtained showed that amplification of the 16S

rRNA gene fragment between the primers Bif-F and Bif-R and the use of specific probes allowed discrimination between four sources of fecal pollution (human, bovine, poultry, and porcine), not only in highly polluted water (wastewater), but also in river surface water with a low fecal load.

The host-specific qPCR for *Bifidobacterium* spp. proved to be suitable for surface water samples with a low fecal load. Therefore, the river samples with enumeration values of 3 to 4 log<sub>10</sub> units for *E. coli* and 2 to 3 log<sub>10</sub> units for somatic coliphages were positive for the selected molecular target based on human-specific *Bifidobacterium*. The degree of sensitivity makes this host-specific qPCR useful for MST analyses in environments presenting diluted or aged fecal pollution.

In summary, the proposed MST molecular targets based on host-specific qPCR methods meet the minimal requirements to be considered microbial indicators and tracers of fecal sources for MST predictive models. Their sensitivity is sufficient to provide results even at a low concentration of fecal pollution. Moreover, the persistence of these molecular targets in the environment is expected to be longer than that of culture-dependent *Bifidobacterium*, as demonstrated in previous studies (13). Finally, these molecular targets can also be used with traditional microbial indicators of water quality when developing MST predictive models.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Government, research project CGL2011-25401, and the research programs of the Xarxa de Referència en

Biotechnology (XRB) and of the Comissionat per a Universitats i Recerca del DIUE, Government of Catalonia, no. 2009SGR1043. M.G.-D. is the recipient of grant FI from the Government of Catalonia, no. 2009SGR1043.

## REFERENCES

1. Anonymous. 2000. ISO 9308-1. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: membrane filtration method. International Standardization Organization, Geneva, Switzerland.
2. Anonymous. 2000. ISO 10705-2. Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: enumeration of somatic coliphages. International Standardization Organization, Geneva, Switzerland.
3. Bahaka D, Neut C, Khattabi A, Monget D, Gavini F. 1993. Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:565–573.
4. Ballesté E, Bonjoch X, Belanche LA, Blanch AR. 2010. Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1789–1795.
5. Ballesté E, Blanch AR. 2010. Persistence of *Bacteroides* species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7608–7616.
6. Ballesté E, Blanch AR. 2011. Bifidobacterial diversity and the development of new microbial source tracking indicators. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3518–3525.
7. Beerens H. 1998. Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 40:203–207.
8. Bernhard AE, Field KG. 2000. Identification of non-point sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1587–1594.
9. Blanch AR, et al. 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *J. Water Health* 2:249–260.
10. Blanch AR, et al. 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5915–5926.
11. Bonjoch X, Ballesté E, Blanch AR. 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3171–3175.
12. Bonjoch X, Ballesté E, Blanch AR. 2005. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Res.* 39:1621–1627.
13. Bonjoch X, Lucena F, Blanch AR. 2009. The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* 107:1178–1185.
14. Candela M, Vitali B, Matteuzzi D, Brigidi P. 2004. Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:229–232.
15. Durán AE, et al. 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *J. Appl. Microbiol.* 92:338–347.
16. Fode-Vaughan KA, Wimpee CF, Remsen CC, Collins MLP. 2001. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction. *BioTechniques* 31:598–607.
17. Gómez-Doñate M, et al. 2011. Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water. *Environ. Microbiol.* 13:1622–1631.
18. Hagedorn C, et al. 2003. Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *J. Appl. Microbiol.* 94:792–799.
19. Hagedorn C, Blanch AR, Harwood VJ. 2011. Microbial source tracking: methods, applications, and case studies. Springer, New York, NY.
20. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
21. Havelaar AH, Van Olphen M, Drost Y. 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2956–2962.
22. Jagals P, Grabow W. 1996. An evaluation of sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution of environmental water. *Water SA* 22:235–238.
23. Jofre J, Blasi JM, Bosch A, Lucena F. 1989. Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. *Water Sci. Technol.* 21:15–19.
24. Jofre J, Blanch AR. 2010. Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *J. Appl. Microbiol.* 109:1853–1867.
25. Junick J, Blaut M. 2012. Quantification of human *Bifidobacterium* species by quantitative real-time PCR targeting the *groEL* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2613–2622.
26. Kaufmann P, Pfeiferkorn A, Teuber M, Meile L. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1268–1273.
27. Kellogg DE, Sninsky JJ, Kwok S. 1990. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 189:202–208.
28. Kok RG, et al. 1996. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3668–3672.
29. Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p 115–175. In Stackebrandt E, Goodfellow M (ed), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY.
30. Langendijk PS, et al. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3069–3075.
31. Lynch PA, Gilpin BJ, Sinton LW, Savill MG. 2002. The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *J. Appl. Microbiol.* 92:526–533.
32. Manero A, Blanch AR. 2002. Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridization with 16S rDNA probes. *J. Microbiol. Methods* 50:115–121.
33. Mara DD, Oragui JI. 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* 55:349–357.
34. Mushi D, Byamukama D, Kivaisi AK, Mach RL, Farnleitner AH. 2010. Sorbitol-fermenting Bifidobacteria are indicators of very recent human faecal pollution in streams and groundwater habitats in urban tropical lowlands. *J. Water Health* 8:466–478.
35. Nebra Y, Jofre J, Blanch AR. 2002. The effect of reducing agents on the recovery agents of injured *Bifidobacterium* cells. *J. Microbiol. Methods* 49:247–254.
36. Nebra Y, Bonjoch X, Blanch AR. 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2651–2656.
37. O’Riordan K, Fitzgerald GF. 1997. Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:259–264.
38. Payán A, et al. 2005. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5659–5662.
39. Reischer GH, Kasper DC, Steinborn R, Mach RL, Farnleitner AH. 2006. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5610–5614.
40. Resnick IG, Levin MA. 1981. Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:427–432.
41. Rowbotham TJ, Cross T. 1977. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* 100:231–240.
42. Sánchez D, Belanche LA, Blanch AR. 2011. A software for the microbial source tracking problem. *J. Mach. Learn. Res.* 17:56–62.
43. Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:504–513.
44. Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. 2008. The CI repressors of shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of shiga toxin 2. *J. Bacteriol.* 190:4722–4735.
45. Sinton LW, Finlay RK, Hannah DJ. 1998. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 32:323–348.
46. Trovatelli LD, Crociani F, Pedinotti M, Scardovi V. 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken feces and a



- related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. Arch. Microbiol. 98:187–198.
47. US Environmental Protection Agency. 2004. Report to Congress. Impacts and control of CSOs and SSOs. EPA 833-R-04-001. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
  48. Ventura M, Reniero R, Zink R. 2001. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. Appl. Environ. Microbiol. 67:2760–2765.
  49. WHO. 2008. The global burden of disease 2004 update. World Health Organization, Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/).
  50. Yamamoto T, Morotomi M, Tanaka R. 1992. Species-specific oligonucleotides probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. Appl. Environ. Microbiol. 58:4076–4079.
  51. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. J. Nutr. 134:465–472.



### 3.3. Uso de indicadores y del programa de aprendizaje inductivo en estudios de MST



**Determinación del origen de la contaminación fecal en aguas con diversa carga fecal mediante el uso de indicadores específicos de huésped tradicionales y moleculares y la aplicación de programas de aprendizaje inductivo.**

Arnau Casanovas-Massana<sup>1\*</sup>▲, Marta Gómez-Doñate<sup>1\*</sup>, David Sánchez<sup>2</sup>, Lluís A. Belanche-Muñoz<sup>2</sup>, Maite Muniesa<sup>1</sup> y Anicet R. Blanch<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Avenida Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

<sup>2</sup>Departamento de Software, Universidad Técnica de Cataluña, Jordi Girona 1-3, Barcelona, España.

\*Ambos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo.

▲Dirección actual: Department of Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public Health, Yale University, New Haven, Connecticut, USA.

## **Introducción**

En los últimos años se han propuesto muchos métodos para identificar específicamente la contaminación fecal para ser aplicados en estudios de MST. La mayoría de ellos muestran una gran capacidad de discriminación en muestras que reciben la contaminación directamente en el origen. Sin embargo, dicha contaminación se encuentra muchas veces diluida en grandes volúmenes de agua (ríos, lagos o mares). Si el microorganismo o la diana a detectar se encuentra por debajo del límite de detección de los métodos se plantea un problema, ya que el indicador resulta inservible en muestras donde la contaminación fecal está diluida. Lo mismo sucede en casos donde la contaminación se ha producido tiempo atrás, ya que aquí los factores medioambientales pueden provocar el decaimiento del microorganismo que se quiere detectar. Como consecuencia, la concentración de los parámetros a detectar en las muestras de agua son significativamente más bajas en los puntos de muestreo que en el origen y por ello algunos indicadores de MST propuestos pierden su utilidad en muestras diluidas o con contaminación antigua.

### **3.3. Uso de indicadores y del programa de aprendizaje inductivo en estudios de MST**

---

En los dos trabajos anteriores se pusieron a punto dos metodologías para MST (bacteriófagos de *Bacteroides* y qPCR de bifidobacterias específicas de huésped). Se pretende comprobar la utilidad de ambas metodologías usando muestras de diverso origen fecal y con diferentes niveles de carga fecal, y comparar los resultados de estas metodologías con otros indicadores de MST ya propuestos por nuestro grupo de investigación. Además, se pretende incluir los resultados obtenidos con estos nuevos parámetros en el programa de aprendizaje inductivo *Ichnaea* (Sánchez y col. 2011) y, con todos los datos analizados, comprobar qué indicadores son los más eficientes en la discriminación de la fuente contaminante según la antigüedad de la muestra y la dilución de la contaminación.

La contaminación fecal del agua comporta un riesgo de salud pública, grandes pérdidas económicas y el deterioro ambiental en todo el mundo. Los aportes pueden provenir de efluentes de secundario de plantas depuradoras, aguas residuales de mataderos, ganadería, industria cárnica y aportes de la fauna salvaje entre otros y conllevan un alto riesgo de transmisión de patógenos por la ruta fecal-oral (Ritter y col. 2002; Simpson y col. 2002). El monitoreo directo de los patógenos generalmente es caro y complejo, ya que pueden encontrarse de forma intermitente y normalmente a bajas concentraciones (Field y Samadpour 2007; Savichtcheva y Okabe 2006). Debido a estas limitaciones se utilizan otros microorganismos indicadores, como coliformes fecales, *Escherichia coli*, enterococos o clostridios reductores de sulfitos, para determinar la calidad del agua. Estos indicadores, sin embargo, no nos proporcionan información sobre el origen de la contaminación, cosa que sería esencial para actuar directamente en la fuente contaminante, aumentando así la eficiencia de la remediación y poder determinar las responsabilidades legales.

Con este fin se han propuestos numerosos indicadores de MST, los cuales se pueden englobar en dos categorías: los que dependen de bases de datos y los que no (Field y col. 2003). A pesar de ello, numerosos autores defienden que ningún método por sí solo puede identificar correctamente el origen de la contaminación fecal en todos los escenarios (Blanch y col. 2006; Field y col. 2003; Griffith y col. 2003; Harwood y col. 2003, Myoda y col. 2003; Stoeckel y col. 2004), especialmente en aquellos donde la carga fecal se encuentra diluida (Hagedorn y col. 2011). El uso simultáneo de diversos métodos podría proporcionar unos resultados más aproximados para la identificación de la fuente contaminante (Blanch y col. 2006; Griffith y col. 2003; Santo Domingo y col. 2007).

Los programas de aprendizaje inductivo permiten construir modelos predictivos basados en datos empíricos de diversos indicadores de MST recogidos a partir de una muestra determinada (Belanche-Muñoz y Blanch 2008; Blanch y col. 2006; Brion y Lingireddy 2003). Mediante la combinación de estos indicadores, el programa puede determinar las fuentes contaminantes y determinar el origen con cierta certidumbre. Éste es el propósito de la plataforma Ichnaea recientemente desarrollada (Sánchez y col. 2011).

En este estudio se utilizó el programa Ichnaea para determinar el origen de la contaminación fecal en un escenario real donde la contaminación fecal se encontraba muy diluida y provenía de diversos orígenes fecales: un canal de riego del Delta del Ebro, y en otro donde era moderada: el tramo final del río Llobregat. Para obtener el modelo predictivo se analizaron tres indicadores tradicionales: *E. coli*, enterococos y colifagos somáticos (SOMCPH); y cuatro métodos de MST independientes de bases de datos: bacteriófagos de *Bacteroides* que infectan a 4 cepas específicas de origen fecal (Gómez-Doñate y col. 2011), análisis por PCR del ADN mitocondrial (Caldwell y col. 2007; Caldwell y Levine 2009; Kortbaoui y col. 2009; Martellini y col. 2005; Schill y Mathes 2008), una PCR multiplex de *Bifidobacterium adolescentes* y *Bif. dentium* (Lynch y col. 2002; Nebra y col. 2003), y cuatro qPCR de bifidobacterias específicas de origen fecal (Gómez-Doñate y col. 2012). De este modo, se pretendió discriminar entre la contaminación de origen humano y animal (cerdo, vaca o ave de corral). Los datos necesarios para la puesta a punto del programa se obtuvieron del análisis de muestras de origen único y conocido (agua residual urbana y de mataderos bovino, porcino y aviar). A partir de ellos se establecieron los modelos predictivos para su aplicación en las muestras ambientales con menores niveles de contaminación.

#### Objetivos

- Comparar la eficiencia de diversos indicadores de MST con muestras de diversa carga fecal (punto de origen, moderada y baja).
- Aplicar el programa de aprendizaje inductivo Ichnaea con el fin de obtener predicciones precisas tanto en muestras antiguas como con contaminación fecal diluida.
- Determinar qué indicadores de MST son más relevantes para determinar el origen de la contaminación en cada tipo de muestra.

#### Resultados

Las muestras de elevada carga fecal y origen conocido, cerdo, humano y las de las cuadras de vaca son las que mostraron un mayor número de *E. coli*, enterococos y SOMCPH. En cambio, en las de ave y las de vaca de matadero se obtuvieron unos resultados significativamente más bajos. En cuanto a los métodos de MST analizados, los fagos de *Bacteroides* específicos de origen fecal mostraron unos buenos resultados: las cepas GA17, PL122 y CW18 detectaron fagos exclusivamente de muestras de aguas con contaminación fecal humana, aviar y bovina respectivamente. Por el contrario, la cepa PG76 reconoció fagos de muestras de aguas residuales humanas, aunque con valores significativamente menores a los de las muestras de cerdo. La multiplex ADO-DEN fue positiva en todas las muestras de origen humano y en dos de ave. Los marcadores mitocondriales utilizados identificaron correctamente el origen excepto algunas muestras humanas que mostraron falsos positivos con los marcadores de cerdo, vaca y ave. En cuanto a la qPCR de bifidobacterias específicas de huésped todas las muestras fueron identificadas correctamente y no se produjeron reacciones cruzadas (ver tabla 1).

Respecto a las muestras del cauce final del río Llobregat, las concentraciones de SOMCPH fueron significativamente menores que las tomadas en el origen (salvo las del interior del matadero bovino). Los fagos de la cepa GA17 fueron detectados en todas las muestras, pero con una concentración entre una y tres unidades logarítmicas menos que los valores obtenidos en las muestras de agua residual. Lo mismo se observó en la qPCR de *Bifidobacterium* específica de humano. El marcador ADO fue positivo en todas las muestras, mientras que DEN sólo en dos de cinco. En cuanto a los fagos de *Bacteroides* específicos de origen animal y los marcadores de ADN mitocondrial fueron detectados sólo esporádicamente y mostraron valores más bajos que los marcadores específicos (ver tabla 2).

Todas las muestras tomadas en el Delta del Ebro (ver figura 1) mostraron unas concentraciones de *E. coli*, enterococos y SOMCPH similares, lo cual indica que el nivel de contaminación fecal en este sistema de canales de riego es homogéneo. Las concentraciones de estos tres indicadores fecales fueron mucho más bajas que las obtenidas en el punto de origen (planta de agua residual y mataderos) y en el río Llobregat. El marcador ADO detectó 13 muestras de las 32 analizadas, mientras que DEN y los marcadores de ADN mitocondrial sólo mostraron resultados positivos en una muestra. Los fagos de *Bacteroides* específicos de huéspedes humano y aviar se detectaron en siete muestras, los de vaca en una, los tres con unos valores muy bajos, y

no se produjo detección con la cepa de cerdo. Tampoco se observaron resultados positivos con las qPCR de bifidobacterias (ver tabla 3).

Al introducir los datos en los modelos generados por Ichnaea, éste identificó con una precisión mayor al 54% al hombre como el principal foco de contaminación fecal en el río Llobregat. En cuanto al Delta del Ebro, la contaminación de ave resultó ser la que contribuyó con un mayor aporte fecal al sistema, aunque se predecían posibles contribuciones humanas y bovinas con una precisión entre el 30,4% y el 67,2% (ver tabla 4).

Los *heatmaps*, mapas en que se indica con mayor grado de certidumbre el marcador que mejor se comporta en cada caso, generados por Ichnea indicaron que en casos de elevada concentración los modelos predictivos con mayor precisión eran los basados en los resultados de los fagos que infectaban las cepas de *Bacteroides* GA17, PG76 y CW18 y en el marcador de ADN mitocondrial BOMITO. En el caso de muestras con baja o moderada carga fecal eran los basados en los fagos de GA17 y PG76, el marcador ADO y el marcador de ADN mitocondrial POMITO (ver figura 2).

## Discusión

Los indicadores de MST propuestos en este estudio no presentan problemas en el momento de identificar muestras tomadas en el origen de la contaminación, tal y como les sucede a la mayoría de los indicadores específicos de origen de contaminación propuestos en los últimos años (Hagedorn y col. 2011). Los indicadores utilizados en este estudio no muestran problemas en el momento de la identificación de muestras mientras el nivel de contaminación sea mayor o igual a 3 unidades logarítmicas de *E. coli*.

Las muestras del río Llobregat representan una situación de carga fecal moderada donde influye el efecto de la antigüedad del aporte fecal. La concentración de los indicadores *E. coli* y SOMCPH fue de 3 unidades logarítmicas menor que en el agua residual urbana. El tramo final del río donde se recogieron las muestras tiene fundamentalmente aportes urbanos (humanos), provenientes de los efluentes de las plantas depuradoras de las ciudades colindantes. Todos los indicadores testados en este estudio confirmaron que la principal fuente contaminante era el hombre. En primer lugar, la ratio fagos de GA17 con los SOMCPH (Muniesa y col. 2012) fue mucho mayor que la del resto de bacteriófagos con los SOMCPH. Esta combinación fagos GA17/SOMCPH ya

### 3.3. Uso de indicadores y del programa de aprendizaje inductivo en estudios de MST

---

se había propuesto como una buena herramienta en estudios de MST para discriminar entre orígenes fecales humano y animal (Muniesa y col. 2012). En segundo lugar, todas las muestras fueron positivas en la amplificación por PCR del indicador *Bif. adolescentis* (Field y Samadpour 2007). Lo mismo sucedió en la qPCR de *Bifidobacterium* específica de humano. Solamente los marcadores mitocondriales presentaron falsos positivos de vaca y ave. Esto puede deberse a la contaminación de origen no fecal, como piel o pelo o restos de carne consumida por los humanos, que todavía esté presente en las heces humanas y que por tanto sea detectado por detección de ADN mitocondrial (Caldwell y col. 2011).

En los canales del sistema de riego del Delta del Ebro los valores de *E. coli* y enterococos se encontraron dentro de los valores establecidos por la directiva europea 2006/7/EC de la calidad del agua de baño recreacional (Anónimo 2006). En esta situación de contaminación fecal tan baja, muchos de los indicadores de MST propuestos pierden su efectividad ya que la concentración de su diana se encuentra por debajo de su límite de detección. Esto sucede en el caso de las qPCR de bifidobacterias y de los indicadores mitocondriales, a excepción de POMITO detectado en la muestra de la salida de la planta de tratamiento de aguas de la urbanización Els Muntells. De nuevo, esto puede deberse a los residuos de carne de otro origen animal en las heces humanas (Anónimo 2006). Esta limitación es común en la mayoría de los métodos moleculares cuando la concentración de *E. coli* es menor a  $10^3$  UFC/100 ml (Jofre y Blanch 2010). Sin embargo, el marcador ADO resultó ser mucho más sensible (Bonjoch y col. 2004) ya que detectó 13 de las 32 muestras, todas ellas recogidas en puntos con posible contribución humana, mientras que DEN solamente fue detectado en una muestra. Las concentraciones de bacteriófagos de *Bacterioides* en todas las muestras fueron muy bajas, o no detectables, cosa que coincidía con los valores de SOMCPH obtenidos.

El sistema de canales de riego del Delta del Ebro es un buen ejemplo del efecto de la dilución y/o la antigüedad de la muestra, donde un solo indicador no es suficiente para proporcionar una identificación fiable del origen de la contaminación. En estas circunstancias una combinación de indicadores de MST y la aplicación de programas de aprendizaje inductivo pueden proporcionar una mayor fiabilidad a los resultados (Belanche-Muñoz y Blanch 2008).

Mediante el software Ichnaea y los datos de las muestras de elevada concentración y origen conocido, se pudo elaborar modelos predictivos que nos permitieron confirmar la contaminación fecal humana con un elevado grado de precisión como el origen



mayoritario de la contaminación fecal del río Llobregat. Cuando aplicamos esta aproximación en el Delta del Ebro se concluyó que los principales agentes contaminantes eran ave y hombre. Estos resultados son consistentes con el escenario real, ya que el canal de muestreo transcurre por dos urbanizaciones y zonas donde hay granjas de aves de corral y salvajes.

CW18, PG76, GA17, BOMITO, ADO y CKMITO son los indicadores seleccionados como los más adecuados en modelos predictivos con baja concentración, dilución y/o efecto de la antigüedad. A medida que estos dos parámetros aumentan algunos indicadores pierden importancia, como DEN o las qPCR, ya que su límite de detección está por encima de la concentración del microorganismo o del parámetro que se pretende detectar.

Los métodos de aprendizaje inductivo como el software Ichnaea son una buena herramienta en potencia para estudios de MST, aplicable a muestras con moderada y baja carga fecal, ya que mediante la combinación adecuada de indicadores es capaz de discriminar el origen contaminante.

#### **Informe del factor de impacto**

Artículo enviado, pendiente de evaluación.

#### **Informe de coautoría**

La doctoranda llevó a cabo junto con Arnau Casanovas-Massana la recogida de muestras. La doctoranda realizó el análisis de los colifagos somáticos, los fagos de *Bacteroides*, la extracción de ADN y el análisis de las muestras de *Bifidobacterium* por qPCR. Además participó en la redacción del artículo y la elaboración de las tablas y figuras.

Dr. Anicet R. Blanch

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Muniesa



1 **Determining fecal sources in waters with diverse pollution loads using traditional and**  
2 **molecular host-specific indicators and applying machine learning methods.**

3

4 **Arnau Casanovas-Massana<sup>1\*▲</sup>, Marta Gómez-Doñate<sup>1\*</sup>, David Sánchez<sup>2</sup>, Lluís A.**  
5 **Belanche-Muñoz<sup>2</sup>, Maite Muniesa<sup>1</sup> and Anicet R. Blanch<sup>1#</sup>**

6 <sup>1</sup>Department of Microbiology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, Barcelona,  
7 Catalonia, Spain.

8 <sup>2</sup>Department of Software, Technical University of Catalonia, Jordi Girona 1-3, Barcelona,  
9 Catalonia, Spain

10

11 \*These authors contributed equally to this work.

12

13 #Corresponding author

14 Mailing address:

15 Avinguda Diagonal, 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

16 Phone: (+34) 93 402 9012

17 Fax: (+34) 93 403 9047

18 Email: [ablanch@ub.edu](mailto:ablanch@ub.edu)

19

20 <sup>▲</sup>Present address: Department of Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public  
21 Health, Yale University, New Haven, Connecticut, USA.

22

23 **Running title:** Use of machine learning methods in MST

24

25 **ABSTRACT**

26 In recent years, many host-specific microbial source tracking (MST) indicators have been  
27 proposed. Many of them have shown to be suitable for the specific detection of fecal  
28 pollution origin at point source. However, when fecal contamination is diluted in receiving  
29 water bodies (lakes, rivers, seas), some of these MST indicators lose their usefulness  
30 because of the constraints of their detection limits and the decrease in the respective target  
31 concentration. Moreover, this discriminative capacity is affected by environmental factors  
32 that determine the specific decay of the target (aging of fecal pollution). As a result, the  
33 overall environmental concentration of some MST indicators in watersheds is significantly  
34 lower than at point source, and consequently, approaches that were initially efficient may  
35 become completely unsuitable. This study compares the efficiency of several MST  
36 indicators using water samples with different concentrations of fecal pollution (point  
37 source, moderate, low), and applies machine learning methods to obtain accurate  
38 predictions even in situations where the combined effect of pollution dilution and aging  
39 renders some MST indicators virtually useless. Some molecular MST indicators have  
40 presented major limitations in waters with low levels of fecal pollution (below 3 log<sub>10</sub> CFU  
41 *E. coli*/100 ml) and their usefulness in these waters is uncertain. Machine learning methods  
42 applied under these low fecal pollution conditions by combining different MST indicators  
43 provided accurate predictions. The best MST indicators selected for waters with low levels  
44 of fecal pollution were mainly host-specific *Bacteroides* bacteriophages, but the qualitative  
45 molecular detection of *Bif. adolescentis* and some DNA mitochondrial markers were also  
46 effective.

47

48 **Keywords:** microbial source tracking, indicator, machine learning methods

49

## 50 **1. INTRODUCTION**

51 Fecal pollution of water poses public health risks and leads to economic losses and  
52 environmental deterioration throughout the world. Effluents from municipal and  
53 slaughterhouse wastewater treatment, combined storm-water and sewer overflows, leakage  
54 of septic systems, runoff from manure and fecal slurries deposited in fields and grazing  
55 pastures, uncontrolled discharge of fecal waste and droppings from wildlife may  
56 contaminate surface or ground waters with the pathogens in feces (Ritter et al. 2002;  
57 Simpson et al. 2002). Directly monitoring microbial pathogens is generally expensive and  
58 technically complex. In addition, pathogens are only present intermittently in water bodies  
59 and usually at low concentrations (Field and Samadpour 2007; Savichtcheva and Okabe  
60 2006). Because of these limitations, water quality regulations are mainly based on the  
61 enumeration of indicator microorganisms such as total coliforms, fecal coliforms,  
62 *Escherichia coli* and enterococci. However, using these indicators does not provide  
63 information about the source of the fecal contamination, since they are widely distributed in  
64 the lower intestine of warm-blooded animals, including humans. Determination of this  
65 source or sources is a key parameter to improve the management of fecal contamination at  
66 the origin, by increasing the efficiency of remediation efforts and resolving the legal  
67 responsibilities for remediation.

68

69 For this purpose, numerous microbial source tracking (MST) methods have been proposed  
70 in recent years that can be divided into library-dependent and library-independent methods  
71 (Field et al. 2003). Library-dependent methods include antibiotic resistance analysis, carbon  
72 source utilization profiling, ribotyping, repetitive PCR and pulsed gel electrophoresis,

73 among others. In general, such approaches lack temporal and geographical stability and  
74 their performance is strongly dependent on the size of the library (Ebdon and Taylor 2006;  
75 Moore et al. 2005; Stoeckel et al. 2004). Furthermore, they are time consuming and labor  
76 intensive. In addition, various authors have reported that no single source-tracking method  
77 correctly determines the source of fecal pollution in all scenarios (Blanch et al. 2006; Field  
78 et al. 2003; Griffith et al. 2003; Harwood et al. 2003; Moore et al. 2005; Myoda et al. 2003;  
79 Noble et al. 2003; Samadpour et al. 2005; Stoeckel et al. 2004). A particularly critical issue  
80 is the generally poor performance of most of these techniques in low fecal load matrices  
81 (Hagedorn et al. 2011). Therefore, simultaneously combining different methods might be a  
82 better approach to identifying the sources of fecal pollution (Blanch et al. 2006; Gourmelon  
83 et al. 2007; Griffith et al. 2003; Santo Domingo et al. 2007).

84

85 Machine learning is a branch of artificial intelligence concerned with the design and study  
86 of algorithms that enable machines, i.e. computers, to learn from data and, in particular,  
87 construct models based on empirical data collected from a modeled phenomenon. Thus, it  
88 could be used to develop predictive models based on a combination of several MST  
89 methods to determine the sources of fecal pollution in water (Belanche-Muñoz and Blanch  
90 2008; Blanch et al. 2006; Brion and Lingireddy 2003). To this end, Sánchez et al. (2011)  
91 developed an integrated open platform machine learning software program called Ichnaea.  
92 This machine learning approach was originally designed to process a specific data matrix  
93 consisting of 103 samples of human and animal origin, described by 26 microbial and  
94 chemical fecal indicators obtained in a European study (Blanch et al. 2006). The machine  
95 learning method that was developed has been adapted to accept MST data matrices  
96 containing samples with fluctuating fecal concentration levels and fecal indicators with

97 different environmental persistence. Moreover, it can be applied to different geographical  
98 and climatic areas.

99

100 In the present study, we used Ichnaea in a real scenario in which the water presented a low  
101 level of fecal pollution. To obtain the data required by Ichnaea for the construction of the  
102 predictive models, three classical fecal indicators (*E. coli*, enterococci and somatic  
103 coliphages) were used, along with four library-independent MST methods, namely the  
104 detection of host-specific *Bacteroides* phages, the PCR analysis of mitochondrial DNA  
105 genetic markers, multiplex PCR with *Bifidobacterium adolescentis* and *B. dentium* markers,  
106 and four bifidobacterial host-specific qPCRs. Phages infecting *Bacteroides* have been  
107 proposed as an alternative method of fecal source tracking because of their accuracy,  
108 specificity and higher persistence in the environment than traditional fecal indicator  
109 bacteria (Belanche-Muñoz and Blanch 2008; Blanch et al. 2006; Durán et al. 2002; Puig et  
110 al. 1999). Several *Bacteroides* host strains have been isolated to discriminate human fecal  
111 contamination and have performed well in different geographic areas (Ebdon et al. 2007;  
112 Payan et al. 2005; Vijayavel et al. 2010). Recently, new strains have been proposed for  
113 cattle, pig and poultry (Gómez-Doñate et al. 2011), making this method suitable for the  
114 discrimination of human and animal fecal pollution. The second method was based on the  
115 detection of specific mitochondrial DNA genetic markers. Large amounts of eukaryotic  
116 epithelial cells are excreted daily in the feces of warm-blooded animals (Iyengar et al.  
117 1991). Since there are numerous mitochondria in each cell, and each mitochondrion has  
118 several copies of mitochondrial DNA, the detection of specific mitochondrial markers has  
119 been suggested as a promising MST tool. Various primers targeting the mitochondrial DNA  
120 of humans, livestock (sheep, cattle, pigs and poultry), pets (cats and dogs) and wildlife

121 (Canada geese and white-tailed deer) have been designed for singleplex, multiplex, nested  
122 or quantitative PCR ( Carldwell and Levine 2009; Carldwell et al. 2007; Kortbaoui et al.  
123 2009; Martellini et al. 2005; Schill and Mathes 2008). The third and fourth methods  
124 selected were based on the detection of host-specific species of *Bifidobacterium sp.*  
125 *Bifidobacterium sp.* is one of the most abundant genera in the gut of humans and animals,  
126 and some species have been reported to be host-specific (Matsuki et al. 1999; Sinton et al.  
127 1998). We selected a multiplex nested PCR, which was proposed to detect *B. adolescentis*  
128 and *B. dentium*. The combined detection of these two species has been related to human  
129 fecal contamination (Lynch et al. 2002; Nebra et al. 2003). In addition, we used a recently  
130 proposed *Bifidobacteriaceae*-specific qPCR with a set of common primers and four specific  
131 probes to discriminate between poultry, cattle, pig and human fecal pollution (Gómez-  
132 Doñate et al. 2012).

133

134 In this study, we evaluated the performance of the four MST methods described above and  
135 the classical fecal indicators to determine the source of fecal pollution in a real scenario  
136 with low levels of fecal pollution. Results from unique point source were used as training  
137 set into the Ichnaea software to generate predictive models. Finally, the most accurate  
138 prediction of fecal source was estimated for each environmental studied samples using the  
139 predictive models generated by Ichnaea. To our knowledge, this is the first attempt to use  
140 machine learning methods to determine the origin of fecal pollution in water in a real  
141 scenario, which could represent a major step forward in the solution of the MST problem.

142

## 143 **2. MATERIALS AND METHODS**

### 144 **2.1. Study sites and sample collection**



145 The main site of study was a system of water irrigation channels potentially exposed to  
146 fecal contamination in the Ebre Delta (Fig 1). The Ebre Delta is a natural delta with an area  
147 of 320 km<sup>2</sup> located in Catalonia (Northeastern Spain), where the Ebre River spreads out and  
148 drains into the Mediterranean Sea. It is one of the largest wetlands in Western Europe,  
149 containing several fresh and saltwater lagoons with a high diversity of bird and fish species.  
150 More than 75% of the delta drainage area is composed of agricultural fields, most of which  
151 contain rice crops. The rice cultivation is cyclic: from April to early September, fresh water  
152 flows continuously from the river through different channels and floods the rice fields. The  
153 water then flows by gravity into collecting channels that finally discharge into the sea. After  
154 the harvest in early September, the water circulation is stopped and the fields dry up  
155 through evaporation during the winter. In addition to the agricultural fields, there are some  
156 scattered cattle-grazing patches in the area under study, and some poultry/livestock  
157 facilities nearby.

158

159 **Figure 1.** Location of Ebre Delta sampling sites (S1-S8). Aerial photograph courtesy of  
160 <http://www.Earth.Google.com> and the Institut Cartogràfic de Catalunya

161



162

163 Water samples were collected as shown in Figure 1. The first and second points (S1, S2)  
164 were located in the main channel immediately upstream and downstream of the town of Els  
165 Muntells (500-550 inhabitants), respectively. The third sampling site (S3) was downstream  
166 from Els Muntells sewage treatment plant. Site four (S4) was located near the Els  
167 Eucaliptus complex (250 vacation apartments), just upstream from where the main channel  
168 drains into a small lagoon. Samples were taken from the lagoon itself, which was site  
169 number five (S5). Samples were collected from two more secondary channels draining into  
170 the lagoon (sites S6 and S7). Finally, water was taken from the channel that carries the  
171 water from the lagoon to the sea (site S8). Samplings were performed bimonthly from May  
172 to November 2010. All samples were collected using aseptic techniques and refrigerated at  
173 4°C for up to 6 h before being processed in accordance with standardized protocols (APHA  
174 1998; ISO 1994).

175

176 Additionally, freshwater samples were collected monthly from January to May 2010 in the  
177 lower course of the Llobregat River (LLOB) at a sampling site located 7 km from the point  
178 at which it drains into the sea. According to the regional water authority ([http://aca-  
179 web.gencat.cat](http://aca-web.gencat.cat)), this river runs through a heavily urbanized area and is mainly subjected to  
180 the influence of several effluents from sewage treatment plants. However, the diffuse and  
181 irregularly distributed contamination from animals (pets, wildlife and livestock) cannot be  
182 ruled out (Lucena et al. 1988; Rubiano et al. 2012).

183

184 Inductive machine learning methods require a training set of data from samples of known  
185 and unique fecal origin in order to develop predictive models for further application in real

186 samples. To this end, human and animal fecal samples were collected from July 2011 to  
187 February 2012. Human sewage samples (HM) were obtained from the influent sewer  
188 entering an urban wastewater treatment plant (population equivalent of 400,000) after the  
189 bar screen. Animal samples were obtained from the following sources: slurry and  
190 wastewater from a pig slaughterhouse (PG); poultry slaughterhouse wastewater effluent  
191 (PL); and pooled feces and process water from a ruminant slaughterhouse (CW). All  
192 slaughterhouses were located in Catalonia (Northeastern Spain) and had separate pipes for  
193 animal wastewater and the human wastewater from employees' lavatories and showers.

194

## 195 **2.2. *E. coli*, enterococci and somatic coliphages (SOMCPH) enumeration**

196 Each environmental water sample was filtered through a 0.44 µm nitrocellulose filter  
197 (Millipore, Molsheim, France). Filters were then placed on Chromocult® agar plates  
198 (Merck, Darmstadt, Germany) at 44.5°C for 24 h to enumerate *E. coli* or on m-  
199 Enterococcus agar plates (Difco, Sparks, MD, USA) at 37°C for 48 h followed by Bile  
200 Esculin Agar (Scharlau, Barcelona, Spain) for 3 h at 44°C to enumerate the enterococci  
201 colonies, based on the hydrolysis of esculin (Figueras et al. 1998; Manero and Blanch  
202 1999). The volumes filtered varied according to the expected contamination of the sample.  
203 Somatic coliphages (SOMCPH) were counted after filtration of the sample through low  
204 protein-binding 0.22-µl pore size membrane filters (Millex-GP; Millipore, Molsheim,  
205 France), and the phages were analyzed by the double agar layer technique using *E. coli*  
206 strain WG5 in accordance with the standardized procedure (ISO 2000).

207

## 208 **2.3. Detection of host-specific *Bacteroides* phages**

209 *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 and CW18, and *B. fragilis* PG76 and PL122 (Gómez-  
210 Doñate et al. 2011; Payan et al. 2005) were used as host strains for phage detection. These  
211 strains are specific for the detection of phages from human, cattle, pig and poultry fecal  
212 sources, respectively. Phages infecting these *Bacteroides* strains were enumerated in all  
213 samples using the double agar layer plaque assay, as previously described (ISO 2001).

214

#### 215 **2.4. Bacterial DNA extraction**

216 DNA was directly extracted from 200 µl of slaughterhouse and wastewater samples using  
217 the QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) in accordance with  
218 the manufacturer's instructions, and the DNA was eluted in 50 µl of the elution buffer  
219 provided. Water samples from the Ebre Delta were first concentrated by centrifuging 200  
220 ml of water at 16,000 *xg* for 10 min. The pellet was resuspended in 10 ml of Ringer ¼  
221 solution (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) and centrifuged again at 16,000 *xg* for 10  
222 min. The pellet was then resuspended in 200 µl of Ringer ¼ solution and extracted with the  
223 kit as described above. Water samples from the Llobregat River were concentrated by  
224 centrifuging 50 ml of water at 16,000 *xg* for 10 min and the pellet was resuspended in 200  
225 µl of Ringer ¼ solution and extracted with the kit as described above.

226

#### 227 **2.5. PCR analysis of mitochondrial markers**

228 Three nested PCR assays were performed on each sample to detect mitochondrial host-  
229 specific DNA associated with cattle, pigs and chicken (BOMITO, POMITO and CKMITO,  
230 respectively). The primers and conditions used were the same as those described previously  
231 (Kortbaoui et al. 2009; Martellini et al. 2005), with the following modifications: 2 µl of the  
232 first PCR reaction was used in the nested PCR, and 0.4 µg µL<sup>-1</sup> of bovine serum albumin

233 (BSA; Madison, WI, USA) was added to all reactions. The amplicons were separated after  
234 electrophoresis on 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. Positive  
235 controls were performed in all reactions by using mitochondrial DNA extractions from  
236 cow, pig and chicken liver.

237

## 238 **2.6. *B. adolescentis* (ADO) and *B. dentium* (DEN) detection**

239 ADO-DEN multiplex PCR was used to detect *B. adolescentis* and *B. dentium* in all samples  
240 as described previously (Bonjoch et al. 2004), with the addition of 0.4  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  of bovine  
241 serum albumin (BSA; Madison, WI, USA) to all reactions. The amplicons were separated  
242 after electrophoresis on 2.5% agarose gels and visualized with ethidium bromide staining.  
243 Positive controls were performed using *B. adolescentis* DSM 20083<sup>T</sup> and *B. dentium* DSM  
244 20084<sup>T</sup>.

245

## 246 **2.7. Bifidobacterial host-specific qPCR analysis**

247 Each sample was analyzed using four bifidobacterial host-specific qPCRs (cattle, pig,  
248 poultry and human) (Gómez-Doñate et al. 2012). Positive controls and negative non-  
249 template controls were included in all experiments. The detection limits were 45 genomic  
250 copies (GC) per reaction using the human probe (HM probe), 21 GC for the pig probe  
251 (PGprobe), 25 GC for the poultry probe (PLprobe), and 46 GC for the bovine probe  
252 (CWprobe).

253

## 254 **2.8. Statistical analysis**

255 Analysis of variance tests (ANOVA) and the F-test were performed to compare the average  
256 concentrations of *E. coli*, enterococci and SOMCPH between all samples. When the

257 standard deviation of the compared samples was found to be statistically different  
258 according to Cochran's C test, Bartlett's test, Hartley's test and Levene's test, the  
259 comparison was performed using the Kruskal–Wallis test with the median concentrations.  
260 All statistical analysis was performed using Statgraphics Plus software (version 5.1;  
261 Rockville, MD, USA).

262

### 263 **2.9. Machine learning methods: Ichnaea modeling**

264 The starting point for the Ichnaea system was a data matrix containing the set of MST  
265 indicators described above and the values obtained for those indicators in the samples of  
266 known fecal origin. The main characteristic of the matrix (called the training matrix) was  
267 that all samples were collected at point source, i.e. high fecal pollution, and with no delay  
268 in the time between dumping and sampling. Given the training matrix, the system computed  
269 a number of predictive models for different dilution and aging factors (Bonjoch et al. 2009;  
270 Lasobras et al. 1997; Martellini et al. 2005), using several off-the-shelf classifiers such as  
271 linear discriminant analysis, the support vector machine, nearest neighbors and multinomial  
272 regression (Duda et al. 2001). Each model was computed using a different subset of fecal  
273 indicators and its accuracy was assessed with ten-fold cross-validation (Geisser 1975). The  
274 system also estimates the importance of each indicator in the training matrix at different  
275 concentration levels, generating a heat map that presents all MST methods sorted by the  
276 frequency with which they selected the best predictive models at each level. Since  
277 persistence in the environment is dependent on season, the importance of indicators and  
278 MST methods in two different seasons (summer and winter) was taken into account  
279 (Ballesté and Blanch 2010; Bonjoch et al. 2011; Bonjoch et al. 2009; Muniesa et al. 1999).  
280 Bifidobacterial host-specific qPCR results were not included in the generation of the heat

281 maps because of the negative results in all samples (Ebre Delta irrigation channels) with  
282 low levels of fecal pollution.

283

284 Once Ichnaea had been trained with the set of data from samples of known and unique fecal  
285 origin, all data matrices from the Llobregat River and Ebre Delta samples were introduced  
286 into the system, which selected a feasible model subset from the previously computed set of  
287 models. This subset was made up of those models that covered the sample to be predicted.  
288 A model was considered to cover a sample if every indicator required by the model was  
289 present in that particular sample.

290

291 Once all of the selected models had made their prediction, an overall prediction was  
292 determined by a simple majority vote. The output delivered included a prediction of the  
293 fecal source of the sample, a measure of the system's confidence in this prediction (based  
294 on the percentage of models that predicted the majority vote), and a recommendation of  
295 certain additional indicators that, if measured, might help increase the confidence of the  
296 prediction. This latter information was computed by analyzing the estimated performance  
297 of all models that did not cover the sample to be predicted.

298

### 299 **3. THEORY**

300 In 2011, Sanchez et al. (2011) developed an integrated open platform machine learning  
301 software program called Ichnaea. This program has been trained with water samples  
302 polluted from an unique and known fecal sources. Moreover, environmental persistence of  
303 the studied MST indicators has also been accounted based on previous studies. Then,  
304 predictive models when dilutions effects and pollution aging occurs have been developed

305 using the best set of the lowest number of MST indicators. Predictive models have been  
306 applied to resolve the most important fecal source in moderate fecal polluted river water  
307 and in high diluted environmental water samples from a delta system. This approach  
308 showed to be useful to identify the main source of fecal pollution in environmental water  
309 samples (diluted and aged).

310

## 311 **4. RESULTS**

### 312 **4.1. Samples of known fecal origin**

313 In total, 15 samples from slaughterhouses were collected: five from poultry, five from cattle  
314 and five from pigs. Four more samples were collected from raw urban sewage (Table 1).  
315 The samples from pigs and humans showed the highest *E. coli*, enterococci and SOMCPH  
316 concentrations ( $p < 0.05$ ). The concentrations in poultry samples were significantly lower  
317 than the human and pig samples ( $p < 0.05$ ). Cattle samples taken from pooled feces (CW3  
318 and CW4) showed high concentrations, statistically equivalent to those of the human and  
319 pig samples ( $p > 0.005$ ). However, the cattle samples taken from the slaughterhouse process  
320 water (CW1, CW2 and CW5) showed the lowest concentrations. Regarding the MST  
321 methods, the host-specific *Bacteroides* phages showed good performances: the GA17,  
322 PL122 and CW18 strains were highly specific, recovering phages exclusively in human,  
323 poultry and cattle samples, respectively. On the other hand, PG76 presented false positive  
324 reactions in human samples, although the concentrations reported in these human samples  
325 were significantly lower than in pig samples ( $p = 0.016$ ). ADO-DEN multiplex was positive  
326 in all human samples and in two poultry samples. The mitochondrial DNA markers  
327 correctly identified all samples of animal origin, although some human samples gave false  
328 positive results for pig, cattle or poultry markers. With respect to the bifidobacterial host-



329 specific qPCRs, they all showed high specificity and correctly identified all sample types  
330 with no crossed reactions.

331 **Table 1.** Results of classical fecal indicators and MST methods in samples of known and unique fecal origin at source point (pig,  
 332 poultry, cow and human). Units are referred to analyzed volumes as indicated on text.

Sample	Fecal indicators (CFU or PFU/100 ml)			Host-specific <i>Bacteroides</i> phages (PFU/10 ml)				ADO-DEN multiplex <sup>a</sup>		Mitochondrial markers <sup>a</sup>			<i>Bifidobacterial</i> host-specific qPCR (GC/10 µl)			
	<i>E. coli</i>	Enterococci	SOMCPH	GA17	PL122	CW18	PG76	ADO	DEN	POMITO	BOMITO	CKMITO	HMprobe	PLprobe	CWprobe	PGprobe
PG1	2.34×10 <sup>6</sup>	1.45×10 <sup>5</sup>	3.33×10 <sup>5</sup>	0	0	0	1.67×10 <sup>3</sup>	-	-	+	-	-	0	0	0	4.10×10 <sup>5</sup>
PG2	1.20×10 <sup>7</sup>	1.25×10 <sup>6</sup>	5.63×10 <sup>7</sup>	0	0	0	1.40×10 <sup>4</sup>	-	-	+	-	-	0	0	0	1.00×10 <sup>6</sup>
PG3	1.35×10 <sup>6</sup>	5.50×10 <sup>4</sup>	2.84×10 <sup>6</sup>	0	0	0	1.76×10 <sup>3</sup>	-	-	+	-	-	0	0	0	1.10×10 <sup>5</sup>
PG4	1.50×10 <sup>7</sup>	1.20×10 <sup>5</sup>	1.48×10 <sup>7</sup>	0	0	0	3.00×10 <sup>3</sup>	-	-	+	-	-	0	0	0	3.00×10 <sup>3</sup>
PG5	1.85×10 <sup>6</sup>	1.00×10 <sup>5</sup>	9.30×10 <sup>6</sup>	0	0	0	6.10×10 <sup>3</sup>	-	-	+	-	-	0	0	0	3.70×10 <sup>3</sup>
PL1	5.50×10 <sup>4</sup>	2.30×10 <sup>4</sup>	5.50×10 <sup>4</sup>	0	2.90×10 <sup>2</sup>	0	0	+	-	-	-	+	0	1.20 x10 <sup>4</sup>	0	0
PL2	7.40×10 <sup>4</sup>	3.00×10 <sup>3</sup>	7.40×10 <sup>4</sup>	0	1.00×10 <sup>2</sup>	0	0	-	-	-	-	+	0	9.70 x10 <sup>3</sup>	0	0
PL3	2.34×10 <sup>3</sup>	7.70×10 <sup>2</sup>	2.34×10 <sup>3</sup>	0	1.27×10 <sup>1</sup>	0	0	-	-	-	-	+	0	1.30 x10 <sup>4</sup>	0	0
PL4	2.70×10 <sup>4</sup>	1.87×10 <sup>4</sup>	2.70×10 <sup>4</sup>	0	2.60×10 <sup>2</sup>	0	0	-	-	-	-	+	0	9.20 x10 <sup>3</sup>	0	0
PL5	7.40×10 <sup>4</sup>	4.30×10 <sup>4</sup>	7.40×10 <sup>4</sup>	0	1.00×10 <sup>2</sup>	0	0	+	-	-	-	+	0	8.80 x10 <sup>3</sup>	0	0
CW1	2.12×10 <sup>2</sup>	1.87×10 <sup>2</sup>	2.00×10 <sup>1</sup>	0	0	2.00	0	-	-	-	+	-	0	0	1.30 x10 <sup>2</sup>	0
CW2	9.97×10 <sup>3</sup>	7.65×10 <sup>3</sup>	6.22×10 <sup>3</sup>	0	0	2.00	0	-	-	-	+	-	0	0	1.60 x10 <sup>1</sup>	0
CW3	1.52×10 <sup>7</sup>	6.52×10 <sup>6</sup>	1.06×10 <sup>7</sup>	0	0	3.00	0	-	-	-	+	-	0	0	9.80 x10 <sup>4</sup>	0
CW4	1.02×10 <sup>7</sup>	8.60×10 <sup>6</sup>	7.40×10 <sup>6</sup>	0	0	2.90	0	-	-	-	+	-	0	0	1.10 x10 <sup>5</sup>	0
CW5	8.72×10 <sup>3</sup>	7.53×10 <sup>3</sup>	1.00×10 <sup>2</sup>	0	0	3.00	0	-	-	-	+	-	0	0	3.10 x10 <sup>1</sup>	0
HM1	4.50×10 <sup>6</sup>	3.50×10 <sup>6</sup>	8.80×10 <sup>5</sup>	4.80×10 <sup>3</sup>	0	0	1.50×10 <sup>2</sup>	+	+	+	+	-	4.50 x10 <sup>3</sup>	0	0	0
HM2	6.00×10 <sup>6</sup>	3.75×10 <sup>6</sup>	1.90×10 <sup>6</sup>	2.35×10 <sup>3</sup>	0	0	3.00×10 <sup>1</sup>	+	+	-	-	-	2.40 x10 <sup>3</sup>	0	0	0
HM3	4.50×10 <sup>6</sup>	2.90×10 <sup>6</sup>	1.77×10 <sup>6</sup>	3.90×10 <sup>3</sup>	0	0	3.05×10 <sup>2</sup>	+	+	-	+	-	2.50 x10 <sup>3</sup>	0	0	0
HM4	4.25×10 <sup>6</sup>	2.80×10 <sup>6</sup>	2.52×10 <sup>6</sup>	9.20×10 <sup>2</sup>	0	0	5.75×10 <sup>2</sup>	+	+	-	-	-	1.10 x10 <sup>3</sup>	0	0	0

333 <sup>a</sup> +, positive signal; -, negative signal

334        **4.2.        Llobregat River samples**

335 Five water samples were collected from the lower course of the Llobregat River (Table 2).  
336 SOMCPH concentrations were significantly lower than those of the point-source samples  
337 ( $p=0.0001$ ), except for the cattle slaughterhouse process water samples. GA17 phages were  
338 present in all samples, with concentrations one to three  $\log_{10}$  units less than in urban sewage  
339 ( $p=0.017$ ). Furthermore, the ADO marker was detected in all samples and the DEN marker  
340 was present in two out of five. The bifidobacterial qPCR human-specific target was also  
341 detected in all samples, but with concentrations two or three  $\log_{10}$  units lower than in raw  
342 urban sewage. Some animal-specific *Bacteroides* phages and mitochondrial DNA markers  
343 were detected unevenly.

344

345        **4.3.        Ebre Delta samples**

346 All sampling sites presented similar concentrations of *E. coli*, enterococci and somatic  
347 coliphages ( $p>0.05$ ), which would indicate that the levels of fecal pollution were relatively  
348 homogeneous in the whole water irrigation channel system (Table 3). Furthermore,  
349 concentrations of the three fecal indicators were lower in all Ebre sites than in the point-  
350 source samples or the Llobregat River samples ( $p<0.05$ ), with the exception of the cattle  
351 slaughterhouse process water samples. The ADO marker was detected in 13 out of 32  
352 samples, while the DEN marker and mitochondrial DNA markers were each present in only  
353 one sample. Human- and poultry-specific *Bacteroides* phages were each detected in seven  
354 samples. Cattle-specific phages were only present in two samples and no pig-specific  
355 *Bacteroides* phages were detected. Nevertheless, all results of the *Bacteroides* phages  
356 showed very low or negative values in the volume assayed, and nor was there any detection  
357 using any of the bifidobacterial host-specific qPCRs.

358 **Table 2.** Results of classical fecal indicators and MST methods in the Llobregat River samples (LLOB).

Sample	Fecal indicators (CFU or PFU/100 ml)			Host-specific <i>Bacteroides</i> phages (PFU/10 ml)				ADO-DEN multiplex <sup>a</sup> (2 ml)		Mitochondrial markers <sup>a</sup> (2 ml)			Bifidobacterial host-specific qPCR (GC/10 µl)			
	<i>E. coli</i>	Enterococci	SOMCPH	GA17	PL122	CW18	PG76	ADO	DEN	POMITO	BOMITO	CKMITO	HMprobe	PLprobe	CWprobe	PGprobe
LLOB1	1.80 x10 <sup>3</sup>	ND	5.00×10 <sup>3</sup>	5.00×10 <sup>1</sup>	5.0	0	0	+	-	-	+	-	5.30 x10 <sup>1</sup>	0	0	0
LLOB2	8.00 x10 <sup>2</sup>	ND	1.07×10 <sup>4</sup>	1.60×10 <sup>1</sup>	0	0	0	+	-	-	-	+	5.50 x10 <sup>0</sup>	0	0	0
LLOB3	1.45 x10 <sup>3</sup>	ND	2.20×10 <sup>4</sup>	4.00	2.0	0	0.2	+	+	-	+	-	4.20 x10 <sup>1</sup>	0	0	0
LLOB4	8.20 x10 <sup>3</sup>	ND	2.56×10 <sup>3</sup>	4.00	0.1	0.1	0.2	+	+	-	-	-	1.30 x10 <sup>1</sup>	0	0	0
LLOB5	2.50 x10 <sup>3</sup>	ND	3.50×10 <sup>3</sup>	1.00×10 <sup>1</sup>	0	0	0.2	+	-	-	-	-	5.90 x10 <sup>0</sup>	0	0	0

359 <sup>a</sup> +, positive signal; -, negative signal

360 <sup>b</sup>ND, not done

361

362 **Table 3.** Results of classical fecal indicators and MST methods in the Ebre Delta samples.

Sample		Fecal indicators (CFU or PFU/100 ml)			Host-specific <i>Bacteroides</i> phages (PFU/10 ml)				ADO-DEN multiplex <sup>a</sup> (8 ml)		Mitochondrial markers <sup>a</sup> (8 ml)			Bifidobacterial host-specific qPCR (GC/80 ml)			
Site	month	<i>E. coli</i>	Enterococci	SOMCPH	GA17	PL122	CW18	PG76	ADO	DEM	POMITO	BOMITO	CKMITO	HMprobe	PLprobe	CWprobe	PGprobe
S1	May	7.80×10 <sup>1</sup>	9.80×10 <sup>1</sup>	2.00×10 <sup>1</sup>	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	July	7.50×10 <sup>1</sup>	9.00×10 <sup>1</sup>	2.42×10 <sup>3</sup>	0.2	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	2.40×10 <sup>2</sup>	2.65×10 <sup>2</sup>	3.22×10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	2.35×10 <sup>2</sup>	1.40×10 <sup>2</sup>	8.00×10 <sup>1</sup>	1.0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
S2	May	3.40×10 <sup>1</sup>	1.08×10 <sup>2</sup>	3.80×10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	July	4.30×10 <sup>2</sup>	9.00×10 <sup>1</sup>	4.41×10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	2.00×10 <sup>2</sup>	1.55×10 <sup>2</sup>	2.84×10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	3.10×10 <sup>2</sup>	1.15×10 <sup>2</sup>	1.20×10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
S3	May	3.00×10 <sup>2</sup>	3.00×10 <sup>2</sup>	4.80×10 <sup>3</sup>	0.1	0.4	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	July	1.20×10 <sup>3</sup>	3.20×10 <sup>2</sup>	2.80×10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	2.50×10 <sup>1</sup>	2.45×10 <sup>2</sup>	1.84×10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	4.75×10 <sup>3</sup>	5.50×10 <sup>2</sup>	5.36×10 <sup>3</sup>	2.0	0	0	0	+	-	+	-	-	0	0	0	0
S4	May	4.00×10 <sup>2</sup>	6.50×10 <sup>1</sup>	1.08×10 <sup>3</sup>	0	0	0.1	0	+	+	-	+	-	0	0	0	0
	July	7.00×10 <sup>3</sup>	6.40×10 <sup>2</sup>	3.48×10 <sup>3</sup>	0	0.8	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	2.30×10 <sup>2</sup>	1.40×10 <sup>2</sup>	2.22×10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	4.25×10 <sup>2</sup>	1.25×10 <sup>2</sup>	5.00×10 <sup>2</sup>	1.0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
S5	May	1.85×10 <sup>2</sup>	1.02×10 <sup>2</sup>	4.80×10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	July	8.05×10 <sup>2</sup>	3.25×10 <sup>2</sup>	1.18×10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	1.55×10 <sup>2</sup>	1.00×10 <sup>2</sup>	1.70×10 <sup>3</sup>	1.0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	2.45×10 <sup>2</sup>	1.50×10 <sup>2</sup>	2.40×10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
S6	May	2.35×10 <sup>2</sup>	2.80×10 <sup>2</sup>	2.00×10 <sup>1</sup>	0.2	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0

	July	$2.00 \times 10^2$	$3.35 \times 10^2$	$9.20 \times 10^2$	0	0.2	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	$1.05 \times 10^2$	$1.00 \times 10^2$	$7.40 \times 10^2$	0	1.0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	$2.40 \times 10^2$	$1.30 \times 10^2$	$2.20 \times 10^2$	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
S7	May	$6.20 \times 10^1$	$4.80 \times 10^1$	$1.60 \times 10^2$	0	0	0.2	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	July	$2.15 \times 10^3$	$1.95 \times 10^2$	$3.18 \times 10^3$	0	1.4	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	$1.55 \times 10^2$	$1.75 \times 10^2$	$2.80 \times 10^2$	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	$2.20 \times 10^2$	$5.50 \times 10^1$	$2.80 \times 10^2$	0	0	0	0	+	-	-	-	+	0	0	0	0
S8	May	$8.50 \times 10^1$	$1.60 \times 10^2$	$1.40 \times 10^2$	0	0.4	0	0	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	July	$7.15 \times 10^2$	$1.40 \times 10^2$	$1.28 \times 10^3$	0	2.1	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	September	$1.55 \times 10^2$	$1.70 \times 10^2$	$1.00 \times 10^3$	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0
	November	$2.60 \times 10^2$	$8.00 \times 10^1$	$5.00 \times 10^2$	0	0	0	0	-	-	-	-	-	0	0	0	0

363

<sup>a</sup> +, positive signal; -, negative signal

364        **4.4.        Machine learning modeling**

365        The models generated by Ichnaea showed that the main source of fecal pollution in the  
366        Llobregat River was human (Table 4). The accuracy of this prediction was higher than 54%  
367        in all samples. In the Ebre Delta (Table 4), poultry was the main fecal pollution source in  
368        26 out of 32 samples. The remaining samples were predicted to contain cattle (four out of  
369        32) or human (two out of 32) fecal pollution. The accuracy of the prediction ranged from  
370        30.4% to 67.2% and was slightly lower for some samples compared with the Llobregat  
371        River.

372

373        The heat maps generated indicated that at high fecal pollution concentrations, the predictive  
374        models with the highest accuracy values were based mostly on the phages infecting  
375        *Bacteroides* strains GA17, PG76, CW18 and BOMITO. However, the best models for  
376        waters with moderate or low levels of fecal pollution selected primarily GA17, PG76, ADO  
377        and POMITO (Figure 2).

378

379 **Table 4.** *Ichnaea* predictions of the fecal pollution source of samples. Accuracy is based on  
 380 the percentage of models generated that predicted the origin of the majority of the pollution.  
 381 LLOB: Llobregat River. S1-S8, sampling sites in the Ebre Delta.

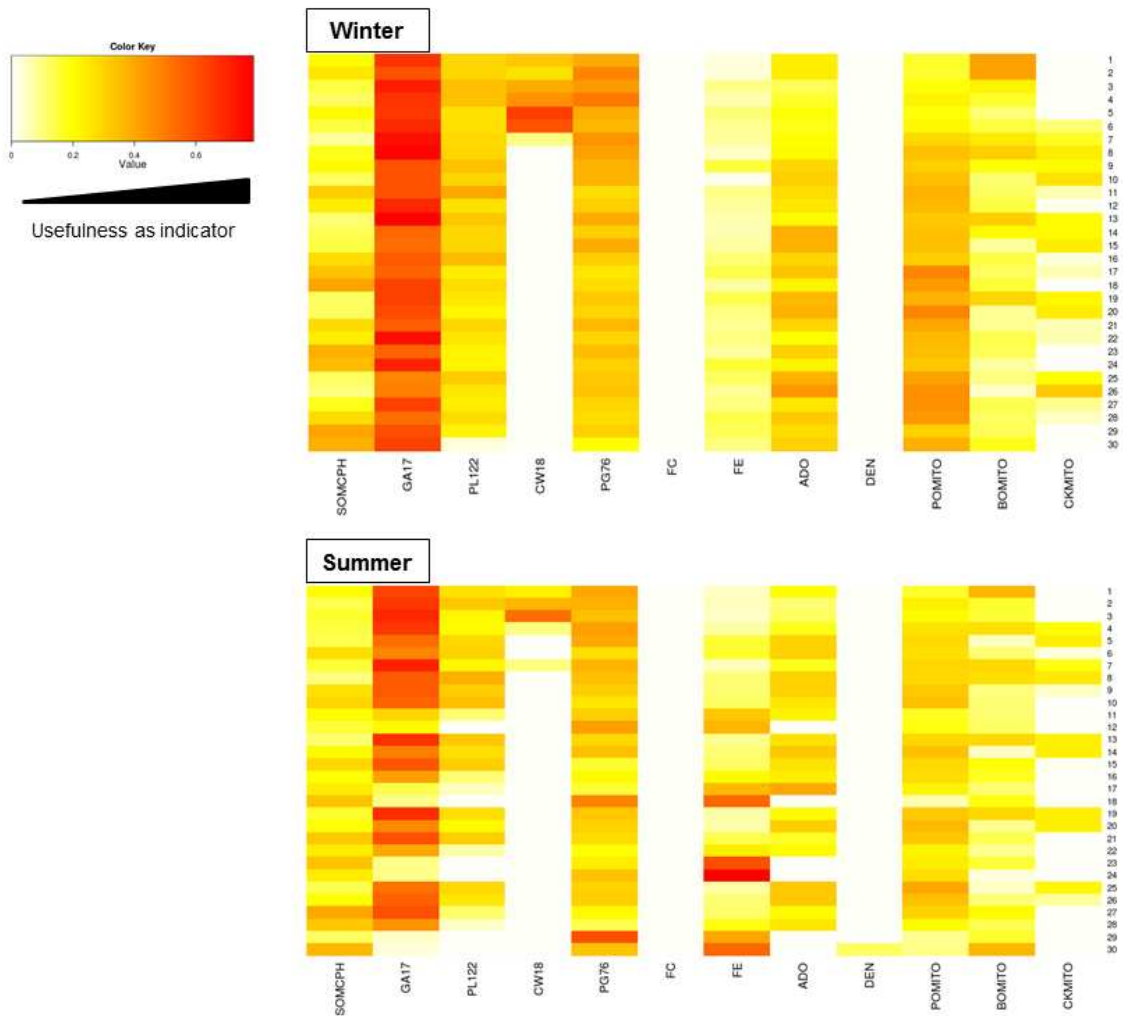
<b>Sample</b>	<b>Month</b>	<b>Predicted source</b>	<b>Accuracy</b>
LLOB1	January	Human	62.5%
LLOB2	February	Human	77.4%
LLOB 3	March	Human	53.9%
LLOB 4	April	Human	71.0%
LLOB 5	May	Human	78.6%
S1	May	Poultry	51.3%
	July	Poultry	34.1%
	September	Cattle	38.4%
	November	Poultry	45.9%
S2	May	Poultry	45.9%
	July	Cattle	32.9%
	September	Cattle	36.4%
	November	Poultry	58.9%
S3	May	Poultry	43.4%
	July	Poultry	30.4%
	September	Poultry	33.4%
	November	Human	56.5%
S4	May	Cattle	31.6%
	July	Poultry	53.7%
	September	Poultry	33.7%
	November	Poultry	47.1%
S5	May	Poultry	44.3%
	July	Poultry	36.5%
	September	Human	32.0%
	November	Poultry	60.5%
S6	May	Poultry	48.7%
	July	Poultry	46.4%
	September	Poultry	65.3%
	November	Poultry	60.2%
S7	May	Poultry	51.7%
	July	Poultry	57.6%
	September	Poultry	47.8%
	November	Poultry	71.1%
S8	May	Poultry	67.2%
	July	Poultry	63.2%
	September	Poultry	39.6%
	November	Poultry	61.1%

382



383

384 **Figure 2.** Heat maps estimating the importance of fecal indicators in the training matrix at  
385 different concentration levels. The lateral numbers are a measure of the increasing dilution  
386 and aging of samples. The top rows refer to fresh, highly concentrated samples and the  
387 bottom rows to less concentrated and older samples. Color key: red corresponds to those  
388 indicators shown to be more useful as source tracers in a given level of sample dilution and  
389 age, and white is used for less useful indicators.



390

391

392

393       **5. DISCUSSION**

394 Most host-specific indicators used in this study determined the origin of fecal  
395 contamination at point source (urban sewage or slaughterhouse wastewater). GA17, ADO  
396 and human-specific bifidobacterial qPCR correctly identified the human fecal source in  
397 these samples. Similarly, other markers determined their corresponding fecal origins at  
398 point source. Thus, these MST indicators did not present any functional limitations when  
399 fecal pollution concentrations in water were higher than 3 log<sub>10</sub> units of *E. coli*, and may  
400 provide valuable information about the fecal source in these types of samples. This  
401 information is complementary to that provided by classical microbial indicators of water  
402 quality (e.g. *E. coli* or somatic coliphages content), which indicate the total fecal pollution  
403 load in water. In general, most of the host-specific MST indicators proposed in recent years  
404 based on either molecular or culture-dependent methods do not present problems with the  
405 identification of fecal pollution origins at point source (Hagedorn et al. 2011).

406

407 The Llobregat River represented a situation of moderate dilution or aging of fecal pollution.  
408 The fecal concentration in the samples was around 3 log<sub>10</sub> units of *E. coli* and somatic  
409 coliphages lower than urban wastewater. The Llobregat River mainly receives fecal  
410 contamination inputs of urban origin (treated sewage from the surrounding towns) (Wu et  
411 al. 2011). All indicators tested in this study confirmed that the main source of fecal  
412 pollution in the Llobregat River was human. Firstly, the ratio of human-specific  
413 *Bacteroides* phages with respect to somatic coliphages was higher than the ratios of other  
414 host-specific *Bacteroides* phages and somatic coliphages. These ratios have been proposed  
415 as a potential tool for identifying the origin of fecal pollution when multiple sources of  
416 fecal pollution are present in a sample (Muniesa et al. 2012). Secondly, all samples showed

417 a positive PCR amplification of the human-associated indicator *B. adolescentis* (Field and  
418 Samadpour 2007). Thirdly, the human-specific bifidobacterial qPCR was positive in all  
419 samples, but there was no signal for poultry-, pig-, or cattle-specific samples. Some positive  
420 results were observed for the qualitative detection of mitochondrial indicators for cattle and  
421 poultry. These mitochondrial markers could present false positives due to mitochondrial  
422 DNA contamination from non-fecal sources (skin, fur, hair, etc.) or the potential meat  
423 carryover in human feces (Caldwell et al. 2011). Therefore, in moderately diluted samples,  
424 such as those from the Llobregat River, most of the MST indicators studied remain useful.

425

426 In the Ebre Delta irrigation channels, most samples had concentrations of *E. coli* and  
427 enterococci within the values established by European Directive 2006/7/EC on bathing  
428 water quality that permit recreational human bathing (Anonymous 2006). In this situation,  
429 most MST indicators do not perform effectively because the concentration of their targets is  
430 below their limit of detection. For instance, bifidobacterial host-specific qPCR gave  
431 negative results in all samples. Similarly, mitochondrial indicators did not show any  
432 positive results, with the exception of one POMITO detected in the effluent of the sewage  
433 treatment plant. Again, this positive might be due to a cross reaction from the meat content  
434 of the human diet (Anonymous 2006). This detection limitation is common in most  
435 molecular methods when the concentration of *E. coli* in water is below  $10^3$  CFU/100 ml  
436 (Jofre and Blanch 2010). Furthermore, ADO was detected in 13 out of the 32 samples. All  
437 of these positive samples were collected in sites S2, S3, S4, S5, S7 and S8 (Figure 1) with a  
438 potential contribution from human fecal sources (effluent of sewage treatment plant or  
439 homes located nearby). The sensitivity of ADO determined in previous studies (Bonjoch et  
440 al. 2004) could explain the positive results even at this low level of fecal pollution.

441 Moreover, DEN was positive in only one sample together with ADO. The combination of  
442 ADO and DEN has been reported as strongly human specific, although some ADO false  
443 negatives have also been found (Blanch et al. 2006). In terms of the host-specific  
444 *Bacteroides* phages, the concentrations were very low (if detectable) in all samples, which  
445 is consistent with the low level of somatic coliphages enumerated.

446

447 In general, the Ebre Delta scenario is a good example of cases where the dilution and/or  
448 aging of the fecal pollution in water makes it difficult to determine the fecal source based  
449 on only one MST indicator, since many host-specific MST indicators do not provide any  
450 useful information to form a conclusion. In these circumstances, a combination of different  
451 indicators is essential for determining the source of fecal pollution and therefore machine  
452 learning methods can play a major role (Belanche-Muñoz and Blanch 2008).

453

454 In this study, prediction models based on machine learning methods (through the software  
455 Ichnaea), using results obtained from samples of known fecal source as training data,  
456 allowed us to confirm with a high degree of accuracy the origin of the fecal pollution in the  
457 Llobregat River as mainly human. Applying this approach to the Ebre Delta samples  
458 indicated that poultry and human were the main fecal contributors in most sites. These  
459 results were consistent with the presence of a sewage treatment plant and a poultry farm  
460 nearby. The predictive models were developed using either quantitative or qualitative  
461 indicators or a combination of both. CW18, PG76, GA17, SOMCPH/GA17 ratio,  
462 BOMITO, ADO and CKMITO were the indicators selected as the best predictive models at  
463 low fecal concentrations and aged pollution. As the level of dilution and aging increased,  
464 some indicators such as DEN- and qPCR- based parameters started losing importance

465 because of their low concentration and/or low environmental persistence, while others  
466 became more significant due to their increased environmental persistence.

467

## 468 **6. CONCLUSION**

469 The concentration of MST indicators at point source, their die-off in the environment and  
470 the detection limits of their enumeration methodology are key factors in their feasibility and  
471 reliability in MST cases. Most culture-dependent or molecular MST indicators proposed  
472 over recent years present major limitations in waters with low levels of fecal pollution  
473 (below 3 log<sub>10</sub> CFU *E. coli*/100 ml). Instead, the software Ichnaea performed effectively  
474 under these conditions by combining several MST indicators, indicating those that became  
475 more significant and could be applied for MST in a given scenario, particularly those with  
476 diluted contamination or aged pollution. Therefore, inductive machine learning methods are  
477 a promising tool in MST studies and may represent a leap forward in solving the MST  
478 problem.

479

## 480 **AKNOWLEDGEMENTS**

481 This work was supported by the Spanish government, under research project number  
482 CGL2011-25401, and the research programs of the Catalan Biotechnology Reference  
483 Network (XRB) and the Commission for Universities and Research of the Catalan Ministry  
484 of Innovation, Universities and Enterprise (DIUE), under grant reference 2009SGR1043.  
485 M. Gómez-Doñate is a recipient of an FI grant from the government of Catalonia under  
486 reference 2009SGR1043. The authors thank the slaughterhouses for providing the samples  
487 used in this study.

488

489 **REFERENCES**

- 490 1. **American Public Health Association.** 1998. Standard Methods for the Examination  
491 of Water and Wastewater. 1220: Washington DC.
- 492 2. **Anonymous.** 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the  
493 Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and  
494 repealing Directive 76/160/EEC. **64**:37-51.
- 495 3. **Ballesté E, Blanch AR.** 2010. Persistence of *Bacteroides* species populations in a  
496 river as measured by molecular and culture techniques. Appl. Environ. Microbiol.  
497 **76**:7608-7616.
- 498 4. **Belanche-Muñoz L, Blanch AR.** 2008. Machine learning methods for microbial  
499 source tracking. Environ. Modell. Soft. **23**:741-750.
- 500 5. **Blanch AR, Belanche-Munoz L, Bonjoch X, Ebdon J, Gantzer C, Lucena F,**  
501 **Ottoson J, Kourtis C, Iversen A, Kühn I, Moce L, Muniesa M, Schwartzbrod J,**  
502 **Skraber S, Papageorgiou GT, Taylor H, Wallis J, Jofre J.** 2006. Integrated analysis  
503 of established and novel microbial and chemical methods for microbial source  
504 tracking. Appl. Environ. Microbiol. **72**:5915-5926.
- 505 6. **Bonjoch X, Garcia-Aljaro C, Blanch AR.** 2011. Persistence and diversity of faecal  
506 coliform and enterococci populations in faecally polluted waters. Journal of Applied  
507 Microbiology **111**:209-215.
- 508 7. **Bonjoch X, Lucena F, Blanch AR.** 2009. The persistence of bifidobacteria  
509 populations in a river measured by molecular and culture techniques. J. Appl.  
510 Microbiol. **107**:1178-1185.

- 511 8. **Bonjoch X, Balleste E, Blanch AR.** 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-  
512 targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. Appl.  
513 Environ. Microbiol. **70**:3171-3175.
- 514 9. **Brion GM, Lingireddy S.** 2003. Artificial neural network modelling: a summary of  
515 successful applications relative to microbial water quality. Water Sci. Technol. **47**:235-  
516 240.
- 517 10. **Caldwell JM, Payment P, Villemur R.** 2011. Mitochondrial DNA as source tracking  
518 markers of fecal contamination, p. 642. In Hagedorn C, Blanch A.R, Harwood V.J.  
519 (eds.), Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies, 1st ed.  
520 Springer Science, New York.
- 521 11. **Caldwell JM, Levine JF.** 2009. Domestic wastewater influent profiling using  
522 mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. J. Microbiol.  
523 Methods. **77**:17-22.
- 524 12. **Caldwell JM, Raley ME, Levine JF.** 2007. Mitochondrial multiplex real-time PCR as  
525 a source tracking method in fecal-contaminated effluents. Environ. Sci. Technol.  
526 **41**:3277-3283.
- 527 13. **Duda RO, Hart PE, Stork L.** 2001. Pattern classification. John Wiley and Sons, Inc,  
528 New York.
- 529 14. **Durán AE, Muniesa M, Méndez X, Valero F, Lucena F, Jofre J.** 2002. Removal  
530 and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. J. Appl. Microbiol.  
531 **92**:338-347.
- 532 15. **Ebdon J, Muniesa M, Taylor H.** 2007. The application of a recently isolated strain of  
533 *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate  
534 river catchment. Water Res. **41**:3683-3690.

- 535 16. **Ebdon JE, Taylor HD.** 2006. Geographical stability of enterococcal antibiotic  
536 resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources.  
537 Environ. Sci. Technol. **40**:5327-5332.
- 538 17. **Field KG, Samadpour M.** 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and  
539 managing water quality. Water Res. **41**:3517-3538.
- 540 18. **Field KG, Chern EC, Dick LK, Fuhrman J, Griffith J, Holden PA, LaMontagne**  
541 **MG, Le J, Olson B, Simonich MT.** 2003. A comparative study of culture-  
542 independent, library-independent genotypic methods of fecal source tracking. J. Water.  
543 Health. **1**:181-194.
- 544 19. **Figueras MJ, Inza I, Polo F, Guarro J.** 1998. Evaluation of the oxolinic acid-esculin-  
545 azide medium for the isolation and enumeration of faecal streptococci in a routine  
546 monitoring programme for bathing waters. Can. J. Microbiol. **44**:998-1002.
- 547 20. **Geisser S.** 1975. The Predictive Sample Reuse Method with Applications. J. Am.  
548 Statist. Assoc. **70**:320-328.
- 549 21. **Gómez-Doñate M, Ballesté E, Muniesa M, Blanch AR.** 2012. New molecular  
550 quantitative PCR assay for detection of host-specific *Bifidobacteriaceae* suitable for  
551 Microbial Source Tracking. Appl. Environ. Microbiol. **78**:5788-5795.
- 552 22. **Gómez-Doñate M, Payán A, Cortés I, Blanch AR, Lucena F, Jofre J, Muniesa M.**  
553 2011. Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for  
554 tracking sources of animal faecal pollution in water. Environ. Microbiol. **13**:1622-  
555 1631.
- 556 23. **Gourmelon M, Caprais MP, Ségura R, Le Mennec C, Lozach S, Piriou JY, Rincé**  
557 **A.** 2007. Evaluation of two library-independent Microbial Source Tracking methods to



- 558 identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.*  
559 **73**:4857-4866.
- 560 24. **Griffith JF, Weisberg SB, McGee CD.** 2003. Evaluation of microbial source tracking  
561 methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *J. Water. Health.* **1**:141-  
562 151.
- 563 25. **Hagedorn C, Blanch AR, Harwood VJ.** 2011. *Microbial Source Tracking: Methods,*  
564 *Applications and Case Studies.* Springer Science, New York.
- 565 26. **Harwood VJ, Wiggins B, Hagedorn C, Ellender RD, Gooch J, Kern J, Samadpour**  
566 **M, Chapman AC, Robinson BJ, Thompson BC.** 2003. Phenotypic library-based  
567 microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study. *J.*  
568 *Water. Health.* **1**:153-166.
- 569 27. **International Organization for Standardization.** 2001. Water quality. Detection and  
570 enumeration of bacteriophages. Part 4. Enumeration of bacteriophages infecting  
571 *Bacteroides fragilis.* ISO 10705-4. Geneva, Switzerland.
- 572 28. **International Organization for Standardization.** 2000. Water quality. Detection and  
573 enumeration of bacteriophages. Part 2. Enumeration of somatic coliphages. ISO 10705-  
574 2. Geneva, Switzerland.
- 575 29. **International Organization for Standardization.** 1994. ISO 5667/3:1994 - Guidance  
576 on the Preservation and Handling of Samples. ISO. Geneva, Switzerland.
- 577 30. **Iyengar V, Albaugh GP, Lohani A, Nair PP.** 1991. Human stools as a source of  
578 viable colonic epithelial cells. *FASEB J.* **5**:2856-2859.
- 579 31. **Jofre J, Blanch AR.** 2010. Feasibility of methods based on nucleic acid amplification  
580 techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *J.*  
581 *Appl. Microbiol.* **109**:1853-1867.

- 582 32. **Kortbaoui R, Locas A, Imbeau M, Payment P, Villemur R.** 2009. Universal  
583 mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking  
584 method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface  
585 water. *Water Res.* **43**:2002-2010.
- 586 33. **Lasobras J, Muniesa M, Frias J, Lucena F, and Jofre J.** 1997. Relationship between  
587 the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. *Water Sci.*  
588 *Technol.* **35**:11-12.
- 589 34. **Lucena F, Bosch A, Ripoll J, Jofre J.** 1988. Fecal pollution in Llobregat river:  
590 Interrelationships of viral, bacterial, and physico-chemical parameters. *Water Air Soil*  
591 *Poll.* **39**:15-25.
- 592 35. **Lynch PA, Gilpin BJ, Sinton LW, Savill MG.** 2002. The detection of  
593 *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal  
594 pollution. *J. Appl. Microbiol.* **92**:526-533.
- 595 36. **Manero A, Blanch AR.** 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical  
596 key. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4425-4430.
- 597 37. **Martellini A, Payment P, Villemur R.** 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA  
598 to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated  
599 surface water. *Water Res.* **39**:541-548.
- 600 38. **Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H.** 1999. Distribution of  
601 bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-  
602 targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4506-4512.
- 603 39. **Moore DF, Harwood VJ, Ferguson DM, Lukasik J, Hannah P, Getrich M,**  
604 **Brownell M.** 2005. Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for

- 605 identification of faecal pollution sources in an urban watershed. *J. Appl. Microbiol.*  
606 **99**:618-628.
- 607 40. **Muniesa M, Lucena F, Blanch AR, Payán A, Jofre J.** 2012. Use of abundance ratios  
608 of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for  
609 microbial source identification. *Water Res.* **46**:6410-6418.
- 610 41. **Muniesa M, Lucena F, Jofre J.** 1999. Study of the potential relationship between the  
611 morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment.  
612 *Journal of Applied Microbiology* **87**:402-409.
- 613 42. **Myoda SP, Carson CA, Fuhrmann JJ, Hahm BK, Hartel PG, Yampara-Lquise H,**  
614 **Johnson L, Kuntz RL, Nakatsu CH, Sadowsky MJ, Samadpour M.** 2003.  
615 Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host  
616 origin database. *J. Water. Health.* **1**:167-180.
- 617 43. **Nebra Y, Bonjoch X, Blanch AR.** 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as an  
618 indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2651-  
619 2656.
- 620 44. **Noble RT, Allen SM, Blackwood AD, Chu W, Jiang SC, Lovelace GL, Sobsey**  
621 **MD, Stewart JR, Wait DA.** 2003. Use of viral pathogens and indicators to  
622 differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source  
623 tracking comparison study. *J. Water. Health.* **1**:195-207.
- 624 45. **Payan A, Ebdon J, Taylor H, Gantzer C, Ottoson J, Papageorgiou GT, Blanch**  
625 **AR, Lucena F, Jofre J, Muniesa M.** 2005. Method for isolation of *Bacteroides*  
626 bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water.  
627 *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:5659-5662.

- 628 46. **Puig A, Queralt N, Jofre J, Araujo R.** 1999. Diversity of *Bacteroides fragilis* strains  
629 in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally  
630 polluted wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1772-1776.
- 631 47. **Ritter L, Solomon K, Sibley P, Hall K, Keen P, Mattu G, Linton B.** 2002. Sources,  
632 pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a  
633 perspective prepared for the Walkerton inquiry. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **65**:1-  
634 142.
- 635 48. **Rubiano ME, Agullo-Barcelo M, Casas-Mangas R, Jofre J, Lucena F.** 2012.  
636 Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on a Mediterranean river  
637 (Llobregat, NE Spain): pathogens and indicators. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*  
638 **19**:1026-1032.
- 639 49. **Samadpour M, Roberts MC, Kitts C, Mulugeta W, Alfi D.** 2005. The use of  
640 ribotyping and antibiotic resistance patterns for identification of host sources of  
641 *Escherichia coli* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**:63-68.
- 642 50. **Sánchez D, Belanche LA, Blanch AR.** 2011. A software system for the microbial  
643 source tracking problem. *JMLR Workshop and Conference Proceedings: 2nd*  
644 *Workshop on Applications of Pattern Analysis.* **17**:56-62.
- 645 51. **Santo Domingo JW, Bambic DG, Edge TA, Wuertz S.** 2007. Quo vadis source  
646 tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal  
647 pollution. *Water Res.* **41**:3539-3552.
- 648 52. **Savichtcheva O, Okabe S.** 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations  
649 with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen  
650 monitoring and future application perspectives. *Water Res.* **40**:2463-2476.

- 651 53. **Schill WB, Mathes MV.** 2008. Real-time PCR detection and quantification of nine  
652 potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b  
653 targets. *Environ. Sci. Technol.* **42**:5229-5234.
- 654 54. **Simpson JM, Santo Domingo JW, Reasoner DJ.** 2002. Microbial Source Tracking:  
655 State of the Science. *Environ. Sci. Technol.* **36**:5279-5288.
- 656 55. **Sinton LW, Finlay RK, Hannah DJ.** 1998. Distinguishing human from animal faecal  
657 contamination in water: A review. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* **32**:323-348.
- 658 56. **Stoeckel DM, Mathes MV, Hyer KE, Hagedorn C, Kator H, Lukasik J, O'Brien**  
659 **TL, Fenger TW, Samadpour M, Strickler KM, Wiggins BA.** 2004. Comparison of  
660 seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*.  
661 *Environ. Sci. Technol.* **38**:6109-6117.
- 662 57. **Vijayavel K, Fujioka R, Ebdon J, Taylor H.** 2010. Isolation and characterization of  
663 *Bacteroides* host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. *Water*  
664 *Res.* **44**:3714-3724.
- 665 58. **Wu J, Long S, Das D, and Dorner S.** 2011. Are microbial indicators and pathogens  
666 correlated? A statistical analysis of 40 years or research. *J. Water Health* **9**:265-278.  
667



### 3.4. Uso de la DGGE para el diseño de qPCRs de *Bacteroides* específicas de huésped





**Análisis del patrón de bandas del ADNr 16S de *Bacteroides* obtenido por DGGE de organismos huéspedes y desarrollo de una nueva qPCR de *Bacteroides* específica de huésped.**

Marta Gómez-Doñate, Arnau Casanovas-Massana<sup>▲</sup>, Maite Muniesa y Anicet R. Blanch.

Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona, Avenida Diagonal 643, 08028, Barcelona, España.

<sup>▲</sup>Dirección actual: Department of Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public Health, Yale University, New Haven, Connecticut, USA.

### **Introducción**

En los estudios anteriores se consiguió desarrollar un conjunto de qPCRs de *Bifidobacterium* específicas de huésped (Gómez-Doñate y col. 2012) a partir de las secuencias de las bandas de DGGE más significativas de cada origen fecal (humano, aviar, porcino y bovino) previamente determinadas (Ballesté y Blanch 2011). En esta ocasión, se quiso desarrollar un nuevo conjunto de qPCRs de *Bacteroides* específicas de huésped a partir de un nuevo estudio de patrones de bandas de DGGE del ADNr 16S de *Bacteroides* específicos de cada origen fecal, tal y como se consiguió con *Bifidobacterium*. De este modo se lograría disponer de tres nuevas metodologías testadas y complementarias (bacteriófagos de *Bacteroides*, qPCR de *Bifidobacterium* específicas de huésped y qPCR de *Bacteroides* específicas de huésped) para estudios de MST, lo cual proporcionaría un alto grado de robustez a los resultados obtenidos, ya que como otros autores han defendido (Belanche-Muñoz y Blanch 2007; Blanch y col. 2006), es importante combinar diversos indicadores para obtener resultados que permitan una buena discriminación del origen de la contaminación fecal.

La microbiota del tracto gastrointestinal de los humanos y otras especies animales está compuesta por más de 500 especies (Mai y Morris 2004), de las cuales entre un 80 y un 90% pertenecen a los filos de *Firmicutes* y *Bacteroidales* (Eckburg y col. 2005; Ley y col. 2008; Wei y col. 2013; Ziemer 2013). Las bacterias del género *Bacteroides* son relativamente abundantes en la microbiota. La microbiota gastrointestinal ha

### **3.4. Uso de la DGGE para el diseño de qPCRs de *Bacteroides* específicas de huésped**

---

coevolucionado con su organismo huésped (Bäckhed y col. 2005), lo cual comporta que haya bacterias que son específicas de cada organismo, lo que facilitaría su trazabilidad.

La contaminación fecal de las aguas y la transmisión de patógenos por la ruta fecal-oral comportan un aporte significativo en el aumento de enfermedades a nivel mundial (WHO 2008), lo cual lo convierte en un grave problema de salud pública. La disposición de indicadores que permitan determinar el organismo del cual se origina la contaminación fecal proporcionaría una gran ayuda en la identificación de la fuente contaminante, y por lo tanto en la eficacia de su remediación, la mejoría de la calidad microbiológica del agua y la determinación de las responsabilidades legales (Blanch y col. 2004; Hagedorn y col. 2003; Jagals y Grabow 1996).

Existen muchos indicadores de contaminación fecal, tanto químicos como microbiológicos (Blanch y col. 2006; Scott y col. 2002). Si nos centramos en los microbiológicos, muchos de los indicadores tradicionales (coliformes fecales, *Escherichia coli*, o enterococos) no son capaces de determinar el origen de la contaminación. Por ello es necesario el desarrollo y el estudio de indicadores alternativos capaces de discriminar el origen contaminante. Como hemos visto anteriormente, las bacterias del género *Bacteroides* son buenas candidatas, y por ello se han propuesto como indicadoras de la contaminación fecal en aguas en estudios de MST (Fiksdal y col. 1985; USEPA 2005a).

Las bacterias del género *Bacteroides* son bacilos Gram-negativos y anaerobios estrictos. Estas características impiden que se multipliquen en el medio ambiente, pero a su vez, comportan una baja viabilidad, hasta 6 días (Avelar y col. 1998; Ballesté y Blanch 2010). La detección de viables implica un aporte fecal reciente, pero para la detección de un aporte antiguo se necesita un marcador que persista fuera de un ambiente entérico, como es el caso del ADN, en concreto el ADNr 16S (Kreader 1995).

En este trabajo se analizaron los patrones de bandas del ADNr 16S de las DGGEs de cada origen, humano y animal, con la intención de seleccionar las bandas específicas para cada origen y así poder desarrollar un nuevo conjunto de qPCR de *Bacteroides* específicas de huésped. Estos ensayos de qPCR se evaluaron sobre muestras conteniendo contaminación fecal de origen conocido.

#### Objetivos

- Obtener mediante la metodología DGGE los perfiles de bandas mayoritarias y únicas del ADNr 16S para cada origen de contaminación fecal (humano, bovino, porcino y aviar).
- Diseñar un juego de cebadores comunes y sondas específicas de huésped (humano, bovino, porcino y aviar) para PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) a partir de la información obtenida de las bandas de DGGE específicas de huésped seleccionadas.
- Aplicar esta nueva qPCR para la detección y cuantificación de las cepas de *Bacteroides* específicas de huésped en muestras de agua con contaminación fecal de origen conocido.

#### Resultados

El análisis de los patrones de bandas de las DGGE indicó que tanto en el caso de los humanos como en el de las aves de corral existía muy poca diversidad de bandas y que el patrón prácticamente se mantenía constante, mientras que en el caso de las muestras analizadas de cerdos y vacas existían muchas bandas y que los perfiles eran más heterogéneos. Finalmente se seleccionaron las bandas mayoritarias y significativas para cada origen, se purificó el ADN y se secuenció (ver Figura 1). Las secuencias obtenidas y analizadas por el BLAST que procedían del mismo origen se seleccionaron para el desarrollo de las nuevas qPCRs.

Las secuencias de las bandas seleccionadas se alinearon y se diseñó un conjunto de cebadores comunes y cuatro sondas específicas, una para cada origen (humano, aviar, porcino y bovino) (ver Figura 2).

A partir de las purificaciones de las bandas, se clonaron los fragmentos del ARNr 16S en plásmidos pGEM-T-Easy, los cuales se utilizaron posteriormente para la elaboración de las rectas patrón de cada una de las qPCRs específicas de huésped (ver Figura 3). Las rectas patrón resultantes resultaron ser repetibles, con una pendiente cercana a -3,3, una desviación estándar entre 0,023 y 0,079 y con una eficiencia de la amplificación entre el 93 y el 101,8%. Los límites de detección de cada una de ellas en copias genómicas (CG) por ml fueron:  $1,89 \times 10^4$  CG/ml para humano,  $1,48 \times 10^4$  CG/ml

### **3.4. Uso de la DGGE para el diseño de qPCRs de *Bacteroides* específicas de huésped**

---

para ave,  $8,61 \times 10^3$  CG/ml para cerdo,  $2,71 \times 10^4$  CG/ml para vaca, y  $2,43 \times 10^4$  CG/ml para la sonda común.

Para comprobar la especificidad y la eficacia de las qPCRs de *Bacteroides*, cada una de ellas fue testada con muestras de elevada carga fecal y de origen conocido, el mismo que su organismo huésped y de los otros tres orígenes (ver Tabla 2). Se obtuvieron resultados de acuerdo con los orígenes para las qPCRs de humano, aviar y porcino. Estas tres identificaron correctamente las muestras de su mismo origen mientras que no se produjo amplificación con las muestras de distinta fuente. En cuanto a la qPCR específica de bovino se observó que se produjeron reacciones cruzadas y que no resultaba ser una buena herramienta para los estudios de MST, por lo que se descartó para posteriores estudios. En algunas de las muestras de ave y cerdo no se produjo amplificación (datos no mostrados) y se discute las posibles razones para estos resultados negativos. En la qPCR con la sonda común en todos los casos se produjo amplificación. En comparación con las sondas específicas de huésped, el nivel de detección con la sonda común es igual o mayor.

## **Discusión**

Las bacterias que pertenecen al género *Bacteroides* cumplen muchos de los requisitos para ser buenos indicadores de la contaminación fecal: son bacterias que pertenecen a la microbiota gastrointestinal del organismo causante del aporte fecal, se excretan en las heces y al ser anaerobias estrictas no se multiplican en el medio ambiente (Hurst y col. 2007). Por ello fueron propuestas como microorganismos indicadores con anterioridad (Fiksdal y col. 1985; USEPA 2005a). Además se ha descrito que existen especies específicas de huésped (Kreader 1995), por lo que es posible discriminar el origen de la contaminación. Dada su baja viabilidad en el medio ambiente (Avelar y col. 1998) es preferible determinar la presencia de dianas moleculares, como es el caso del ADNr 16S, que persiste más tiempo que las bacterias cultivables (Kreader 1995).

En este estudio, una PCR del ADNr 16S seguida de un análisis por DGGE permitió el estudio de las poblaciones de *Bacteroides* en los cuatro organismos, y comprobar así los patrones de bandas de las cepas predominantes (Muyzer y Smalla 1998). Cada fragmento de ADN presenta un punto de desnaturalización característico que viene determinado por su secuencia, y este ADN migra a una altura determinada de la

### 3.4. Uso de la DGGE para el diseño de qPCRs de *Bacteroides* específicas de huésped

electroforesis, observándose una banda (Muyzer y Smalla 1998). A pesar de ello, es posible que dos fragmentos de ADN con secuencias diferentes tengan un punto de desnaturalización igual o muy similar (Ballesté and Blanch 2011), cosa que sucede con algunas de las bandas seleccionadas para cerdo y vaca que se han obtenido en este estudio (ver Figura 1).

Las qPCRs específicas de humano, ave y cerdo identificaron correctamente las muestras de su propio origen y no se produjeron reacciones cruzadas. Sin embargo, los análisis por qPCR de las muestras de elevada carga fecal y origen conocido permitieron comprobar que la qPCR específica de bovino no funcionaba correctamente ya que se produjo resultados positivos en todas las muestras, independientemente de su origen. Se considera que en la microbiota intestinal bovina el género *Prevotella* y no el género *Bacteroides* podría ser el mayoritario. De este modo la especificidad de las bandas no permite discernir este origen. Se descartó el uso de esta variante de la qPCR hasta realizar ensayos futuros.

En un pequeño porcentaje de muestras (dos muestras de cerdo y dos de aviar), el análisis con la qPCR específica de su propio origen fecal mostraron resultados negativos (datos no mostrados). Sin embargo diversos factores pueden considerarse responsables de este hecho. En primer lugar, en el caso de las aves, esto puede deberse a que el matadero donde se recogieron las muestras sacrifican varias especies animales a lo largo del año, fundamentalmente gallinas y pavos, pero también otros tipos de ave, lo que comporta una distinta composición de la microbiota gastrointestinal de las muestras, y podría ser que la especificidad de nuestro marcador no permita detectar estas diferentes composiciones de microbiota intestinal.

En el caso de muestras de cerdo, se observó que los perfiles de bandas de las DGGE resultaron ser bastante heterogéneos. En algunas muestras no se observaban siempre todas las bandas. Se seleccionó la banda mayoritaria que se encontraba exclusivamente en aislamientos de cerdo. Sin embargo es posible, dada esta variabilidad, que en algunos casos no se produzca detección positiva en algunas muestras, plausiblemente por no encontrarse la variante de *Bacteroides* de la que se aisló la banda.

En cuanto a los resultados obtenidos con la qPCR de la sonda común del género *Bacteroides*, el nivel de detección es mayor o igual a los que se producen con las sondas específicas de huésped. Esto se debe a que no detecta únicamente la cepa mayoritaria

### **3.4. Uso de la DGGE para el diseño de qPCRs de *Bacteroides* específicas de huésped**

---

de cada origen, sino que detecta todas las cepas de *Bacteroides* que conforman la microbiota gastrointestinal del organismo huésped.

El alto grado de sensibilidad y especificidad demostrado en este nuevo conjunto de qPCRs específicas de huésped (ave de corral, humano y porcino) la convierten en una herramienta útil para estudios de MST en muestras de elevada carga fecal, y por sus límites de detección seguramente también en muestras con una carga fecal más diluida. Sin embargo, sería necesario realizar más ensayos con mayor número de muestras para poder afinar más la sensibilidad en todas las muestras y poder además incluir un ensayo para muestra con contaminación de vaca. La idea es incluir este nuevo método, junto con los microorganismos indicadores tradicionales, como parámetros en los estudios de desarrollo de modelos predictivos de MST tal y como se realizó con las qPCR de *Bifidobacterium* específicas de huésped en el capítulo 3 (Belanche-Muñoz y Blanch 2008).

#### **Informe del factor de impacto**

Artículo en elaboración.

#### **Informe de coautoría**

La doctoranda llevó a cabo la mayor parte del trabajo experimental, como analizar las muestras por la técnica de DGGE, escoger las bandas significativas, purificar el ADN, clonarlo, diseñar los sets de cebadores y sondas, recogida de muestras y análisis por qPCR. Además participó activamente en la redacción del artículo y la elaboración de las tablas y figuras.

Dr. Anicet R. Blanch

Dra. M<sup>a</sup> Teresa Muniesa

1

2 **Study of *Bacteroides* 16S rRNA gene DGGE pattern-band to develop a new**  
3 **molecular real time qPCR for the detection of host-specific *Bacteroides* suitable**  
4 **for microbial source tracking**

5

6

7 **Marta Gómez-Doñate, Arnau Casanovas-Massana<sup>▲</sup>, Maite Muniesa and Anicet R.**

8 **Blanch\***

9 Department of Microbiology. University of Barcelona. Diagonal 643. Annex. Floor 0.

10 08028 - Barcelona. Spain

11

12

13

14

15 **Running head:** Bacteroidal host-specific and quantitative molecular targets in MST

16 **Key words:** *Bacteroides*, Microbial Source Tracking, DGGE, quantitative PCR.

17

18 \*Corresponding author:

19 Tel: (+34) 934029012

20 Fax: (+34) 934039047

21 E-mail: [ablanch@ub.edu](mailto:ablanch@ub.edu)

22

23 <sup>▲</sup>Present address: Department of Epidemiology of Microbial Diseases, School of Public

24 Health, Yale University, New Haven, Connecticut, USA

25 **ABSTRACT**

26

27 *Bacteroides* spp. has been suggested as an important indicator of fecal contamination  
28 in Microbial Source Tracking (MST) methodologies, because they belong to the  
29 commensal microbiota of warm-blood animals and because some species have shown  
30 to be host-specific. The aim of this study is to develop a new bacteroidal 16S host-  
31 specific qPCR to determine the source of fecal contamination (human, cattle, swine  
32 and poultry) in water. Denaturant gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to  
33 search for host-specific bands on the 16S rDNA of *Bacteroides* associated with a fecal  
34 pollution source. Main PCR-DGGE host-specific bands were selected and sequenced  
35 for later design of four qPCR host-specific assays. A set of common primers to four  
36 different *Bacteroides* spp. host-associated (human, cattle, swine and poultry) hydrolysis  
37 probes and one common *Bacteroides* genus hydrolysis probe were defined. This set of  
38 quantitative-PCR (qPCR) suitable for fecal source tracking was assayed by analysing  
39 20 water samples with fecal pollution from the four studied sources. Despite the  
40 variability among the genus *Bacteroides*, results showed a good performance of the  
41 common *Bacteroides* probe and host-specific qPCR assays except for the bovine and  
42 porcine fecal sources which showed a high diversity

43



## 44 INTRODUCTION

45

46 The gastrointestinal tract of human and other animals is a complex ecosystem that  
47 encompasses more than 500 different species (Mai and Morris 2004). However, these  
48 species belong mainly to two bacterial groups: *Firmicutes* and *Bacteroidetes* and, in  
49 many cases, these groups represent between an 80 and 90% of the warm-blooded  
50 animals' microbiota, including humans (Eckburg et al. 2005; Ley et al. 2008; Wei et al.  
51 2013; Ziemer 2013). It has been reported that fecal microbiota and its animal host have  
52 co-evolved together (Bäckhed et al. 2005), which leads to the concept of the selection  
53 of bacteria that are specific for each host organism.

54

55 Water-borne diseases transmitted by fecal-oral route make a significant contribution to  
56 the burden of diseases worldwide (WHO, 2008), and therefore fecal pollution in water  
57 is considered a global public health concern. In addition to methods that allow  
58 determination of the levels of fecal pollution, it is necessary to develop methods  
59 allowing the determination of the origin of fecal pollution in a particular body of water  
60 (Hagedorn et al. 2003). The tracking of the fecal source will allow the management of  
61 the pollution at its source, which will contribute to improve the microbial quality of  
62 water (Blanch et al. 2004; Jagals and Grabow 1996).

63

64 Several chemical and microbiological methods have been proposed as fecal indicators  
65 to track the source (Blanch et al. 2006; Scott et al. 2002), but, unfortunately, most of  
66 that traditional indicators, such as fecal coliforms, *Escherichia coli*, enterococci and  
67 sulphite-reducing clostridia, are not able to discriminate between human and animal  
68 sources. Therefore alternative fecal indicators have been proposed.

69

70 *Bacteroides* spp, which have a close relationship with the gastrointestinal tract have  
71 been proposed as indicators for fecal pollution in water in MST (Fiksdal et al. 1985;  
Gómez-Doñate et al. 2014

72 USEPA 2005). It has been reported that there are some species of *Bacteroides* which  
73 are high host-specific, so it is possible to discriminate the origin of the source of the  
74 fecal pollution by tracking them (Kreader 1995). *Bacteroides* spp are Gram-negative,  
75 anaerobic bacillus bacteria belonging to the commensal microbiota of warm-blood  
76 animals such as cattle, swine, poultry and human. Cultivable *Bacteroides* are able to  
77 survive only six days under oxygen stress conditions and two or three days in the  
78 summer due to high temperature (Avelar et al. 1998; Ballesté and Blanch 2010),  
79 making difficult its detection by means of cultivable methods, whereas their nucleic  
80 acids can appear as a more persistent target (Kreader 1998).

81

82 The aim of this study was to analyze the 16S rDNA of the populations of *Bacteroides*  
83 from unique and known-fecal pollution sources in water (cattle, swine, poultry and  
84 human) by DGGE to determine host-specific 16S rDNA bands (D'Elia et al. 2007) for  
85 defining potential MST molecular indicators. Host-specific sequences of bands would  
86 be used to develop a set of primers and host-specific hydrolysis probes to be used in  
87 qPCR assays targeting host-specific *Bacteroides* in MST studies.

88

## 89 **MATERIAL AND METHODS**

90

### 91 **Bacterial strains and culture media.**

92 *Bacteriodes coprophilus* DSM 18228<sup>T</sup>, *B. coprosuis* DSM 18011<sup>T</sup>, *B. eggerthii* DSM  
93 20697<sup>T</sup>, *B. fingoldi* DSM 17565<sup>T</sup>, *B. fragilis* DSM 2151<sup>T</sup>, *B. gallinarum* DSM 18171<sup>T</sup>,  
94 *B. intestinalis* DSM 17393<sup>T</sup>, *B. ovatus* DSM 1896<sup>T</sup>, *B. pyogenes* DSM 20611<sup>T</sup>, *B.*  
95 *salanitronis* DSM 18170<sup>T</sup>, *B. suis*, *B. thetaiotaomicron* DSM 2079<sup>T</sup>, *B. uniformis* DSM  
96 6597<sup>T</sup>, *B. vulgatus* DSM 1447<sup>T</sup>, and *Parabacteroides distasonis* DSM 20701<sup>T</sup> were  
97 used as reference strains to establish the optimal DGGE gradient and conditions.

98

99 Type strains were grown using BPRM (Bacteroides Phage Recovery Media) (Tartera et  
100 al. 1992) broth and BPRM agar (Pronadisa, Spain) without antibiotic at 37°C in  
101 anaerobic conditions.

102

### 103 **Specific hosts wastewater samples.**

104 A total of 114 wastewater samples from various sources were collected. 34 samples  
105 were obtained from five urban wastewater treatment plants (WTP) in the area of  
106 Catalonia. Two WTPs were serving a population equivalent of almost 384,000 (28  
107 samples), two between 100,000 and 200,000 (four samples), and one higher than  
108 2,000,000 (2 samples). A total of 25 samples of poultry slurries were collected from two  
109 poultry slaughterhouses receiving weekly 60,000 animals each. A total of 30 samples  
110 of swine slurries were obtained from four pig slaughterhouses (19 samples) receiving  
111 weekly 12,500, 15,000, 15,000, and 5,000 pigs each one, and from one farm of 14,000  
112 pigs (11 samples). Finally, a total of 25 samples of cattle were collected from six  
113 different slaughterhouses receiving weekly between 250 and 2,000 calves (15  
114 samples), and from two farms of 50 cows and 200 calves (10 samples).

115

### 116 **Nucleic acid isolation.**

117 Genomic DNA from reference strains was obtained by centrifuging a 48h culture at  
118 16,000 *xg* for 5 min. The pellet was resuspended and washed twice in Tris-EDTA  
119 buffer (Tris-HCl 10mM, pH=8.0 and EDTA 1mM) and the cells were exposed to 100°C  
120 for 10 min. Finally, the mixture was centrifuged at 16,000 *xg* for 5 min and the  
121 supernatant used for DNA amplification.

122

123 DNA isolation of the wastewater samples was performed by the QIAamp DNA blood  
124 minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions.  
125 The integrity of the genomic DNA extracted was evaluated by agarose gel

126 electrophoresis and ethidium bromide staining. DNA was suspended in a final volume  
127 of 50 µl of elution buffer (EB).

128

### 129 **Primers and PCR amplification.**

130 The 32F and 708R primer pair (Table 1) was used to amplify a fragment encoding the  
131 16S rRNA genes from the DNA extracted from each wastewater sample. Each 25 µl of  
132 PCR mixture contained the following: 12.5 µl 2X DreamTaq Green DNA Polymerase  
133 (Fermentas, Madrid, Spain), 0.5 µl of each primer (30 nm), 2.5 µl of DNA, and 9 µl of  
134 double-distilled nuclease-free H<sub>2</sub>O (Fermentas, Madrid, Spain). PCR amplification was  
135 performed with a GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems, Barcelona, Spain)  
136 at the following conditions initial denaturation step at 94°C for 5 min, 4 cycles  
137 consisting of 94°C for 30 s, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min and 30 s, followed by 31  
138 cycles consisting of 94°C for 30 s, 61°C for 1 min, and 72°C for 1 min and 30 s,  
139 followed by 6 min extension at 72°C. A negative control containing no template was  
140 included in each experiment. An aliquot of 5 µl of each PCR product was analysed by  
141 1.5 % agarose (w/v) gel electrophoresis and the band were visualized via ethidium  
142 bromide staining. The positive samples were re-amplified by a nested PCR using the  
143 pair of primers 32F-GC and 580R (Table 1). PCR mixture was as described above.  
144 Conditions of nested PCR were: an initial denaturation step at 94°C for 5 min, 2 cycles  
145 consisting of 94°C for 30 s, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min and 30 s, followed by 33  
146 cycles consisting of 94°C for 30 s, 63°C for 1 min, and 72°C for 1 min and 30 s,  
147 followed by 6 min extension at 72°C. As above, an aliquot of 5 µl of each PCR product  
148 was analysed by 1.5 % agarose (w/v) gel electrophoresis and the band were visualized  
149 via ethidium bromide staining.

150

### 151 **DGGE analysis of PCR products.**

152 DGGE was performed with a DCode system apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) as  
153 previously described (Ballesté and Blanch 2011). Electrophoresis was performed with 1

154 mm-thick 8% (*w/v*) polyacrylamide gels (30% acrylamide-bisacrylamide [37.5:1])  
155 submerged in 1× Tris-acetate acid-EDTA (TAE) (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1  
156 mM EDTA; pH 7.4) at 60°C. Approximately 800 to 1000 ng of nested-PCR from  
157 environmental samples and 100 ng of nested-PCR from reference strains were applied  
158 to individual lanes in the gel. The following electrophoresis conditions were selected on  
159 the results of perpendicular DGGE and time travel experiments (data not shown): 17h  
160 at 85V and 60°C in a linear 40 to 65% denaturant agent gradient (100% denaturant  
161 agent was defined as 7 M urea and 40% (*v/v*) formamide). The gels were stained for 45  
162 min in 1X sodium chloride-Tris-EDTA buffer (STE) (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM  
163 EDTA; pH 7.4) with SybrGold nucleic acid stain (Molecular Probes Inc., Eugene, OR)  
164 and visualized under UV radiation using a ChemiDoc™ MP Imaging System (BioRad).  
165 Gels were scanned and analysed with Quantity One 4.6.7 program (Bio-Rad). The  
166 main DGGE bands for each fecal source were selected.

167

#### 168 **DNA extraction and sequencing.**

169 Main DGGE bands showing host-specificity were selected and sliced with a sterile  
170 razor blade. They were introduced in the holes of 1.5 % agarose (1*w/v*) gel, sealed with  
171 melted 1.5 % agarose (*w/v*) and analyzed by electrophoresis. The bands were  
172 visualized via ethidium bromide staining. DNA was extracted and purified using the  
173 QIAquick® gel extraction kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The product was  
174 reamplified with the primers 32F and 580R (Table 1) and analyzed again by gel  
175 electrophoresis, from where DNA was extracted and purified as explained above. The  
176 sequencing reaction was performed using a BigDye Terminador cycle-sequencing  
177 ready-reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and adding 5 µl of DNA. The  
178 reaction was performed under the following conditions: 25 cycles of 96°C for 30 s, 50°C  
179 for 5 s, and 60°C for 4 min. The product was purified and analyzed with an automated  
180 DNA sequencer (ABI Prism 3700; Perkin Elmer (service provided by Serveis  
181 Científicotècnics, University of Barcelona).

182

183 The 16S rRNA gene sequences were edited and assembled using version 7.0.1 of  
184 BioEdit program (Hall 1999). BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used  
185 to search for homology of each sequence with *Bacteroides* spp. and, when the  
186 information was available, to look for coincidences with the corresponding fecal source.

187

## 188 **qPCR procedures.**

### 189 **(i) Clone construction.**

190 To generate standards for the qPCR assays, the four host-specific 16S rRNA gene  
191 fragments were cloned in pGEM-T Easy vectors following the manufacturer's  
192 instructions (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). Each construction was  
193 transformed by electroporation (2.5 kV, 25 F capacitance, and 200 V resistance) into *E.*  
194 *coli* DH5 $\alpha$  electrocompetent cells. The ampicillin resistant colonies contain the vector  
195 with the insert, so they were selected and the plasmid was purified using the Qiagen  
196 Plasmid Midi purification kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). NanoDrop ND-1000  
197 spectrophotometer (Thermoscientifics, Wilmington, DE) was used know concentration  
198 and purity of the plasmids containing each band.

199

200 To calculate the number of gene copies (GC) of the stock prepared for each gene, the  
201 following equation was used: [concentration of pGEM-T Easy::*insert* (ng/ $\mu$ l)/molecular  
202 mass (ng/mol)] x  $6.022 \times 10^{23}$  molecules/mol = number of molecules of pGEM-T  
203 Easy::*insert*/ $\mu$ l. Decimal serial dilutions made with double-distilled water of the stock  
204 were done and stored at -20°C until use. They would be the standard for the qPCR.  
205 These stocks were amplified in triplicate in five independent experiments, and the  
206 average of the threshold cycle ( $C_t$ ) results was used to elaborate the standards.

207

### 208 **(ii) Bac-F and Bac-R primer and probe sets.**

209 Primer and probes were selected using the software tool Primer Express 3.0 (Applied  
210 Biosystems). A set of common forward and reverse primers were designed for the four  
211 types of fecal origins and the primers were combined with four hydrolysis probes, one  
212 specific for each fecal source. All primers and 6-carboxyfluorescein (FAM)-labelled  
213 fluorogenic hydrolysis probes were commercially synthesized by Applied Biosystems  
214 (Spain). HMprobeBac, PGprobeBac, PLprobeBac, CWprobeBac and Bacprobe were  
215 MGB probes with a FAM reporter and a non-fluorescent quencher (NFQ). In order to  
216 confirm the specificity of primers and probes with their target genomes, NCBI (National  
217 Center for Biotechnology Information) data entries for *Bacteroides spp* were used.  
218 Their specificity was also tested for cross-reactions by using DNAs isolated from the  
219 other origins.

220

221 The amplification was performed as previously described (Gómez-Doñate et al. 2012).  
222 Briefly, 20- $\mu$ l reaction mixture was performed using TaqMan Environmental Real-Time  
223 PCR Master Mix 2.0 (Applied Biosystems, Spain). The mixture contained 900 nM of  
224 each primer, 250 nM of the corresponding probe, and 7  $\mu$ l of the DNA sample or  
225 quantified plasmid DNA. Thermal-cycler conditions were as follows: an initial setup of 2  
226 min at 50°C, followed by 10 min at 95°C, 40 cycles of 15 s of denaturation at 95°C, and  
227 1 min of annealing/extension at 60°C. Standards, samples, and positive and negative  
228 controls were run in triplicate. The threshold cycle ( $C_t$ ) obtained was defined as the  
229 average of the triplicate data obtained.  $C_t$  data were expressed as the number of GC  
230 according to the values obtained with the standard for each qPCR, as described above.

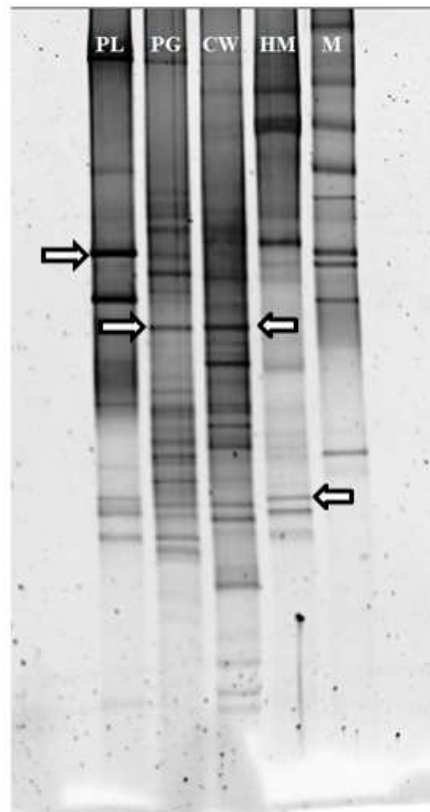
231

## 232 **RESULTS**

### 233 **DGGE analysis of PCR products.**

234 The DGGE profiles varied with the fecal pollution source of the water sample. The  
235 profiles of the human and poultry wastewater samples showed fewer bands than cow  
236 or swine wastewater samples (Figure 1). Cattle and pig wastewater samples showed

237 more heterogeneous profiles. Two or three bands of each specific origin, the ones  
238 which were common for all the samples from the same source and significant and  
239 which were not presented in wastewater samples from other sources, were selected for  
240 further analysis. Selected bands were sequenced and compared with the database  
241 BLAST and NCBI (National Center for Biotechnology Information). Finally only one  
242 band of each fecal origin was selected (Figure 1). The bands selected for each source  
243 were all identified as *Bacteroides* spp, and belonged to the corresponding fecal source.



244  
245 **FIGURE 1.** Separation of the PCR product of 16S rRNA of *Bacteroides* from wastewater  
246 samples with known fecal origin and indication of the main bands selected for each source (PL:  
247 poultry, PG: pig, CW: cattle, and HM: human).

248  
249 **qPCR standards of host-specific *Bacteroides* spp.**

250 An area of the 16S rRNA gene sequence which had a variable zone between two  
251 preservative areas for the four hosts was selected. The forward and reverse primers,  
252 common for the four origins were selected in the preservative areas. The specific



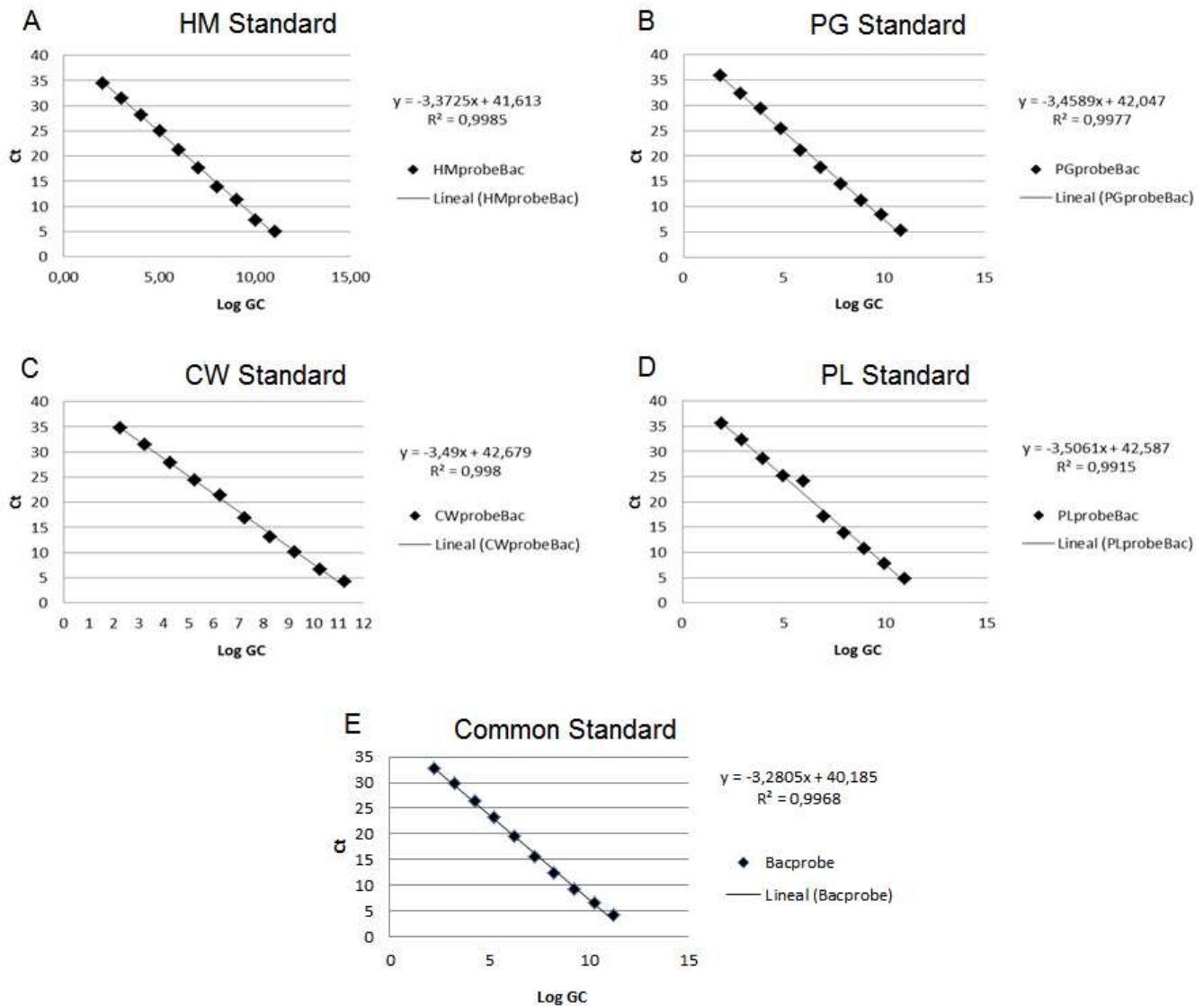
253 probes for each source of fecal pollution (human, cattle, poultry and swine) were  
 254 selected in the variable zone of each respective sequence, and the Bacprobe, the  
 255 common one, in a conservative zone (Figure 2).



256  
 257 **FIGURE 2.** Alignment of the sequences of the 16S rRNA genes from isolated DGGE bands of  
 258 human (HM), pig (PG), cattle (CW) and poultry (PL) wastewater. The locations of the primers  
 259 Bac-FW and Bac-Rev and the set of probes (HMprobeBac, PGprobeBac, CWprobeBac,  
 260 PLprobeBac and Bacprobe) are indicated.

261  
 262 Selection of specific sequence of primers and probes was performed according the  
 263 requirements of the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). Using the five  
 264 qPCR assays, five standard curves were plotted, one for targeting each pollution  
 265 source and the common one, to explore the potential of that new qPCR to discriminate  
 266 the origin of the fecal contamination in the environmental samples (Figure 3). The

267 fragment of 16S rRNA gene amplified from each DGGE band and cloned to generate  
268 the standard curves were of 500 bp for human source, 541 bp for poultry, 478 bp for  
269 pig and 543 bp for cattle source and common one. By using the primers Bac-FW and  
270 Bac-RV, the amplicon size for each fecal source was of 215 bp for human, cattle and  
271 common probe, and 214 bp for poultry and swine. The standard curves were  
272 repeatable, and the averaged slopes of the three replicates of five independent  
273 amplifications were of -3.3725 with a standard deviation (SD) of 0.033 for humans, -  
274 3.5061 (SD, 0.076) for poultry, -3.4589 (SD, 0.079) for swine, -3.4900 (SD, 0.064) for  
275 cattle, and -3.2805 (SD, 0.023) for common. The amplifications efficiencies ( $E$ ) for the  
276 assays were as follows: 97,7% (range, 96.4 to 100.1) for human sewage, 92.9%  
277 (range, 90.1 to 98.9) for poultry wastewater, 94.1% (range, 90.7 to 97.9) for swine  
278 wastewater, 93.3% (range, 90.8 to 96.3) for cattle wastewater, and 101.8% (range,  
279 100.7 to 102.9) for common (*Bacteroides* genus-specific). As the 16S rRNA operon  
280 copy numbers of different *Bacteroides* spp. are not well defined yet (Hong *et al.* 2008),  
281 the quantitative expression of qPCR calculations was based on the genomic copies  
282 (GC). Thus, the calculated limits of detection correspond to  $1.89 \times 10^4$  GC/ml for human  
283 sewage,  $1.48 \times 10^4$  GC/ml for poultry wastewater,  $8.61 \times 10^3$  GC/ml for pigs wastewater,  
284  $2.71 \times 10^4$  GC/ml for cattle wastewater, and  $2.43 \times 10^4$  GC/ml for common (*Bacteroides*  
285 genus-specific).  
286



287

288 **FIGURE 3.** qPCR standard curves and regression lines calculated with the values obtained with  
 289 the pGEM plasmid containing each band. HM: Human; PG: Pig; CW: Cattle; PL: Poultry;  
 290 Common: Common *Bacteroides* spp. probe. The data represented are the averages of  
 291 triplicates in five independent experiments.

292

293 **Application of host-specific qPCR assays to wastewater samples of known**  
294 **origin.**

295 Five wastewater samples from each fecal source were used. These samples were  
296 carefully selected and confirmed to be polluted by a single fecal source. They were  
297 used to test the specificity of the primers and probe sets for a host from each fecal  
298 origin (human, poultry, pig and cattle) and to test the common (*Bacteroides* genus-  
299 specific) probe. Absence of crossed-reactions was also analysed by comparison of the  
300 developed host-specific qPCRs. Traditional indicators (E.coli, somatic coliphages...)  
301 were used as reference for fecal load on the wastewater samples.

302

303 The host-specific probes for human, pig and poultry showed high specificity for their  
304 respective hosts (Table 2) for all except for cattle-specific probe. Since this assay was  
305 not specific, we discarded it from further studies.

306

307 The qPCR assays for human, pig and poultry did not show crossed-reactions with  
308 samples from other fecal sources (Table 2), at least with the samples tested. However,  
309 few samples showed no amplification of fecal origin samples and its specific primers  
310 and probe set (data not shown).

311

312 The common qPCR for *Bacteroides* genus showed amplification in all the samples  
313 tested. The GC/ml detected is equal or greater than its specific probe (Table 2), which  
314 means that not only detects the main strain selected as it occurs with the specific  
315 probe, it also detects other *Bacteroides* strains that are part of host's gastrointestinal  
316 microbiota.

317

318 **DISCUSSION**

319

320 *Bacteroides* spp. fulfils most of the requirements of a fecal indicator: to have a close  
321 relationship with the gastrointestinal tract and, consequently with the fecal contribution,  
322 and they are strict anaerobes, being unable of multiplying in the environment (Hurst et  
323 al. 2007). Therefore, this genus has been proposed as indicators for fecal pollution in  
324 water (Fiksdal et al. 1985; USEPA 2005). Moreover, it has been reported that there are  
325 some species of *Bacteroides* which are high host-specific, and they can be used to  
326 discriminate the origin of the source of the fecal pollution by tracking them (Kreader  
327 1995). As they are not able to survive under oxygen stress conditions (Avelar et al.  
328 1998), their environmental survival is low and this hampers their detection by cultivable  
329 methods. It is advisable to target their 16S rRNA by molecular methods, which could  
330 persist longer in the environment (Ballesté and Blanch 2010; Kreader 1998).

331

332 In this study, 16s rRNA gene amplification with specific primers for *Bacteroides* spp.  
333 genera, followed by DGGE analysis that enables to differentiate the bands with  
334 different sequence belonging to different *Bacteroides* spp. from each fecal origin. It had  
335 to be considered that DGGE sensitivity is able to detect bacteria that constitute up to  
336 1% of the total bacteria community (Muyzer and Smalla 1998), so only the most  
337 predominant strains would be detected. Each bacterial strain has a specific melting  
338 domain across the gel which corresponds with a particular DNA sequence (Muyzer and  
339 Smalla 1998). In some cases, as it happened with pig and cow selected bands (Figure  
340 1), different DNA sequences have the same melting domains, (Ballesté and Blanch  
341 2011). Using this technique it was possible to observe that human and poultry showed  
342 low diversity of the 16srDNA bands within their populations belonging to the  
343 *Bacteroides* genus compared with pig and cattle samples. A main band for each fecal  
344 origin was selected. This selection, however, was done on the basis of the most  
345 abundant and significant band among the analyzed samples. There is a delicate  
346 equilibrium between the required specificity and the need of coverage of most  
347 *Bacteroides* within the same fecal source. The problem of those samples showing

348 negative results within its own source could be due to the presence of a majority  
349 *Bacteroides* spp. population with a 16S rDNA with a different sequence than the one  
350 selected. The analysis of more samples will be advisable to evaluate the extent of the  
351 false negative results. For example, in poultry samples the abattoirs were the samples  
352 were collected sacrifice different animals' species. Since each organism has a specific  
353 microbiota which has co-evolved with it, so it is possible that if the target is hens, there  
354 would be no signal in a turkey sample. This could mean that it is possible that not every  
355 band could be found in all samples, so to be not detected.

356

357 On the other hand, the lack of specificity observed in the assay intended to be specific  
358 for cattle could be attributable to the contrary effect. That band was not really specific  
359 for cattle, but also present (albeit in minimal proportions, hence not visible by DGGE) in  
360 the other sources. This problem could be overcome by analyzing more DGGE. This  
361 was already attempted for cattle assay with unsuccessful results (data not shown).

362

363 As far as common *Bacteroides* genus probe is concerned, it showed detection in all the  
364 fecal samples, and it was equal or superior to the specific probe test. This happens  
365 because it not only detects a specific strain for each fecal origin as specific probes do,  
366 it detects all the *Bacteroides* strains that belong to host's gastrointestinal tract.

367

368 Although qPCR molecular targets show moderate sensitivity (Jofre and Blanch 2010),  
369 these MST molecular indicators could be useful for the development of predictive  
370 models as previously reported (Ballesté and Blanch 2010; Sánchez et al. 2011). The  
371 qPCR procedures with the common primers and specific-host probes sets for human,  
372 poultry and swine were rapid, straightforward and accurate.

373

374 The results show that the amplification of the 16S rRNA gene fragment between the  
375 primers Bac-FW and Bac-Rev and the use of specific probes allowed discrimination

376 between three sources of fecal pollution (human, poultry and porcine) in high polluted  
377 wastewater. The degrees of sensitivity of these qPCRs lead to think that they could be  
378 used for MST analyses in environments presenting diluted or aged fecal pollution.

379 In summary, the DGGE analysis of known-origin fecal samples will allow to select a  
380 specific band for each fecal source and then to develop a host-specific qPCR for  
381 human, poultry and porcine fecal sources. This molecular tool enhances us to detect  
382 moderately aged pollution, which otherwise would not be possible for *Bacteroides* spp.  
383 with culture-dependent methods (Avelar et al. 1998). The development of new  
384 molecular targets could be used together with traditional microbial indicators of water  
385 quality when developing MST predictive models (Belanche-Muñoz y Blanch 2008).

386

387 This methodology is still being tested and it is necessary to analyze more samples, but  
388 that samples belong to a European project which is still being carried out.

389

## 390 **ACKNOWLEDGEMENTS**

391

392 This work was supported by the Spanish Government, research project CGL2011-  
393 25401, and the research programs of the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB)  
394 and of the Comissionat per a Universitats i Recerca del DIUE, Government of  
395 Catalonia, no. 2009SGR1043. M.G.-D. is the recipient of grant FI from the Government  
396 of Catalonia, no. 2009SGR1043.

397

## 398 **REFERENCES**

399

- 400 1. **Avelar, K.E.S., S.R. Moraes, L.J.F. Pinto, W. das G.S. Souza, R.M.C.P.**  
401 **Domingues, and M.C. de S. Ferreira.** 1998. Influence of stress conditions on  
402 *Bacteroides fragilis* survival and protein profiles. Zentralbl. Bakteriologie. **287**:399-  
403 409.

- 404 2. **Bäckhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson, and J.I. Gordon.**  
405 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. **307**:1915-  
406 1920.
- 407 3. **Ballesté, E., and A.R. Blanch.** 2010. Persistence of *Bacteroides* species  
408 populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Appl.*  
409 *Environ. Microbiol.* **76**:7608-7616.
- 410 4. **Ballesté, E., and A.R. Blanch.** 2011. Bifidobacterial diversity and the  
411 development of new microbial source tracking indicators. *Appl. Environ.*  
412 *Microbiol.* **77**:3518-3525.
- 413 5. **Belanche-Muñoz, L., and A.R. Blanch.** 2008. Machine learning methods for  
414 microbial source tracking. *Environ. Model Soft.* **23**:741-750.
- 415 6. **Bernhard, A.E., and K.G. Field.** 2000. Identification of non-point sources of  
416 fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA  
417 genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1587-1594.
- 418 7. **Blanch, A.R., L. Belanche-Muñoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F.**  
419 **Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kühn, L. Mocé, M. Muniesa, J.**  
420 **Schwartzbrod, S. Skrabber, G.T. Papageorgiou, H. Taylor, J. Wallis, and J.**  
421 **Jofre.** 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing  
422 project within the European Union research programme. *J. Water Health* **2**:249-  
423 260.
- 424 8. **Blanch, A.R., L. Belanche-Muñoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F.**  
425 **Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kuhn, L. Moce, M. Muniesa, J.**  
426 **Schwartzbrod, S. Skrabber, G.T. Papageorgiou, H. Taylor, J. Wallis, and J.**  
427 **Jofre.** 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and  
428 chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Health Perspect.*  
429 **112**:353-358.
- 430 9. **D'Elia, T.V., C.R. Cooper, and C.G. Johnston.** 2007. Source tracking of  
431 *Escherichia coli* by 16S-23S intergenic spacer region denaturing gradient gel



- 432 electrophoresis (DGGE) of the *rrnB* ribosomal operon. *Can. J. Microbiol.*  
433 **53**:1174-1184.
- 434 10. **Eckburg, P.B., E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M.**  
435 **Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson, and D.A. Relman.** 2005. Diversity of the  
436 human intestinal microbial flora. *Science* **308**:1635-1638.
- 437 11. **Fiksdal, L., J.S. Maki, S.J. LaCroix, and J.T. Staley.** 1985. Survival and  
438 detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ.*  
439 *Microbiol.* **49**:148-150.
- 440 12. **Gómez-Doñate, M., E. Ballesté, M. Muniesa, and A.R. Blanch.** 2012. New  
441 molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific  
442 *Bifidobacteriaceae* suitable for microbial source tracking. *Appl. Environ.*  
443 *Microbiol.* **78**:5788-5795.
- 444 13. **Hagedorn, C., J.B. Crozier, K.A. Mentz, A.M. Booth, A.K. Graves, N.J.**  
445 **Nelson, and R.B. Reneau Jr.** 2003. Carbon source utilization profiles as a  
446 method to identify sources of faecal pollution in water. *J. Appl. Microbiol.*  
447 **94**:792-799.
- 448 14. **Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor  
449 and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**:95-  
450 98.
- 451 15. **Hong, P.Y., J.H. Wu, and W.T. Liu.** 2008. Relative abundance of *Bacteroides*  
452 spp. in stools and wastewaters as determined by hierarchical oligonucleotide  
453 primer extension. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:2882-2893.
- 454 16. **Hurst, C.J., R.L. Crawford, J.L. Garland, D.A. Lipson, A.L. Mills, and L.D.**  
455 **Stetzenbach.** 2007. *Manual of Environmental Microbiology*, third ed. ASM  
456 Press, Washinton, DC.
- 457 17. **Jagals, P., and W.O.K. Grabow.** 1996. An evaluation of sorbitol-fermenting  
458 bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution of environmental  
459 water. *Water Sa.* **22**:235-238.

- 460 18. **Jofre, J., and A.R. Blanch.** 2010. Feasibility of methods based on nucleic acid  
461 amplification techniques to fulfil the requirements for microbial analysis of water  
462 quality. *J. Appl. Microbiol.* **109**:1853-1867.
- 463 19. **Kreader, C.A.** 1995. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for  
464 specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1171-  
465 1179.
- 466 20. **Kreader, C.A.** 1998. Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis*  
467 from human feces in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4103-4105.
- 468 21. **Ley, R.E., C.A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, and J.I. Gordon.** 2008.  
469 Worlds within words: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev.*  
470 *Microbiol.* **6**:776-788.
- 471 22. **Mai, V., and J.G. Morris.** 2004. Colonic bacterial flora: changing  
472 understandings in the molecular age. *J. Nutr.* **134**:459-464.
- 473 23. **Muyzer, G., and K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel  
474 electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)  
475 in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**:127-141.
- 476 24. **Myers, R.M., S.G. Fischer, T. Maniatis, and L.S. Lerman.** 1985a. Modification  
477 of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA  
478 sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl.*  
479 *Acids Res.* **13**:3111-3129.
- 480 25. **Myers, R.M., S.G. Fischer, L.S. Lerman, and T. Maniatis.** 1985b. Nearly all  
481 single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be  
482 detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **13**:3131-  
483 3145.
- 484 26. **Sánchez, D., L.A. Belanche, and A.R. Blanch.** 2011. A software for the  
485 microbial source tracking problem. *J. Mach. Learn. Res.* **17**:56-62.

- 486 27. **Scott, T.M., J.B. Rose, T.M. Jenkins, S.R. Farrah, and J. Lukasik.** 2002.  
487 Microbial source tracking: current methodology and future direccions. Appl.  
488 Environ. Microbiol. **68**:5796-5803.
- 489 28. **Serra-Moreno, R., J. Jofre, and M. Muniesa.** 2008. The CI repressors of shiga  
490 toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli*  
491 strains, which causes a down regulation in the production of shiga toxin 2. J.  
492 Bacteriol. **190**:4722-4735.
- 493 29. **Tartera, C., R. Araujo, R. Michel, and J. Jofre.** 1992. Culture and  
494 decontamination methods affecting enumeration of phages infecting  
495 *Bacteroides fragilis* in sewage. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2670-2673.
- 496 30. **USEPA.** 2005. Microbial source tracking. EPA/ORD Source Tracking Group.  
497 Environmental Protection Agency, Office of Research and Development,  
498 Cincinnati, Ohio. April 2005.
- 499 31. **Wei, S., M. Morrison, and Z. Yu.** 2013. Bacterial census of poultry intestinal  
500 microbiome. Poult. Sci. **92**:671-683.
- 501 32. **WHO.** 2008. The global burden disease. 2004. Update. Geneva, Switzerland:  
502 World Health Organization [WWW document]. URL  
503 [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/).
- 504 33. **Ziener, C.J.** 2013. Bacterial isolates from fiber enrichments of cow feces. Appl.  
505 Environ. Microbiol. In press.
- 506
- 507

508 **TABLES AND FIGURES**509 **TABLE 1.** Primers and probes used in this study.

Name	Sequence (5' to 3')	Use	Target <sup>a</sup>	Reference
32F	AACGCTAGCTACAGGCTT	PCR and sequencing	<i>Bacteroides</i> genus specific	Bernhard and Field 2000
708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	PCR	<i>Bacteroides</i> genus specific	Bernhard and Field 2000
32F-GC	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGG- AACGCTAGCTACAGGCTT	PCR-DGGE	<i>Bacteroides</i> genus specific	Myers <i>et al.</i> 1985a, 1985b
580R	CGCTCCCTTTAAACCCAAT	DGGE-PCR and sequencing	<i>Bacteroides</i> genus specific	This study
pGEMup	TGTAATACGACTCACTAT	PCR and sequencing	pGEM plasmid	Serra-Moreno <i>et al.</i> 2008
Bac-FW	GGCGCACGGGTGAGTAAC	qPCR	Uncultured <i>Bacteroides</i>	This study
Bac-Rev	TGTGGGGGACCTTCCTCTC	qPCR	Uncultured <i>Bacteroides</i>	This study
HMprobeBac	GTGAGGGCATCTAATCA	qPCR probe humans	Uncultured <i>Bacteroides</i>	This study
PLprobeBac	TCCGCATGAAGGACTT	qPCR probe poultry	Uncultured <i>Bacteroides</i>	This study
PGprobeBac	TATGATAGCATTAGAGTGTGACGAA	qPCR probe pigs	Uncultured <i>Bacteroides</i>	This study
CWprobeBac	CTATGGGATGGGGATGC	qPCR probe cattle	Uncultured <i>Bacteroides</i>	This study
Bacprobe	CGGGGTAACGGCCCA	qPCR common probe	<i>Bacteroides</i> genus specific	This study

510 <sup>a</sup> Species that match the probes according to the Basic Local Alignment Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) match analysis.

511 **TABLE 2.** Microbial indicators and qPCR results for wastewater samples.

Sample	Microbial indicators		<i>Bacteroides</i> real-time qPCR (GC/ml)				
	<i>E. coli</i> (CFU/ml)	Somatic coliphages (PFU/ml)	HMprobeBac (human)	PLprobeBac (poultry)	PGprobeBac (swine)	CWprobeBac (cattle)	Bacprobe (common)
Human WW-1	$5.25 \times 10^4$	$1.45 \times 10^4$	$1.39 \times 10^7$	0 <sup>a</sup>	0	$1.86 \times 10^6$	$4.56 \times 10^4$
Human WW-2	$4.50 \times 10^4$	$8.80 \times 10^3$	$7.24 \times 10^8$	0	0	$1.36 \times 10^6$	$1.80 \times 10^8$
Human WW-3	$6.00 \times 10^4$	$1.90 \times 10^4$	$2.05 \times 10^9$	0	0	$4.59 \times 10^6$	$1.01 \times 10^8$
Human WW-4	$1.43 \times 10^5$	$2.00 \times 10^4$	$2.48 \times 10^8$	0	0	$1.36 \times 10^6$	$2.58 \times 10^7$
Human WW-5	$2.01 \times 10^4$	$2.16 \times 10^4$	$6.22 \times 10^5$	0	0	$4.44 \times 10^5$	$7.99 \times 10^6$
Poultry WW-1	$7.76 \times 10^4$	$5.50 \times 10^2$	0	$2.42 \times 10^8$	0	$2.52 \times 10^6$	$2.69 \times 10^8$
Poultry WW-2	$1.72 \times 10^7$	$5.40 \times 10^7$	0	$2.84 \times 10^9$	0	$3.46 \times 10^4$	$2.75 \times 10^7$
Poultry WW-3	$6.10 \times 10^6$	$9.25 \times 10^8$	0	$1.40 \times 10^9$	0	$1.36 \times 10^5$	$9.39 \times 10^7$
Poultry WW-4	$6.31 \times 10^4$	$2.70 \times 10^2$	0	$3.01 \times 10^7$	0	$1.59 \times 10^6$	$3.51 \times 10^7$
Poultry WW-5	$1.58 \times 10^5$	$7.40 \times 10^2$	0	$4.53 \times 10^7$	0	$5.74 \times 10^3$	$6.25 \times 10^5$
Pig WW-1	$6.05 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$	0	0	$9.05 \times 10^7$	$4.87 \times 10^8$	$3.34 \times 10^8$
Pig WW-2	$1.89 \times 10^5$	$1.96 \times 10^5$	0	0	$7.92 \times 10^7$	$3.89 \times 10^8$	$2.24 \times 10^8$
Pig WW-3	$1.35 \times 10^4$	$2.84 \times 10^4$	0	0	$1.21 \times 10^7$	$5.52 \times 10^8$	$3.74 \times 10^7$
Pig WW-4	$1.50 \times 10^5$	$1.48 \times 10^5$	0	0	$1.61 \times 10^7$	$5.98 \times 10^7$	$1.31 \times 10^8$
Pig WW-5	$1.85 \times 10^4$	$9.30 \times 10^4$	0	0	$5.68 \times 10^7$	$2.73 \times 10^8$	$1.20 \times 10^8$
Cattle WW-1	$3.31 \times 10^4$	$2.00 \times 10^{-1}$	0	0	0	$2.97 \times 10^5$	$5.95 \times 10^6$
Cattle WW-2	$4.75 \times 10^4$	$6.22 \times 10^1$	0	0	0	$2.60 \times 10^6$	$1.18 \times 10^8$
Cattle WW-3	$3.40 \times 10^4$	$1.06 \times 10^5$	0	0	0	$5.10 \times 10^6$	$4.25 \times 10^8$
Cattle WW-4	$6.31 \times 10^4$	$7.40 \times 10^4$	0	0	0	$1.16 \times 10^7$	$1.23 \times 10^9$
Cattle WW-5	$2.51 \times 10^4$	$1.00 \times 10^0$	0	0	0	$1.35 \times 10^6$	$5.79 \times 10^6$

<sup>a</sup>Zero values are those below the detection limit.

512  
513  
514



## 4. Discusión





#### 4. Discusión

La determinación del origen de la contaminación fecal en los ambientes acuáticos es esencial para la estimación de los riesgos de la salud asociados a los aportes fecales, facilitando así las medidas para la remediación de los escenarios contaminados y establecer las responsabilidades legales para su remediación. Las diferentes metodologías de MST, entre las que se encuentran las de esta tesis doctoral, posibilitan la discriminación del origen de la contaminación fecal.

En lo que respecta al primer estudio, se comprobó en primer lugar que el método descrito por Payán y colaboradores (2005) para el aislamiento de cepas de *Bacteroides* específicas de huésped humano resultó ser igualmente efectivo para las cepas de origen animal. En nuestro caso conseguimos aislar dos cepas específicas para origen vacuno (CW18 y CW50), dos para porcino (PG76 y PG1126) y una para aviar (PL122). Para testar las muestras de agua residual de origen humano utilizamos la cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 anteriormente aislada por miembros de este grupo de investigación (Payán y col. 2005). En algunos casos las cepas seleccionadas no detectaron fagos en muestras de agua residual de su mismo origen. Esto puede deberse a distintos motivos. En el caso de la cepa aviar (PL122), muchas de las muestras provenían de distintos mataderos donde se sacrifican diversas especies de aves de corral. Como ya se ha mencionado, cada especie tiene una microbiota gastrointestinal propia que ha coevolucionado junto con el organismo huésped (Backhed y col. 2005), cosa que implica que cada organismo tendrá un conjunto de fagos característicos de dicha microbiota y que no reconocerían bacterias que formen parte de la microbiota de otra especie. Otro caso es lo que posiblemente sucede con las cepas aisladas de origen vacuno (CW18 y CW50). Las muestras analizadas provienen de vacas con patrones de alimentación distintos, algunas de ellas pacen libremente mientras que otras se encuentran en granjas y son alimentadas con piensos. Como ya se ha descrito en estudios anteriores, la dieta es uno de los factores principales que influye en la composición de la microbiota gastrointestinal (Dethlefsen y col. 2006; Mai 2004; Zoetendal y col. 2004), y por lo tanto, en los fagos que infectan a las bacterias que la forman.

Cuando se testaron las cepas seleccionadas con aguas de distinto origen fecal al suyo propio no se produjo detección de fagos salvo algunas excepciones, como es el caso de las cepas de cerdo (PG76 y PG1126) que detectaron fagos con las aguas de origen humano. A pesar de ello, la densidad de fagos detectada en estas reacciones

#### 4. Discusión

---

cruzadas era mucho menor al número de fagos detectados en las muestras de su mismo origen, lo cual permite la correcta identificación del origen de la contaminación. Estos falsos positivos podrían atribuirse a las cepas seleccionadas o a que exista un aporte fecal porcino en las muestras de origen humano, pero por la información de la que se dispone, es muy improbable que se produzca dicho aporte, ya que las muestras fueron recogidas en zonas donde el aporte fecal era exclusivamente humano.

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de las muestras del río Llobregat, con unos niveles de contaminación fecal moderados, se observó que predominaba la contaminación de origen humano ya que la cepa GA17 detectó fagos en todas las muestras testadas. Las cepas de cerdo, vaca y ave solamente lo hicieron ocasionalmente. Estos resultados confirman la información de la que se dispone de este tramo de río Llobregat, el cual transcurre por zonas urbanas donde predomina el aporte fecal humano (<http://aca-web.gencat.cat>).

La caracterización morfológica de los fagos que infectaban las cepas de *Bacteroides* seleccionadas indicó que los fagos pertenecían a la familia *Siphoviridae*, la cual ya ha sido descrita previamente como la más abundante dentro de los bacteriófagos que infectan cepas de *Bacteroides* (Booth y col. 1979; Jofre y col. 2011; Lasobras y col. 1997; Queralt y col. 2003).

Las cepas de *Bacteroides* seleccionadas resultaron ser una herramienta muy útil y prometedora para la detección del origen de la contaminación fecal en la región estudiada, ya que las fuentes de contaminación predominantes son ciudades, ganadería e industria cárnica. Será necesario testar las cepas seleccionadas con muestras de origen fecal de distintas regiones geográficas para comprobar si resultan también efectivas, tal y como se realizó con la cepa de humano GA17 en estudios anteriores (Payán y col. 2005). Además esta metodología de MST presenta muchas ventajas a pesar de ser un método dependiente de cultivo, ya que es sencilla, económica, no requiere excesivo equipamiento, no se necesita formación compleja del personal y los datos obtenidos permiten el análisis de la carga fecal de las muestras.

A pesar de disponer de una buena herramienta para estudios de MST como son los fagos que infectan cepas específicas de *Bacteroides*, para la correcta identificación del origen de la contaminación fecal en aguas es necesario analizar más de un indicador de MST, lo cual proporciona una mejor discriminación de la fuente de contaminación y una mayor robustez a los resultados (Belanche-Muñoz y Blanch 2008; Blanch y col. 2006).

Los métodos moleculares (no cultivables) presentan muchas ventajas en los estudios de MST, tal y como se ha podido observar en estudios de otros autores (Bernhard y Field 2000; Bonjoch y col. 2004; King y col. 2007; Okabe y col. 2007; Scott y col. 2005). No se quiso descartar la posibilidad de utilizar estas metodologías y por ello se decidió desarrollar dos nuevas qPCRs específicas de cepas de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* asociadas a los huéspedes humano, porcino, aviar y bovino para, de esta manera, combinar los tres indicadores de MST. Estos nuevos parámetros se incluirían en la matriz de datos para el desarrollo de programas de aprendizaje inductivo en estudios de MST (Belanche-Muñoz y Blanch 2008), como el software informático Ichnaea (Sánchez y col. 2011).

Para el diseño de las qPCRs específicas de huésped se seleccionaron los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides* por cumplir muchas de las características necesarias para ser un buen indicador de la contaminación fecal (Hurst y col. 2007).

En primer lugar se diseñó la qPCR de cepas de *Bifidobacterium* asociadas a huésped. Las bacterias del género *Bifidobacterium* ya han sido propuestas como microorganismos indicadores de la contaminación fecal del agua en estudios anteriores (Bahaka y col. 1993; Beerens 1998; Mara y Oragui 1983; Resnick y Levin 1981). Además se ha reportado que existen especies específicas de humano, mientras que también existen otras de origen animal exclusivamente (Ballesté y Blanch 2011; Lynch y col. 2002; Mushi y col. 2010; Nebra y col. 2003; Sinton y col. 1998). En cuanto a su detección, se decidió utilizar técnicas moleculares ya que la persistencia de las bacterias de este género en el medio ambiente es limitada, mientras que las dianas moleculares como es el caso del ADNr 16S persiste mucho más tiempo (Bonjoch y col. 2009) permitiendo así detectar los aportes de contaminación fecal tanto recientes como antiguos. Los problemas principales de los métodos moleculares, entre los que se encuentra la metodología de la qPCR, son que su presencia no determina la infectividad de los microorganismos y que su límite de detección se ve en muchas ocasiones condicionado por el volumen de la muestra analizado, por la capacidad de concentración de la muestra y la metodología de extracción y purificación del ADN.

Debido a estas limitaciones, en este estudio se quiso comprobar si la previa extracción y purificación del ADN de las muestras para su posterior análisis por la qPCR era necesaria para la obtención de resultados consistentes y reproducibles, ya que en otros estudios se sugirió la posibilidad del análisis de la muestra cruda por metodologías moleculares (Fode-Vaughan y col. 2001). De este modo no se perdería diana molecular,

en el proceso de extracción y purificación del ADN de la muestra, y por lo tanto podría utilizarse esta metodología en muestras ambientales donde la concentración de la diana se encuentra cerca de su límite de detección (Jofre y Blanch 2010). Desafortunadamente, los resultados obtenidos con las muestras crudas no resultaron ser consistentes, mientras que los obtenidos con los extractos y purificaciones de ADN fueron fiables y reproducibles. Dentro de estos últimos, los obtenidos con la matriz de PBS mostraron una mayor detección en muestras más diluidas, mientras que los de la matriz de agua residual los mejores resultados se obtuvieron en las primeras diluciones decimales. Esto se debe probablemente a la presencia de partículas en el agua residual que interfirieran en el proceso de purificación del ADN del kit, y que por lo tanto sólo se produjera detección en las primeras diluciones decimales donde la diana se encontraba en mayor concentración. Vistos estos resultados, para los estudios posteriores con la qPCR específica de cepas de *Bacteroides* asociadas a huésped se procedió a analizar las muestras realizando previamente la extracción y purificación del ADN.

En los análisis de las muestras de origen fecal único y conocido por cada una de las cuatro qPCRs diseñadas mostraron un alto grado de especificidad de cada una de las sondas de *Bifidobacterium* específicas de origen. En ningún caso se produjeron reacciones cruzadas, lo que comporta que este conjunto de qPCRs sea una buena herramienta para la discriminación del origen fecal en muestras de agua. También se comprobó su especificidad en muestras con una carga fecal moderada como es el caso del río Llobregat. En este caso solamente se produjo amplificación con la qPCR de *Bifidobacterium* asociadas a humano. Tal y como hemos visto en el caso de los bacteriófagos de *Bacteroides*, este tramo de río donde se recogieron las muestras transcurre por zonas urbanas, predominando así la contaminación de origen humano. En el caso de la qPCR de *Bifidobacterium* no se produjo detección con ninguna qPCR específica de animal, mientras que con las cepas de *Bacteroides* seleccionadas se obtuvieron detecciones de fagos asociados a origen animal de forma ocasional. Estos resultados hacen pensar que la diana de las qPCRs asociadas a animales se encuentra por debajo de su límite de detección. Estos resultados refuerzan la teoría de la necesidad de analizar más de un indicador de la contaminación fecal para una mayor fiabilidad y robustez en los estudios de MST (Belanche-Muñoz y Blanch 2008; Blanch y col. 2006).

En cuanto al diseño de las qPCRs específicas de *Bacteroides* asociadas a huésped, al igual que sucedía con las bacterias del género *Bifidobacterium*, las bacterias del género *Bacteroides* habían sido propuestas como microorganismos indicadores de la contaminación fecal en agua con anterioridad (Fiksdal y col. 1985; USEPA 2005a), y

también se habían descrito especies específicas de huésped (Kreader 1995). *Bacteroides*, al igual que *Bifidobacterium*, presenta una baja viabilidad en el medio ambiente (Avelar y col. 1998; Ballesté y Blanch 2010), por lo que es preferible detectar una diana molecular como el ADNr 16S, la cual persiste más tiempo en un ambiente no entérico (Kreader 1995).

Para la selección de las cepas de *Bacteroides* específicas de origen se realizaron análisis de las poblaciones de *Bacteroides* de cada origen fecal mediante DGGE. Esta técnica permitió separar los distintos fragmentos del ADNr 16S del género *Bacteroides* amplificados con los cebadores específicos de este género. Cada una de las especies mostró una diferente capacidad de migración según su secuencia, lo que se reflejó en una distinta posición en el gel en forma de banda (Muyzer y Smalla 1998). De este modo se pudo observar la distinta composición de las poblaciones de *Bacteroides* por cada origen fecal. En algunos casos, cepas con distinta composición en su secuencia nucleotídica presentaron un mismo dominio de desnaturalización (Ballesté y Blanch 2011), tal y como sucedió con las bandas seleccionadas para cerdo y vaca en este estudio. Esto podría deberse también a que el rango de desnaturalización utilizado en este estudio (40% a 65%) no fuera suficiente para la separación de todas las especies analizadas.

Por tanto, a partir de las bandas seleccionadas para cada origen fecal se diseñó el conjunto de cebadores y sondas específicas de origen de *Bacteroides*. Se analizaron muestras de elevada contaminación y origen fecal único y conocido con cada una de las qPCRs diseñadas. Las específicas de humano, ave y cerdo identificaron correctamente las muestras de su propio origen sin producirse reacciones cruzadas. Sin embargo, la qPCR específica de origen bovino detectó tanto las muestras de su mismo origen fecal como las de distinto origen. Por ello se descartó el uso de ésta hasta poder diseñar otra en ensayos futuros realizados con nuevas muestras. Se considera que en la microbiota gastrointestinal bovina el filo *Firmicutes* es el más abundante (51,9%), mientras que el filo *Bacteroidetes* ocupa el 30% (Ziemer 2013). Dentro de éstos, el género *Prevotella* es más abundante que *Bacteroides* (Petri y col. 2013). Los perfiles de bandas de la DGGE de las muestras con contaminación fecal de bovino mostraron una alta heterogeneidad y una gran variedad de bandas por cada muestra, lo que indica que no predomine ninguna cepa de *Bacteroides* concreta en este origen. Cuando se diseñó la qPCR de *Bifidobacterium* asociada a bovino, los resultados fueron muy positivos ya que identificaba correctamente su origen específico mientras que no se producía identificación con muestras de distinto origen. Esto puede deberse a que la qPCR de *Bifidobacterium* fue diseñada a partir de

las bandas específicas de origen del análisis por DGGE del estudio de poblaciones de *Bifidobacterium* de origen bovino (Ballesté y Blanch 2011). Los perfiles de bandas para *Bifidobacterium* resultaron ser más homogéneos y con unas bandas más definidas para este origen (Ballesté y Blanch 2011).

En algunos casos no se produjo amplificación con las muestras del origen específico de la qPCR en los casos de ave y porcino. Este hecho puede deberse a múltiples factores. En el caso de las aves podría suceder porque en los mataderos donde se recogieron las muestras se sacrifican distintas especies animales, fundamentalmente gallinas y pavos, y también, aunque en menor medida, se sacrifican otras especies de ave de corral. Cada especie animal, como se ha visto anteriormente, tiene una microbiota gastrointestinal específica, lo que comporta que el marcador que se ha utilizado detecte una especie concreta pero no se encuentre en la otra. En el caso de las muestras de cerdo se observó que los perfiles de bandas resultaron ser bastante heterogéneos, de modo que no se encontraran siempre todas las bandas en las distintas muestras analizadas. Dada esta variabilidad, es posible que en algunas de las muestras analizadas posteriormente por la qPCR específica de cerdo no se encuentre la diana seleccionada, y que por lo tanto no se produzca la identificación.

En cuanto a la qPCR diseñada con la sonda común para el género *Bacteroides* se observó amplificación en todas las muestras analizadas. Los resultados obtenidos mostraron una detección mayor que las sondas específicas de cada origen. Esto es debido a que la sonda común no solamente detecta la cepa de la banda concreta seleccionada para cada origen, sino que también el resto de cepas de *Bacteroides* que conforman la microbiota gastrointestinal del organismo huésped, de modo que aunque no se produzca la amplificación por su qPCR específica como ha sucedido en algunos casos, es posible concluir que se ha producido un aporte fecal en la muestra de estudio. Aunque no se muestre en esta tesis doctoral, también se diseñó una sonda común para las qPCR de *Bifidobacterium*. Se produjo amplificación en todos los casos al analizar muestras tanto de elevada carga fecal de los distintos orígenes como las de carga fecal moderada con esta qPCR común para bifidobacterias. Al igual que sucedía con la qPCR común de *Bacteroides*, los resultados obtenidos fueron superiores a los que produjeron con las qPCRs de *Bifidobacterium* específicas de huésped. La aplicación de las qPCRs comunes de los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium* sirve además como control de la presencia de la diana en las muestras, a fin de poder evaluar si las muestras son negativas debido a bajos niveles de contaminación o porque el origen fecal determinado no se encuentra presente.

Este conjunto de qPCRs específicas de *Bacteroides* debe procesar más muestras de origen fecal conocido, de diferentes orígenes geográficos. Estos estudios se están realizando actualmente como parte de un proyecto europeo en el que participa el grupo de investigación.

El objetivo final de estos estudios es poder incluir el conjunto de qPCRs de *Bacteroides* en desarrollo en estudios con programas de software informático que desarrollen modelos de predicción para estudios de MST. Los bacteriófagos específicos de *Bacteroides* y las qPCRs de *Bifidobacterium* asociadas a huésped desarrollados en esta tesis doctoral se incluyeron en el programa de aprendizaje inductivo Ichnaea (Sánchez y col. 2011), junto con los indicadores tradicionales *E. coli*, enterococos y SOMCPH, y otros métodos de MST, como los análisis por PCR del ADN mitocondrial (Caldwell y col. 2007; Caldwell y Levine 2009; Kortbaoui y col. 2009; Martellini y col. 2005; Schill y Mathes 2008) y PCR multiplex de *Bif. adolescentis* y *Bif. dentium* (Lynch y col. 2002; Nebra y col. 2003) para establecer modelos predictivos en el estudio de MST.

La aplicación de estas metodologías se ha podido observar en el apartado 3.3., en el estudio de muestras de carga fecal moderada y diluida y/o antigua. Para la puesta a punto del programa se analizaron muestras de elevada carga fecal y de origen único y conocido. Ninguno de los indicadores de MST propuestos mostró problemas en la identificación del organismo causante de la contaminación en el análisis de dichas muestras, aunque como ya ha sido reportado anteriormente, la mayoría de los indicadores de la contaminación fecal no presentan limitaciones en la identificación de la fuente contaminante en muestras recogidas en el origen (Hagedorn y col. 2011), que presentan altos niveles de esa contaminación. En nuestro caso particular, los indicadores utilizados funcionaban correctamente mientras el nivel de la contaminación fuera mayor o igual a 3 unidades logarítmicas de *E. coli*.

Posteriormente se analizaron muestras de carga fecal moderada, consideradas como tales aquellas con 3 unidades logarítmicas menos de *E. coli* y SOMCPH por 100 ml que las muestras de agua residual urbana. Estas muestras fueron tomadas del río Llobregat, y en éstas todos los indicadores de MST confirmaron que predominaba la contaminación fecal de origen humano. Este tramo de río transcurre por zonas urbanas y recibe fundamentalmente aportes de los efluentes de las plantas depuradoras de las ciudades colindantes. En primer lugar, la ratio de los fagos que infectaron la cepa GA17 (humano) con los SOMCPH resultó ser mucho mayor que el resto de los bacteriófagos de

las otras cepas de *Bacteroides* con los SOMCPH. Esta ratio ya había sido propuesta como una buena herramienta en los estudios de MST para la discriminación del origen fecal humano y animal (Muniesa y col. 2012). En segundo lugar, tanto la PCR del indicador *Bif. adolescentis* (Field y Samadpour 2007) como la qPCR de *Bifidobacterium* específica de humano obtuvieron resultados positivos en todas la muestras testadas. En el caso de los marcadores de ADNmt, los de vaca y ave presentaron algunos falsos positivos. Dada la sensibilidad y la naturaleza del método basado en la detección del ADN mitocondrial, estas reacciones cruzadas pueden originarse por la contaminación de origen no fecal, como por ejemplo por piel, pelo de animales, o por los restos de carne consumida por los humanos y que a través del aporte fecal humano llegue al río y sea detectado por el análisis del ADNmt (Caldwell y col. 2011).

En cuanto a las muestras analizadas del sistema de canales de riego del río Ebro, presentaban unos niveles de contaminación fecal muy diluida (1, 2 y en algún caso esporádico 3 unidades logarítmicas de *E. coli* i SOMCPH por 100 ml). En estas muestras muchos de los indicadores utilizados no resultaron útiles, dado que su diana se encontraba por debajo de sus límites de detección. Esto se observó al aplicar las qPCRs de *Bifidobacterium* y los marcadores de ADNmt. Sirva como excepción el marcador POMITO (marcador de ADNmt porcino), que se detectó a la salida de la planta de tratamiento de aguas de la urbanización Els Muntells. Este extraño resultado puede deberse, al igual que sucedía en las muestras del río Llobregat, a una contaminación no fecal, como los restos de carne porcina consumida por los humanos y que a través de las heces llegan a la planta depuradora (Anónimo 2006). Ha sido descrito que si el nivel de *E. coli* es menor a  $10^3$  UFC/100ml, las metodologías basadas en técnicas moleculares no son capaces de detectar su diana debido a que ésta se encuentra por debajo de su límite de detección (Jofre y Blanch 2010). A pesar de ello, la PCR multiplex que detectaba *Bif. adolescentis* (Bonjoch y col. 2004) resultó ser positiva en 13 de las 32 muestras procesadas, todas ellas recogidas en puntos con una posible contribución humana, mostrando así una mayor sensibilidad que el resto de técnicas moleculares. No fue éste el caso de la PCR multiplex de *Bif. dentium*, que sólo resultó ser positiva en una muestra. Las concentraciones de los fagos de *Bacteroides* resultaron ser muy bajas, o no detectables a lo largo de todo el sistema, lo cual coincidió con los bajos valores obtenidos con los SOMCPH.

El conjunto de canales de riego del río Ebro resultó ser un buen ejemplo como escenario de contaminación fecal muy diluida y/o antigua, donde el uso de un solo indicador de MST resulta ser insuficiente para la correcta discriminación del origen de la



contaminación fecal, siendo así necesaria una combinación de indicadores y donde la aplicación de programas de aprendizaje inductivo, como Ichnaea (Sánchez y col. 2011), pueden proporcionar una interpretación objetiva y por tanto una mayor fiabilidad de los resultados (Belanche-Muñoz y Blanch 2008).

A partir de los datos obtenidos con las muestras de elevada carga fecal y de origen único y conocido, el programa Ichnaea pudo establecer modelos predictivos capaces de determinar qué indicadores de la contaminación fecal son más fiables en cada escenario particular y poder así confirmar la identificación del organismo causante del aporte fecal con un alto grado de precisión. El programa calcula además el resultado teórico de cada marcador en caso de dilución de la muestra y luego aplica esos datos en el escenario real. Esto sucedió al analizar las muestras de moderada carga fecal del río Llobregat, donde se determinó que el hombre era el principal causante de la contaminación fecal, y en el sistema de canales de riego del río Ebro, donde los principales agentes contaminantes resultaron ser el hombre y las aves. Estos resultados coincidían con los conocimientos que se tienen del área muestreada, ya que los puntos donde se recogieron muestras estaban situados cerca de pequeñas urbanizaciones y zonas donde hay granjas de aves de corral.

Según los modelos establecidos por el programa, los indicadores de contaminación fecal más fiables en el caso de una carga fecal diluida y/o de cierta antigüedad fueron CW18, PG76, GA17, BOMITO, ADO y CKMITO. A medida que el efecto de la antigüedad y la dilución aumentan, hay indicadores que pierden su relevancia, ya que su límite de detección se encuentra por encima de la concentración de su diana en la muestra a analizar. Este es el caso de las qPCR de bifidobacterias o el marcador DEN.

Tal y como se ha podido comprobar, la conjunción de distintos indicadores de MST proporcionan una mayor información sobre el origen de la contaminación fecal, permitiendo así conocer la fuente del aporte fecal tanto en muestras de elevada carga, modera y diluida y/o antigua. Si junto con ellos se realizan análisis con programas de aprendizaje inductivo como Ichnaea, además es posible conocer la fiabilidad de los resultados y qué indicadores son más relevantes para cada escenario en particular.

Muchas de las metodologías disponibles de MST, como las que se han descrito en esta tesis doctoral, a pesar de estar todavía en vías de desarrollo, han sido aplicadas con éxito en la gestión de masas de agua contaminadas con materia fecal en países desarrollados (Gourmelon y col. 2010; Jiang y col. 2007; Kim y col. 2010; Lu y col. 2009).

De todos modos, todas las metodologías de MST propuestas hasta la fecha presentan una limitación, la cual es que su aplicabilidad está limitada a una determinada área geográfica (Blanch y col. 2006; Hagedorn y col. 2011; Payán y col. 2005). Las metodologías expuestas en esta tesis doctoral por los experimentos que se están llevando a cabo con un proyecto europeo presentan esta limitación (a la espera del análisis de más muestras), como también sucede a otras técnicas como los ribotipos de *E. coli* (Scott y col. 2003) o la rep-PCR de *E. coli* (Hansen y col. 2009). Las razones de esta inestabilidad geográfica se desconocen, aunque durante la última década algunos autores han defendido que se puede deber a la variabilidad de la comunidad que conforma la microbiota gastrointestinal debido a la dieta, factores genéticos del huésped y/o factores ambientales (Ley y col. 2008; Shanks y col. 2011).

Todo esto implica que es muy improbable que exista un único método de MST universal, ya que cada región necesita un conjunto de indicadores específicos propios de aquella zona. Los programas de aprendizaje inductivo pueden facilitar la elección de los marcadores ideales tanto para la región concreta como para la situación de la contaminación fecal que presenta (concentrada, moderada, diluida o antigua).

## 5. Conclusiones



## 5. Conclusiones

De los estudios realizados en esta tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El método de aislamiento de cepas de *Bacteroides* aplicado anteriormente para humano también es útil para el aislamiento de cepas asociadas a huéspedes animales. Esta metodología puede ser aplicada en distintas áreas geográficas para el aislamiento de sus cepas específicas.
- Las cepas PG76, PG1226, CW18, CW50 y PL122 son un muy buen discriminante de la contaminación fecal de origen porcino, bovino y aviar respectivamente. Junto con la cepa GA17 integran un grupo de cepas capaces de discriminar la contaminación fecal de diversos orígenes (humano, bovino, porcino y aviar). A pesar de ello, no son capaces de detectar bacteriófagos en todas las muestras. Por ello, es posible que se necesiten más cepas aisladas de estos tipos de agua residual como marcadores de esta contaminación.
- En el río Llobregat, de carga fecal moderada, la cepa específica de humano, GA17, detectó fagos en todos los casos, mientras que con las cepas de origen animal sólo se produjo la detección ocasionalmente. Esto coincide con la información que se dispone de este tramo de río, el cual transcurre por zonas urbanas.
- Se confirmó por análisis morfológico que los fagos que infectaron las cepas de *Bacteroides* seleccionadas pertenecían a la familia *Siphoviridae*, la cual es la más abundante en los fagos que infectan este género bacteriano. Las cepas aisladas pertenecen a las especies *Bacteroides fragilis* y *B. thetaiotaomicron* comunes en el tracto intestinal humano y animal
- El análisis de los fagos específicos de *Bacteroides* es una buena herramienta, sencilla y económica en estudios de MST.
- Para la realización de las qPCRs desarrolladas es necesario un paso previo de extracción y purificación del ADN de la muestra, contrariamente a lo sugerido por otros autores, para la obtención de unos resultados fiables, repetibles y consistentes.

## 5. Conclusiones

---

- Las qPCRs de *Bifidobacterium* asociadas a huésped permitieron la correcta identificación, sin producirse reacciones cruzadas, del causante del aporte fecal en las muestras, tanto de elevada carga fecal como moderada. Esto las convierte en una herramienta rápida y útil para estudios de MST.
- Todos los indicadores de MST utilizados en el tercer estudio, bacteriófagos de *Bacteroides*, qPCR de bifidobacterias, análisis del ADNmt y PCR multiplex de ADO-DEN, fueron capaces de identificar el causante de la contaminación fecal en muestras tomadas en el origen, tal y como se había descrito anteriormente, y en las muestras de carga fecal moderada (río Llobregat).
- Las muestras analizadas del sistema de canales de riego del río Ebro tienen una carga fecal muy diluida, lo que comportó que muchos de los indicadores de MST (especialmente los moleculares) no resultaran útiles ya que la concentración de su diana se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica.
- La técnica de detección del marcador ADO por PCR junto con los bacteriófagos de *Bacteroides* resultaron ser las más efectivas en el análisis de las muestras de carga fecal más diluida (río Ebro).
- Las reacciones cruzadas que se producen en el análisis de los marcadores de ADNmt de las distintas muestras pueden deberse a la contribución no fecal de células del huésped animal como piel, pelo y los restos de carne consumida por las personas y que son expulsadas a través de las heces.
- El análisis conjunto de diversos marcadores de MST proporciona una mayor fiabilidad y robustez a los resultados obtenidos, tal y como otros autores habían descrito, especialmente en muestras donde la carga fecal es diluida y/o el aporte fecal es antiguo como es el caso del sistema de canales del río Ebro.
- El programa de aprendizaje inductivo Ichnaea elaboró modelos predictivos que permitieron confirmar el origen de la contaminación fecal con un alto grado de fiabilidad y establecer qué indicadores de MST (CW18, PG76, GA17, BOMITO, ADO y CKMITO) eran los más adecuados para cada escenario concreto según los efectos de dilución y/o antigüedad del aporte fecal.

- La metodología de DGGE permitió analizar las poblaciones de *Bacteroides* de cada origen fecal (humano, aviar, porcino y bovino) y establecer qué cepas eran significativas para cada huésped.
- Las qPCR de *Bacteroides* específicas de los huéspedes humano, aviar y porcino identificaron correctamente y sin presentar reacciones cruzadas las muestras de elevada carga fecal testadas.
- La qPCR de *Bacteroides* específica de bovino se descartó por presentar reacciones cruzadas y así no poder identificar las muestras de contaminación fecal bovina.
- La variabilidad en las poblaciones de *Bacteroides* en el caso de cerdo y las diferentes poblaciones de aves de corral sacrificadas en los mataderos son seguramente la causa por la que en ocasiones las qPCRs específicas no fueran capaces de identificar algunas de las muestras analizadas.
- La qPCR común para el género *Bacteroides* detectó todas las muestras procesadas, confirmando así el aporte fecal de las mismas. El nivel de contaminación detectado es mayor que las qPCRs específicas ya que detecta todas las cepas de *Bacteroides* que forman parte de la microbiota gastrointestinal del organismo huésped.
- Es necesario continuar con el desarrollo de las qPCR de *Bacteroides* con el fin de solucionar estas limitaciones y ser así incluidas, junto a otros parámetros, en la aplicación de programas de aprendizaje inductivo como el software Ichnaea.





## 6. Bibliografía



## 6. Bibliografía

## -A-

1. **Adams, M.H.** 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, INC., New York.
2. **American Public Health Association.** 1971. Standard methods for the examination of water and wastewater. 3<sup>rd</sup> ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
3. **Andreasson, H., U. Gyllensten y M. Allen.** 2002. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Biotech.* **33**:407-411.
4. **Anónimo.** 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. Washington, DC, USA: American Public Health Association.
5. **Anónimo.** 2000. ISO 10705-2: Water Quality. Detection and enumeration of bacteriophages – Part 2: Enumeration of somatic coliphages. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardisation.
6. **Anónimo.** 2001. ISO 10705-4: Water Quality. Detection and enumeration of bacteriophages – Part 2: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardisation.
7. **Anónimo.** 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. L64:37-51.
8. **Avelar, K.E.S., S.R. Moraes, L.J.F. Pinto, W. das G.S. Souza, R.M.C.P. Domingues y M.C. de S. Ferreira.** 1998. Influence of stress conditions on *Bacteroides fragilis* survival and protein profiles. *Zentralbl. Bakteriol.* **287**:399-409.
9. **Avise, J.C., R.A. Lansman y R.O. Shade.** 1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics* **92**:279-295.

## -B-

10. **Backhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson y J.I. Gordon.** 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* **307**:1915-1920.
11. **Bahaka, D., C. Neut, A. Khattabi, D. Monget y F. Gavini.** 1993. Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:565-573.
12. **Bai, R., C. Perng, C. Hsu y L.C. Wong.** 2004. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1101**:304-309.

## 6. Bibliografía

---

13. **Bakir, M.A., M. Kitahara, M. Sakamoto, M. Matsumoto e Y. Benno.** 2006a. *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:151-154.
14. **Bakir, M.A., M. Kitahara, M. Sakamoto, M. Matsumoto e Y. Benno.** 2006b. *Bacteroides finegoldii* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:931-935.
15. **Bakir, M.A., M. Sakamoto, M. Kitahara, M. Matsumoto e Y. Benno.** 2006c. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1639-1643.
16. **Ballesté, E. y A.R. Blanch.** 2010. Persistence of *Bacteroides* species populations in a river as measured by molecular and culture techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7608-7616.
17. **Ballesté, E. y A.R. Blanch.** 2011. Bifidobacterial diversity and the development of new microbial source tracking indicators. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:3518-3525.
18. **Baughn, A.D. y M.H. Malamy.** 2004. The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen *Nature* **427**:441-444.
19. **Beerens, H.** 1998. Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products: detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**:203-207.
20. **Belanche-Muñoz, L. y A.R. Blanch.** 2008. Machine learning methods for microbial source tracking. *Environ. Model Soft.* **23**:741-750.
21. **Benno, Y., J. Watabe y T. Mitsuoka.** 1983. *Bacteroides pyogenes* sp. nov., *Bacteroides suis* sp. nov., and *Bacteroides helcogenes* sp. nov., new species from abscesses and feces of pigs. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**:396-407.
22. **Bergman, E.N.** 1990. Entergy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* **70**:567-590.
23. **Bernhard, A.E. y K.G. Field.** 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4571-4574.
24. **Biavati, B., M. Vescovo, S. Torriani y V. Bottazi.** 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.* **50**:117-131.
25. **Biavati, B. y P. Mattarelli.** 2006. The family *Bifidobacteriaceae*. *Prokaryotes* **3**:322-382.

26. **Blanch A.R., L. Belanche-Muñoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F. Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kühn, L. Mocé, M. Muniesa, J. Schwartzbrod, S. Skrabber, G.T. Papageorgiou, H. Taylor, J. Wallis y J. Jofre.** 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. *J. Water Health* **2**:249-260.
27. **Blanch, A.R., L. Belanche-Muñoz, X. Bonjoch, J. Ebdon, C. Gantzer, F. Lucena, J. Ottoson, C. Kourtis, A. Iversen, I. Kuhn, L. Moce, M. Muniesa, J. Schwartzbrod, S. Skrabber, G.T: Papageorgiou, H. Taylor, J. Wallis y J. Jofre.** 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. *Appl. Environ. Health Perspect.* **112**:353-358.
28. **Blaut, M., M.D. Collins, G.W. Welling, J. Dore, J. van Loo y W. de Vos.** 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut project. *Br. J. Nutr.* **87**:203-211.
29. **Bolzani, R., F. Ruggeri y O.M. Olivo.** 1979. Average normal temperature of the chicken in the morning and after 1-2 days of fasting. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **55**:1618-1622.
30. **Bonjoch, X., E. Ballesté y A.R. Blanch.** 2004. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:3171-3175.
31. **Bonjoch, X., F. Lucena y A.R. Blanch.** 2009. The persistence of bifidobacteria populations in a river measured by molecular and culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* **107**:1178-1185.
32. **Booth, S.J., R.L. Van Tassell, J.L. Johnson y T.D. Wilkins.** 1979. Bacteriophages of *Bacteroides*. *Rev. Infect. Dis.* **1**:325-334.
33. **Boving, T.B., D.L. Meritt y J.C. Boothroyd.** 2004. Fingerprinting sources of bacterial input into small residential watersheds: fate of fluorescent whitening agents. *Environ. Geol.* **46**:228-232.
34. **Breed, R.S., E.G.D. Murray y N.R. Smith.** 1957. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. 7<sup>th</sup> ed. London.
35. **Brion, G.M. y S. Lingireddy.** 2003. Artificial neural network modelling: a summary of successful applications relative to microbial water quality. *Water Sci. Technol.* **47**:235-240.

## 6. Bibliografía

---

36. **Bryant, M.P., N. Small, C. Bouma y H. Chu.** 1958. *Bacteroides ruminicola* n. sp. and the new genus and species *Succinimonas amylolytica*. Species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. *J. Bacteriol.* **76**:15-23.
37. **Buerge, I.J., T. Poiter, M.D. Muller y H.R. Buser.** 2003. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **37**:691-700.
38. **Bull, I.D., M.J. Lockheart, M.M. Elhmmali, D.J. Roberts y R.P. Evershed.** 2002. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environ. Int.* **27**:647-654.
39. **Burkhardt, M.R.** 1999. Determination of submicrogram-per liter concentrations of caffeine in surface water and groundwater samples by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **82**:161-166.
40. **Buser, H.R., T. Poiger y M.D. Muller.** 1999. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environ. Sci. Technol.* **33**:2529-2535.

-C-

41. **Caldwell, J.M., M.E. Raley y J.F. Levine.** 2007. Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated effluents. *Environ. Sci. Technol.* **41**:3277-3283.
42. **Caldwell, J.M. y J.F. Levine.** 2009. Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *J. Microbiol. Methods.* **77**:17-22.
43. **Caldwell, J.M., P. Payment y R. Villemur.** 2011. Mitochondrial DNA as source tracking markers of fecal contamination, p. 642. In Hagedorn C, Blanch A.R, Harwood V.J. (eds.), *Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies*, 1st ed. Springer Science, New York.
44. **Candela, M., B. Vitali, D. Matteuzzi y P. Brigidi.** 2004. Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**:229-232.
45. **Cardenas, P.A., M. Alarcón, I. Narvaez, R. Salazar, G. Falconí, M. Espinel y G. Trueba.** 2013. *Staphylococcus aureus* outbreak in the intensive care unit of the largest public hospital in Quito, Ecuador. *Int. Microbiol.* **16**:81-86.
46. **Carson, C.A., B.L. Shear, M.R. Ellersieck y J.D. Schmell.** 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal *Escherichia coli* from humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1836-1839.

47. **Casanovas-Massana, A. y A.R. Blanch.** 2013. Determination of fecal contamination origin in reclaimed water open-air ponds using biochemical fingerprinting of enterococci and fecal coliforms. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **20**:3003-3010.
48. **Chan, P.C.K. y R.K. Porschen.** 1977. Evaluation of Kanamycin-Esculine Bile Agar for isolation and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. *J. Clin. Microbiol.* **6**:528-529.
49. **Chassard, C., E. Delmas, P.A. Lawson y A. Bernalier-Donadille.** 2008. *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:1008-1013.
50. **Clara, M., B. Strenn y N. Kreuzinger.** 2004. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behavior of carbamazepine in waterwater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* **38**:947-954.
51. **Colomer-Lluch, M., J. Jofre y M. Muniesa.** 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* **6**:e17549
- D-
52. **Delcenserie, V., F. Gavini, H. Beerens, O. Tresse, C. Franssen y G. Daube.** 2007. Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**:381-389.
53. **Dellaglio, F. y G.E. Felis.** 2005. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. Ed. Gerald W. Tannock University of Otago, Dunedin, New Zealand.
54. **Desmarais, T.R., H.M. Solo-Gabriele y C.J. Palmer.** 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1165-1172.
55. **Dethlefsen, L., P.B. Eckburg, E.M. Bik y D.A. Relman.** 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* **21**:517-523.
56. **Distaso, A.** 1912. Contribution a l'étude sur l'intoxication intestinale. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.* **62**:433-468.
57. **Donders, G., G. Bellen y D. Rezeberga.** 2011. Aerobic vaginitis in pregnancy. *B.J.O.G.* **118**:1163-1170.

58. **Dubinsky, E.A., L. Esmaili, J.R. Hulls, Y. Cao, J.F. Griffith y G.L. Andersen.** 2012. Application of phylogenetic microarray analysis to discriminate sources of fecal pollution. *Environ. Sci. Technol.* **46**:4340-4347.

-E-

59. **Ebdon, J., M. Muniesa y H. Taylor.** 2007. The application of a recently isolated strain of *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water Res.* **41**:3683-3690.
60. **Eckburg, P.B., E.M. Bik, C.N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S.R. Gill, K.E. Nelson y D.A. Relman.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**:1635-1638.
61. **Eggerth, A.H. y B.H. Gagnon.** 1933. The *Bacteroides* of human feces. *J. Bacteriol.* **25**:389-413.

-F-

62. **Faa, G., C. Gerosa, D. Fanni, S. Nemolato, P. van Eyken y V. Fanos.** 2013. Factors influencing the development of a personal tailored microbiota in the neonate, with a particular emphasis on antibiotic therapy. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **26**:35-43.
63. **Feachem, R.G.** 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Res.* **9**:689-690.
64. **Fenner, L., V. Roux, M.N. Mallet y D. Raoult.** 2005. *Bacteroides massiliensis* sp. nov., isolated from blood culture of a newborn. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1335-1337.
65. **Field, K.G., E.C. Chern, L.K. Dick, J. Fuhrman, J. Griffith, P.A. Holden, M.G. LaMontagne, J. Le, B. Olson y M.T. Simonich.** 2003. A comparative study of culture-independent, library-independent genotypic methods of fecal source tracking. *J. Water. Health.* **1**:181-194.
66. **Field, K.G. y M. Samadpour.** 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res.* **41**:3517-3538.
67. **Fiksdal, L., J.S. Maki, S.J. LaCroix y J.T. Staley.** 1985. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:148-150.
68. **Finegold, S.M., H.R. Attebery y V.L. Sutter.** 1974. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **27**:1456-1469.



69. **Fischer, S.G. y L.S. Lerman.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* **16**:191-200.
70. **Fode-Vaughan, K.A., C.F. Wimpee, C.C. Remsen y M.L.P. Collins.** 2001. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction. *BioTechniques* **31**:598-607.
71. **Fong, T.T., D.W. Griffin y E.K. Lipp.** 2005. Molecular assays for targeting human human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2070-2078.
72. **Fono, L.J. y D.L. Sedlack.** 2005. Use of the chiral pharmaceutical propranolol to identify sewage discharges into surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **39**:9244-9252.
73. **Friedman, S.D., E.M. Cooper, L. Casanova, M.D. Sobsey y F.J. Genthner.** 2009. A reverse transcription-PCR assay to distinguish the four genogroups of male-specific (F+) RNA coliphages. *J. Virol. Methods* **159**:47-52.
74. **Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**:365-378.

-G-

75. **García-Aljaro, C., E. Ballesté, R. Rosselló-Mora, A. Cifuentes, M. Richter y A.R. Blanch.** 2012. *Neoscardovia arbecensis* gen. nov., sp. nov., isolated from porcine slurries. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**:374-379.
76. **Gavini, F., M. Van Esbroeck, J.P. Touzel, A. Fourment y H. Goossens.** 1996. Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the bifid-shunt in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe* **2**:191-193.
77. **Geldreich, E.E. y B.A. Kenner.** 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.* **41**:R336.
78. **Gerber, A.S., R. Loggins, S. Kumar y T.E. Dowling.** 2001. Does nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes? *Ann. Rev. Gen.* **35**:539-566.
79. **Gómez-Doñate, M., A. Payán, I. Cortés, A.R. Blanch, F. Lucena, J. Jofre y M. Muniesa.** 2011. Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water. *Environ. Microbiol.* **13**:1622-1631.
80. **Gómez-Doñate, M., E. Ballesté, M. Muniesa y A.R. Blanch.** 2012. New molecular quantitative PCR assay for detection of host-specific *Bifidobacteriaceae* suitable for microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:5788-5795.

## 6. Bibliografía

---

81. **Gómez-Doñate, M. y M. Muniesa.** Bacteriófagos y su utilización como indicadores de contaminación fecal vírica en aguas y alimentos. *Biocontrol*. En prensa.
  82. **Gourmelon, M., M.P. Caprais, C. Le Mennec, S. Mieszkin, C. Ponthoreau y M. Gendronneau.** 2010. Application of library-independent microbial source tracking methods for identifying the sources of faecal contamination in coastal areas. *Water Sci. Technol.* **61**:1401-1409.
  83. **Grabow, W.O.K., T.E. Neubrech, C.S. Holtzhausen y J. Jofre.** 1995. *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages. Excretion by humans and animals. *Water Sci. Technol.* **31**:223-230.
  84. **Grabow, W.O.K.** 2001. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water S.A.* **27**:18.
  85. **Griffin, D.W., E.K. Lipp, M.R. McLaughlin y J.B. Rose.** 2001. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. *BioScience* **51**:817-825.
  86. **Griffith, J.B., S.B. Weisberg y C.D. McGee.** 2003. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. *J. Wat. Health* **1**:141-151.
  87. **Grimalt, J.O., P. Fernandez, J.M. Bayona y J. Albaiges.** 1990. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* **24**:357-363.
  88. **Guelin, A.** 1948. Etude quantitative de bacteriophages typhiques. VI. Dans les eaux. *Ann. Inst. Pasteur* **79**:447.
- H-
89. **Hagedorn, C., J.B. Crozier, K.A. Mentz, A.M. Booth, A.K. Graves, N.J. Nelson y R.B. Reneau Jr.** 2003. Carbon source utilization profiles as a method to identify sources of faecal pollution in water. *J. Appl. Microbiol.* **94**:792-799.
  90. **Hagedorn, C. y S.B. Weisberg.** 2009. Chemical-based fecal source tracking methods: current status and guidelines for evaluation. *Environ. Sci. Biotechnol.* **8**:275-287.
  91. **Hagedorn, C., A.R. Blanch y V.J. Harwood.** 2011. *Microbial source tracking: methods, applications, and case studies.* Springer. New York, NY.
  92. **Hansen, D.L., S. Ishii, M.J. Sadowsky y R.E. Hicks.** 2009. *Escherichia coli* populations in great lakes waterfowl exhibit spatial stability and temporal shifting. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1546-1551.

93. **Harwood, V.J., B. Wiggins, C. Hagedorn, R.D. Ellender, J. Gooch, J. Kern, M. Samadpour, A.C. Chapman, B.J. Robinson y B.C. Thompson.** 2003. Phenotypic library-based microbial source tracking methods: efficacy in the California collaborative study. *J. Water. Health.* **1**:153-166.
94. **Harwood, V.J., A.B. Boehm, L.M. Sassoubre, K. Vijayavel, J.R. Stewart, T.T. Fong, M.P. Caprais, R.R. Converse, D. Diston, J. Ebdon, J.A. Fuhrman, M. Gourmelon, J. Gentry-Shields, J.F. Griffith, D.R. Kashian, R.T. Noble, H. Taylor y M. Wicki.** 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. **47**:6929-6943.
95. **Havelaar, A.H., K. Furuse y W.M. Hogeboom.** 1986. Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal feces. *J. Appl. Bacteriol.* **60**:255-262.
96. **Hayashi, H., K. Shibata, M.A. Bakir, M. Sakamoto, S. Tomita e Y. Benno.** 2007. *Bacteroides coprophilus* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:1323-1326.
97. **Hentges, D.J.** 1980. Does diet influence human fecal microflora composition? *Nutr. Rev.* **38**:329-336.
98. **Hill, M.J.** 1981. Diet and the human intestinal bacterial flora. *Cancer Res.* **41**:3778-3780.
99. **Holdeman, L.V. y W.E.C. Moore.** 1974. New genus, *Coprococcus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**:260-277.
100. **Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson y D.H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:7276-7280.
101. **Hooper, L.V., T. Midtvedt y J.I. Gordon.** 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* **22**:283-307.
102. **Hoyles, L., E. Inganäs, E. Falsen, M. Drancourt, N. Weiss, A.L. McCartney y M.D. Collins.** 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:995-999.
103. **Hsu, F.C., Y.S. Shieh, J. van Duin, M.J. Beekwilder y M.D. Sobsey.** 1995. Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3960-3966.

## 6. Bibliografía

---

104. **Hundesda, A., C. Maluquer de Motes, S. Bofill-Mas, N. Albinana-Gimenez y R. Girones.** 2006. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7886-7893.
105. **Hurst, C.J., R.L. Crawford, J.L. Garland, D.A. Lipson, A.L. Mills y L.D. Stetzenbach.** 2007. *Manual of Environmental Microbiology*, third ed. ASM Press, Washinton, DC.
- I-
106. **Ijzerman, M.M. y C. Hagedorn.** 1992. Improved method for coliphage detection based on beta-galactosidase induction. *J. Virol. Methods* **40**:31-36.
107. **Isaacson, R. y H.B. Kim.** 2012. The intestinal microbiome of the pig. *Anim. Health Res. Rev.* **13**:100-109.
108. **Isobe, K.O., M. Tarao, N.H. Chiem, L.Y. Minh y H. Takada.** 2004. Effect of environmental factors on the relationship between concentrations of coprostanol and fecal indicator bacteria in tropical (Mekong Delta) and temperate (Tokyo) freshwaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:814-821.
109. **Iyengar, V., G.P. Albaugh, A. Lohani y P.P. Nair.** 1991. Human stools as a source of viable colonic epithelial cells. *F.A.S.E.B. J.* **5**:2856-2859.
- J-
110. **Jackson, F.L. e Y.E. Goodman.** 1978. *Bacteroides ureolyticus*, a new species to accomodate strains previously identified as *Bacteroides corrodens*, anaerobic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**:197-200.
111. **Jagals, P. y W.O.K. Grabow.** 1996. An evaluation of sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution of environmental water. *Water Sa.* **22**:235-238.
112. **Jensen, N.S. y E. Canale-Parola.** 1986. *Bacteroides pectinophilus* sp. nov. and *Bacteroides galacturonicus* sp. nov.: two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:880-887.
113. **Jiang, S.C., W. Chu, B.H. Olson, J.W. He, S. Choi, J. Zhang, J.Y. Lee y P.B. Gedalanga.** 2007. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:927-934.

114. **Jofre, J. y A.R. Blanch.** 2010. Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *J. Appl. Microbiol.* **109**:1853-1867.
115. **Jofre, J., J.R. Steward y W. Grabow.** 2011. Phage Methods. Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies; 137-156.
116. **Johnson, J.L., W.E.C. Moore y L.V.H. Moore.** 1986. *Bacteroides caccae* sp. nov., *Bacteroides merdae* sp. nov., and *Bacteroides stercoris* sp. nov. isolated from human feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:499-501.

-K-

117. **Kaufmann, P., A. Pfeiferkorn, M. Teuber y L. Meile.** 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1268-1273.
118. **Kellogg, D. E., J.J. Sninsky y S. Kwok.** 1990. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **189**:202-208.
119. **Kelty, C.A., M. Varma, M. Sivaganesan, R.A. Haugland y O.C. Shanks.** 2012. Distribution of genetic marker concentrations for fecal indicator bacteria in sewage and animal feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:4225-4232.
120. **Killer, J., J. Kopečný, J. Mrázek, V. Rada, O. Benada, I. Koppová, J. Havlík y J. Straka.** 2009. *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:2020-2024.
121. **Killer, J., J. Kopečný, J. Mrázek, I. Koppová, J. Havlík, O. Benada y T. Kott.** 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**:1315-1321.
122. **Kim, M.S., S.W. Roh y J.W. Bae.** 2010. *Bacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**:2572-2576.
123. **Kim, S.Y., J.E. Lee, S. Lee, H.T. Lee, H.G. Hur y G. Ko.** 2010. Characterization of *Enterococcus* spp. from human and animal feces using 16S rRNA sequences, the *esp* gene, and PFGE for microbial source tracking in Korea. *Environ. Sci. Technol.* **44**:3423-3428.
124. **King, E.L., D.S. Bachoon y K.W. Gates.** 2007. Rapid detection of human fecal contamination in estuarine environments by PCR targeting of *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Microbiol. Methods* **68**:76-81.

## 6. Bibliografía

---

125. **Kinross, J.M., A.W. Darzi y J.K. Nicholson.** 2011. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* **3**:14.
126. **Kirs, M. y D.C. Smith.** 2007. Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F+-specific RNA coliphages: a method for use in microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:808-814.
127. **Kitahara, M., M. Sakamoto, M. Ike, S. Sakata e Y. Benno.** 2005. *Bacteroides plebeius* sp. nov. and *Bacteroides coprocola* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:2143-2147.
128. **Kitahara, M., S. Tsuchida, K. Kawasumi, H. Amao, M. Sakamoto, Y. Benno y M. Ohkuma.** 2011. *Bacteroides chinchillae* sp. nov. and *Bacteroides rodentium* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**:877-881.
129. **Kitahara, M., M. Sakamoto, S. Tsuchida, K. Kawasumi, H. Amao, Y. Benno y M. Ohkuma.** 2012. *Bacteroides stercorisoris* sp. nov. and *Bacteroides faecichinchillae* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**:1145-1150.
130. **Koenig, J.E., A. Spor, N. Scalfone, A.D. Fricker, J. Stombaugh, R. Knight, L.T. Angenent y R.E. Ley.** 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **108**:4578-4585.
131. **Kok, R.G., A. de Waal, F. Schut, G.W. Welling, G. Weenk y K.J. Hellingwerf.** 1996. Specific detection and analysis of a probiotic Bifidobacterium strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3668-3672.
132. **Kortbaoui, R., A. Locas, M. Imbeau, P. Payment y R. Villemur.** 2009. Universal mitochondrial PCR combined with species-specific dot-blot assay as a source-tracking method of human, bovine, chicken, ovine, and porcine in fecal-contaminated surface water. *Water Res.* **43**:2002-2010.
133. **Kreder, C.A.** 1995. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1171-1179.
134. **Kühn, I., G. Allestam, T.A. Stenstrom y R. Möllby.** 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3171-3177.
135. **Kuntz, R.L., P.G. Hartel, K. Rodgers y W.I. Segars.** 2004. Presence of *Enterococcus faecalis* in broiler litter and wild bird feces for bacterial source tracking. *Water Res.* **38**:3558-3565.

## -L-

136. **Lan, P.T.M., M. Sakamoto, S. Sakata e Y. Benno.** 2006. *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:2853-2859.
137. **Lasobras, J., M. Muniesa, J. Frias, F. Lucena y J. Jofre.** 1997. Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. *Water Sci. Technol.* **35**:11-12.
138. **Leeming, R., A. Ball, N. Ashbolt y P. Nichols.** 1996. Using fecal sterols from humans and animals to distinguish fecal pollution in receiving waters. *Water Res.* **30**:2893-2900.
139. **Leeming, R. y P.D. Nichols.** 1996. Concentration of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. *Water Res.* **30**:2997-3006.
140. **Leser, T.D., J.Z. Amenuvor, T.K. Jensen, R.H. Lindecrona, M. Boyle y K. Moller.** 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revised. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:673-690.
141. **Ley, R.E., C.A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight y J.I. Gordon.** 2008. Worlds within words: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:776-788.
142. **Livingston, S.J., S.D. Kominos y R.B. Yee.** 1978. New medium for selection and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *J. Clin. Microbiol.* **7**:448-453.
143. **Love, D.N., J.L. Johnson, R.F. Jones, M. Bailey y A. Calverley.** 1986. *Bacteroides tectum* sp. nov. and characteristics of other non pigmented *Bacteroides* isolates from soft-tissue infections from cats and dogs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:123-128.
144. **Love, D.C. y M.D. Sobsey.** 2007. Simple and rapid F+ coliphage culture, latex agglutination, and typing assay to detect and source track fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4110-4118.
145. **Lu, J., J.W. Santo Domingo y O.C. Shanks.** 2007. Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach. *Water Res.* **41**:3561-3574.
146. **Lu, J., J.W. Santo Domingo, R. Lamendella, T.A. Edge y S. Hill.** 2008. Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3969-3976.
147. **Lu, J., J.W. Santo Domingo, S. Hill y T.A. Edge.** 2009. Microbial diversity and host-specific sequences of Canada goose feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:5919-5926.

## 6. Bibliografía

---

148. **Lynch, P.A., B.J. Gilpin, L.W. Sinton y M.G. Savill.** 2002. The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *J. Appl. Microbiol.* **92**:526-533.
149. **Lyznicki, J.M., E.L. Busch y D.J. Blazevic.** 1982. Medium for selective isolation and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *J. Clin. Microbiol.* **15**:123-129.
- M-
150. **Ma, L., L.K. Siu, J.C. Lin, T.L. Wu, C.P. Fung, J.T. Wang, P.L. Lu e Y.C. Chuang.** 2013. Updated molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* in Taiwan: first identification of KPC-2 or NDM-1-producing *E. coli* in Taiwan. *B.M.C. Infect. Dis.* **13**:599-606.
151. **MacDonald, I.A., V.D. Bokkenheuser, J. Winter, A.M. McLernon y E.H. Mosbach.** 1983. Degradation of fecal sterols in the human gut. *J. Lipid Res.* **24**:675-694.
152. **Macfarlane, G.T. y S. Macfarlane.** 1997. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol.* **222**:3-9.
153. **Mai, V.** 2004. Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr. Rev.* **62**:235-260.
154. **Mai, V. y J.G. Morris.** 2004. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J. Nutr.* **134**:459-464.
155. **Mara, D.D. y J.I. Oragui.** 1981. Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in feces, sewage and freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:1037-1042.
156. **Mara, D.D. y J.I. Oragui.** 1983. Sorbitol-fermenting *Bifidobacteria* as specific indicators of human faecal pollution. *J. Appl. Bacteriol.* **55**:349-357.
157. **Martellini, A., P. Payment y R. Villemur.** 2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res.* **39**:541-548.
158. **Masco, L., M. Ventura, R. Zink, G. Huys y J. Swings.** 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1137-1143.



159. **Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu y R. Tanaka.** 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5445-5451.
160. **McQuaig, S.M., T.M. Scott, V.J. Harwood, S.M. Farrah y J.O. Lukasik.** 2006. Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:7567-7574.
161. **Miyamoto, Y. y K. Itoh.** 2000. *Bacteroides acidifaciens* sp. nov., isolated from the caecum of mice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:145-148.
162. **Morita, H., A. Nakano, H. Onoda, H. Toh, K. Oshima, H. Takami, M. Murakami, S. Fukuda, T. Takizawa, T. Kuwahara, H. Ohno, S. Tanabe y M. Hattori.** 2011. *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy infant faeces. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**:2610-2615.
163. **Muniesa, M., F. Lucena, A.R. Blanch, A. Payan y J. Jofre.** 2012. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Res.* **46**:6410-6418.
164. **Muñoz, F.J. y R. Pares.** 1988. Selective médium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1715-1718.
165. **Murray, W.D., L.C. Sowden y J.R. Colvin.** 1984. *Bacteroides cellulosolvans* sp. nov., a cellulolytic species from sewage sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**:185-187.
166. **Mushi, D., D. Byamukama, A.K. Kivaisi, R.L. Mach y A.H. Farnleitner.** 2010. Sorbitol-fermenting Bifidobacteria are indicators of very recent human faecal pollution in streams and groundwater habitats in urban tropical lowlands. *J. Water Health* **8**:466-478.
167. **Muyzer, G., E.C. de Waal y A.G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16SrRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
168. **Muyzer, G. y K. Smalla.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**:127-141.
169. **Myers, R.M., S.G. Fischer, T. Maniatis y L.S. Lerman.** 1985a. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **13**:3111-3129.

## 6. Bibliografía

---

170. **Myers, R.M., S.G. Fischer, L.S. Lerman y T. Maniatis.** 1985b. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **13**:3131-3145.
171. **Myoda, S.P., C.A. Carson, J.J. Fuhrmann, B.K. Hahm, P.G. Hartel, H. Yampara-Lquise, L. Johnson, R.L. Kuntz, C.H. Nakatsu, M.J. Sadowsky y M. Samadpour.** 2003. Comparison of genotypic-based microbial source tracking methods requiring a host origin database. *J. Water. Health.* **1**:167-180.

-N-

172. **Nebra, Y. y A.R. Blanch.** 1999. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5173-5176.
173. **Nebra, Y., X. Bonjoch y A.R. Blanch.** 2003. Use of *Bifidobacterium dentium* as indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2651-2656.
174. **Nishiyama, T., A. Ueki, N. Kaku, K. Watanabe y K. Ueki.** 2009. *Bacteroides graminisolvens* sp. nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1901-1907.

-O-

175. **Okabe, S., N. Okayama, O. Savichtcheva y T. Ito.** 2007. Quantification of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**:890-901.
176. **Okabe, S. e Y. Shimazu.** 2007. Persistence of host-specific *Bacteroides-Prevotella* 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**:935-944.
177. **Okamoto, M., Y. Benno, K.P. Leung y N. Maeda.** 2008. *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:144-148.
178. **Oragui, J.I. y D.D. Mara.** 1983. Investigation of the survival characteristics of *Rhodococcus coprophilus* and certain fecal indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:356-360.
179. **Organización Mundial de la Salud.** 2006. Aspectos microbiológicos. **1**:105-126.
180. **Organización Mundial de la Salud.** 2008. Guías para la calidad del agua potable. Tercera ed.
181. **O'Riordan, K. y G.F. Fitzgerald.** 1997. Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**:259-264.

182. **Orskov, F. e I. Orskov.** 1981. *Enterobacteriaceae*, p. 340-352. In A. I. Broude (ed.), Medical microbiology and infectious diseases. W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.

-P-

183. **Pan, D. y Z. Yu.** 2013. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. Gut Microbes En prensa.
184. **Parveen, S., K. Portier, K. Robinson, L. Edmiston y M. Tamplin.** 1999. Discriminant analysis of ribotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. Appl. Environ. Microbiol. **65**:3142-3147.
185. **Payán, A., J. Ebdon, H. Taylor, C. Gantzer, J. Ottoson, G.T. Papageorgiou, A.R. Blanch, F. Lucena, J. Jofre y M. Muniesa.** 2005. Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. Appl. Environ. Microbiol. **71**:5659-5662.
186. **Payán, A.** 2006. Bacteriófagos como modelo en el origen de la contaminación fecal y en aguas regeneradas. Tesis doctoral. Barcelona, España.
187. **Petri, R.M., T. Schwaiger, G.B. Penner, K.A. Beauchemin, R.J. Forster, J.J. McKinnon y T.A. McAllister.** 2013. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. Appl. Environ. Microbiol. **79**:3744-3755.
188. **Poiger, T., J.A. Field, T.M. Field, H. Siegrist y W. Giger.** 1998. Behavior of fluorescent whitening agents during sewage treatment. Water Res. **32**:1939-1947.
189. **Puig, A., N. Queralt, J. Jofre y R. Araujo.** 1999. Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. Appl. Environ. Microbiol. **65**:1772-1776.

-Q-

190. **Queralt, N., J. Jofre, R. Araujo y M. Muniesa.** 2003. Homogeneity of the morphological groups of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* strain HSP40 and strain RYC2056. Curr. Microbiol. **46**:163-168.

-R-

191. **Reid, G.** 2004. When microbe meets human. Clin. Infect. Dis. **39**:827-830.
192. **Reischer, G.H., J.E. Ebdon, J.M. Bauer, N. Schuster, W. Ahmed, J. Åström, A.R. Blanch, G. Blöchl, D. Byamukama, T. Coakley, C. Ferguson, G. Goshu, G. Ko, A.M. de Roda Husman, D. Mushi, R. Poma, B. Pradhan, V. Rajal, M.A. Schade, R. Sommer, H. Taylor, E.M. Toth, V. Vrajmasu, S. Wuertz, R.L. Mach y A.H. Farnleitner.** 2013. Performance characteristics of qPCR assays targeting human- and

## 6. Bibliografía

---

- rumiant-associated *Bacteroidetes* for microbial source tracking across sixteen countries on six continents. *Environ. Sci. Technol.* **47**:8548-8556.
193. **Resnick, I.G. y M.A. Levin.** 1981. Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**:427-432.
194. **Ritter, L., K. Solomon, P. Sibley, K. Hall, P. Keen, G. Mattu y B. Linton.** 2002. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **65**:1-142.
195. **Robert, C., C. Chassard, P.A. Lawson y A. Bernalier-Donadille.** 2007. *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:1516-1520.
196. **Rowbotham, T.J. y T. Cross.** 1977a. *Rhodococcus coprophilus* sp. nov.: an aerobic nocardioform actinomycete belonging to the 'rhodochrous' complex. *J. Gen. Microbiol.* **100**:123-138.
197. **Rowbotham, T.J. y T. Cross.** 1977b. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *J. Gen. Microbiol.* **100**:231-240.
198. **Ryu, H., M. Henson, M. Elk, C. Toledo-Hernandez, J. Griffith, D. Blackwood, R. Noble, M. Gourmelon, S. Glassmeyer y L. Santo Domingo.** 2012. Development of quantitative PCR assays targeting 16S rRNA gene of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of *Enterococcus* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**:196-204.
- S-
199. **Sakamoto, M. e Y. Benno.** 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1599-1605.
200. **Sakamoto, M., M. Kitahara e Y. Benno.** 2007. *Parabacteroides johnsonii* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:293-296.
201. **Sakamoto, M. y M. Ohkuma.** 2013. *Bacteroides reticulotermis* sp. nov., isolated from the gut of a subterranean termite (*Reticulitermes speratus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**:691-695.

202. **Sánchez, D., L.A. Belanche y A.R. Blanch.** 2011. A software system for the microbial source tracking problem. JMLR Workshop and Conference Proceedings: 2nd Workshop on Applications of Pattern Analysis. **17**:56-62.
203. **Santo Domingo, J.W., D.G. Bambic, T.A. Edge y S. Wuertz.** 2007. Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. Water Res. **41**:3539-3552.
204. **Satokari, R.M., E.E. Vaughan, A.D. Akkermans, M. Saarela y W.M. de Vos.** 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. **67**:504-513.
205. **Savichtcheva, O. y S. Okabe.** 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. Water Res. **40**:2463-2476.
206. **Scardovi, V. y L.D. Trovatelli.** 1965. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. Ann. Micr. **15**:19-29.
207. **Schill, W.B. y M.V. Mathes.** 2008. Real-time PCR detection and quantification of nine potential sources of fecal contamination by analysis of mitochondrial cytochrome b targets. Environ. Sci. Technol. **42**:5229-5234.
208. **Scholten-Koerselman, I., F. Houwaard, P. Janssen y A.J.B. Zehnder.** 1986. *Bacteroides xylanolyticus* sp. nov., a xylanolytic bacterium from methane producing cattle manure. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. **52**:543-554.
209. **Scott, T.M., J.B. Rose, T.M. Jenkins, S.R. Farrah y J. Lukasik.** 2002. Microbial source tracking: current methodology and future directions. Appl. Environ. Microbiol. **68**:5796-5803.
210. **Scott, T.M., S. Parveen, K.M. Portier, J.B. Rose, M.L. Tamplin, S.R. Farrah, A. Koo y J. Lukasik.** 2003. Geographical Variation in Ribotype Profiles of *Escherichia coli* Isolates from Humans, Swine, Poultry, Beef, and Dairy Cattle in Florida. Appl. Environ. Microbiol. **69**:1089-1092.
211. **Scott, T.M., T.M. Jenkins, J. Lukasik y J.B. Rose.** 2005. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. Environ. Sci. Technol. **39**:283-287.
212. **Serra-Moreno, R., J. Jofre y M. Muniesa.** 2008. The CI repressors of shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of shiga toxin 2. J. Bacteriol. **190**:4722-4735.

## 6. Bibliografía

---

213. **Shanks, O.C., J.W. Domingo, J. Lu, C.A. Kelty y J.E. Graham.** 2007. Identification of bacterial DNA markers for the detection of human fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2416-2422.
214. **Shanks, O.C., C.A. Kelty, S. Archibeque, M. Jenkins, R.J. Newton y S.L. McLellan.** 2011. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:2992-3001.
215. **Simpson, J.M., J.W. Santo Domingo y D.J. Reasoner.** 2002. Microbial source tracking: state of the science. *Environ. Sci. Technol.* **36**:5279-5288.
216. **Simpson, P.J., R.P. Ross, G.F. Fitzgerald y C. Stanton.** 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:401-406.
217. **Sinton, J.W., R.K. Finlay y D.J. Hannah.** 1998. Distinguishing human from animal faecal contamination in water: a review. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* **32**:323-348.
218. **Smith, C.J., E.R. Rocha y B.J. Paster.** 2006. The medically important *Bacteroides* spp. in health and disease. *Prokaryotes* **7**:381-427.
219. **Sobsey, M.D., K.J. Schwab y T.R. Handzel.** 1990. A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male specific RNA coliphages. *J. Am. Water Works Assoc.* **82**:52-59.
220. **Sokolova, E., J. Astrom, T.J. Pettersson, O. Bergstedt y M. Hermansson.** 2012. Decay of *Bacteroidales* genetic markers in relation to traditional fecal indicators for water quality modeling of drinking water sources. *Environ. Sci. Technol.* **46**:892-900.
221. **Solo-Gabriele, H.M., M.A. Wolfert, T.R. Desmarais y C.J. Palmer.** 2000. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:230-237.
222. **Song, Y.L., C.X. Liu, M. McTeague y S.M. Finegold.** 2004. *Bacteroides nordii* sp. nov. and *Bacteroides salyersae* sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5565-5570.
223. **Song, Y.L., C.X. Liu, J. Lee, M. Bolanos, M.L. Vaisanen y S.M. Finegold.** 2005. *Bacteroides goldsteinii* sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4522-4527.
224. **Sonnenburg, E.D., L.T. Angenent y J.I. Gordon.** 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat. Immunol.* **5**:569-573.

225. **Stoeckel, D.M., M.V. Mathes, K.E. Hyer, C. Hagedorn, H. Kator, J. Lukasik, T.L. O'Brien, T.W. Fenger, M. Samadpour, K.M. Strickler y B.A. Wiggins.** 2004. Comparison of seven protocols to identify fecal contamination sources using *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.* **38**:6109-6117.
226. **Suau, A., R. Bonnet, M. Sutren, J.J. Godon, G.R. Gibson, M.D. Collins y J. Doré.** 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4799-4807.
227. **Summanen, P.H., E.J. Baron, D.M. Citron, C. Strong, H.M. Wexler y S.M. Finegold.** 1993. *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*.

-T-

228. **Tambalo, D.D., B. Fremaux, T. Boa y C.K. Yost.** 2012. Persistence of host-associated *Bacteroidales* gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed. *Water Res.* **46**:2891-2904.
229. **Tannock, G.W.** 1995. *Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
230. **Tartera, C. y J. Jofre.** 1987. Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1632-1637.
231. **Tartera, C., F. Lucena y J. Jofre.** 1989. Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2696-2701.
232. **Tartera, C., R. Araujo, R. Michel y J. Jofre.** 1992. Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting *Bacteroides fragilis* in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2670-2673.
233. **Toranzos, G.A., G.A. McFeters, J.J. Borrego y M. Savill.** 1996. Detection on microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. R.L. Crawford ed. *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press.
234. **Trovatelli, L.D., F. Crociani, M. Pedinotti y V. Scardovi.** 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Arch. Microbiol.* **98**:187-198.

-U-

235. **Ueki, A., K. Abe, N. Kaku, K. Watanabe y K. Ueki.** 2008. *Bacteroides propionicifaciens* sp. nov., isolated from rice-straw residue in a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:346-352.

## 6. Bibliografía

---

236. **Ueki, A., K. Abe, Y. Ohtaki, N. Kaku, K. Watanabe y K. Ueki.** 2011. *Bacteroides paurosaccharolyticus* sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**:448-453.
237. **USEPA.** 2004. Report to congress. Impacts and control of CSOs and SSOs. EPA 833-R-04-001. Washington, D.C., U.S.A.
238. **USEPA.** 2005a. Microbial source tracking. EPA/ORD Source Tracking Group. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio. April 2005.
239. **USEPA.** 2005b. Microbial source tracking guide document. EPA/600-R-05-064. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio. June 2005.
240. **USEPA.** 2011. Using Microbial Source Tracking to support TMDL development and implementation. U.S. Environmental Protection Agency, Region 10, Seattle, Washington. April 2011.
- V-
241. **Van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle y R.B. Wickner.** 2000. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh ICTV Report. San Diego, CA, USA: Academic Press.
242. **Veillon, A. y A. Zuber.** 1898. Recherches sur quelques microbes strictment anaérobies et leur role en pathologie. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.* **10**:517-545.
243. **Ventura, M., R. Reniero y R. Zink.** 2001. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2760-2765.
244. **Versalovic, J., M. Schneider, F.J. de Bruijn y J.R. Lupski.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**:25-40.
245. **Vesa, T.H., P. Marteau, S. Zidi, F. Briet, P. Pochart y J.C. Rambaud.** 1996. Digestion and tolerance of lactose from yoghurt and different semi-solid fermented diary products containing *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in lactose maldigesters: is bacterial lactase important? *Eur. J. Clin. Nutr.* **50**:730-733.
246. **Vijayavel, K., R. Fujioka, J. Ebdon y H. Taylor.** 2010. Isolation and characterization of *Bacteroides* host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. *Water Res.* **44**:3714-3724.



247. **Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman y M. Kuiper.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**:4407-4414.

-W-

248. **Watanabe, K., H. Makino, M. Sasamoto, Y. Kudo, J. Fujimoto y S. Demberel.** 2009. *Bifidobacterium mongoliense* sp. nov., from airag, a traditional fermented mare's milk product from Mongolia. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:1535-1540.
249. **Watanabe, Y., F. Nagai, M. Morotomi, H. Sakon y R. Tanaka.** 2010. *Bacteroides clarus* sp. nov., *Bacteroides fluxus* sp. nov. and *Bacteroides oleiciplenus* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**:1864-1869.
250. **Wei, S., M. Morrison y Z. Yu.** 2013. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poult. Sci.* **92**:671-683.
251. **Weigel, S., U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen y H. Huhnerfuss.** 2004. Determination of selected pharmaceutical and caffeine in sewage and sweater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* **56**:583-592.
252. **Wexler, H.M.** 2007. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**:593-621.
253. **Wheeler, A.L., P.G. Hartel, D.G. Godfrey, J.L. Hill y W.I. Segars.** 2002. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* **31**:1286-1293.
254. **Whitehead, T.R., M.A. Cotta, M.D. Collins, E. Falsen y P.A. Lawson.** 2005. *Bacteroides coprosuis* sp. nov., isolated from swine-manure storage pits. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:2515-2518.
255. **WHO.** 2008. The global burden of disease. 2004 update. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
256. **Wiggins, B.A.** 1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3997-4002.
257. **Wilson, M.R., J.A. DiZinno, D. Polanskey, J. Replogle y B. Budowle.** 1995. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int. J. Legal Med.* **108**:68-78.

-X-

## 6. Bibliografía

---

258. **Xu, J., M.K. Bjursell, J. Himrod, S. Deng, L.K. Carmichael, H.C. Chiang, L.V. Hooper y J.I. Gordon.** 2003. A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotamicron* symbiosis. *Science* **299**:2074-2076.

259. **Xu, J. y J.I. Gordon.** 2003. Honor of symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:10452-10459.

-Y-

260. **Yamamoto, T., M. Morotomi y R. Tanaka.** 1992. Species-specific oligonucleotides probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:4076-4079.

261. **Yates, M.V.** 2007. Classical indicators in the 21<sup>st</sup> century—far and beyond the coliform. *Water Environ. Res.* **79**:279-286.

-Z-

262. **Zhu, L., W. Li y X. Dong.** 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* base on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1619-1623.

263. **Ziemer, C.J.** 2013. Bacterial isolates from fiber enrichments of cow feces. *Appl. Environ. Microbiol.* En prensa.

264. **Zocco, M.A., M.E. Ainora, G. Gasbarrini y A. Gasbarrini.** 2007. *Bacteroides thetaiotaomicron* in the gut: molecular aspects of their interaction. *Dig. Liver Dis.* **39**:707-712.

265. **Zoetendal, E.G., C.T. Collier, S. Koike, R.I. Mackie y H.R. Gaskins.** 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J. Nutr.* **134**:465-472.

## 7. Anexos



## 7. Anexos

## 7.1. Medios de cultivo y soluciones

Medios utilizados para el cultivo de *Bacteroides* y la enumeración de bacteriófagos**BBE (Bacteroides Bile Esculin Agar)**

Bilis	20 g
TSA	40 g
Esculina	1 g
Citrato amónico férrico	0,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1 L
Hemina (solución stock)	10 ml
Gentamicina 40 mg/ml	2,5 ml

Mezclar todos los componentes excepto la hemina y la gentamicina y esterilizar al autoclave a 121±3°C durante 15 min. Una vez se haya enfriado el medio (unos 55°C) añadir la solución de hemina y la gentamicina. Finalmente ajustar el pH a 7,0 en condiciones de esterilidad.

**BPRM (Bacteroides Phage Recovery Medium)**

	<b>BPRMagar</b>	<b>BPRMb</b>	<b>BPRMss</b>
BPRM	29,42 g	29,42 g	29,42 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1 L	1 L	1 L
CaCl <sub>2</sub>	1 ml	1 ml	1 ml
	Dispensar en 100 ml		
Agar	15 g	---	0,76 g
	Disolver por agitación. Esterilizar 121°C 20 min.		
Hemina	10 ml	1 ml	1 ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	25 ml	2,5 ml	2,5 ml
Kanamicina 100mg/ml stock	---	100 µl	100 µl
Ác. Nalidíxico 25mg/ml stock	---	400 µl	400 µl
HCl	3,35 ml	335 µl	335 µl
pH	6,3 – 7,3	6,3 – 7,3	6,3 – 7,3

Mezclar el preparado de BPRM, el CaCl<sub>2</sub> y el agar y esterilizar al autoclave a 121±3°C durante 15 min. Una vez se haya enfriado el medio (unos 55°C) añadir el resto de componentes. Finalmente ajustar el pH a 6,8±0.5 en condiciones de esterilidad.

Soluciones complementarias para el cultivo de *Bacteroides*:

- Solución stock de hemina (1%):

## 7.1. Medios de cultivo y soluciones

Hemina	1 g
NaOH 1M	5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	100 ml

Disolver los elementos con la ayuda de un agitador magnético durante 30-60 min. Esterilizar por filtración mediante un filtro de tamaño de poro 0,22 µm. Guardar a temperatura ambiente no más de 6 meses.

- Solución stock de CaCl<sub>2</sub> (5%):

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	100 ml

Disolver los elementos y esterilizar por filtración mediante un filtro de tamaño de poro 0,22 µm. Guardar en oscuridad y a 4°C no más de 6 meses.

- Solución stock de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M):

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10,6 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	100 ml

Disolver los elementos y esterilizar por filtración mediante un filtro de tamaño de poro 0,22 µm. Guardar a temperatura ambiente no más de 6 meses.

### Medios utilizados para el cultivo de *E. coli* WG5 y la enumeración de SOMCPH:

#### **MSB (Modified Scholten's Broth)**

	<b>MSA</b>	<b>MSB</b>	<b>MSAss</b>
MSB	28 g	28 g	28 g
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1 L	1 L	1 L
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 15%	5 ml	5 ml	5 ml
MgCl <sub>2</sub> 1 M	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml
		Dispensar en 100 ml	
Agar	15 g	---	0,76 g
pH	7 – 7,4	7 – 7,4	7 – 7,4
	Disolver por agitación. Esterilizar 121°C 20 min.		
CaCl <sub>2</sub> 1 M	6 ml	---	0,6 ml

Mezclar todos los componentes excepto el CaCl<sub>2</sub> y esterilizar al autoclave a 121±3°C durante 15 min. Una vez se haya enfriado el medio (unos 55°C) añadir el resto de componentes. Finalmente ajustar el pH a 7,2±0.2 en condiciones de esterilidad.

### Soluciones complementarias para el cultivo de *E. coli* WG5:

- Solución stock de CaCl<sub>2</sub> (1M):

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14,6 g
--------------------------------------	--------

H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> 100 ml

Disolver los elementos y esterilizar por filtración mediante un filtro de tamaño de poro 0,22 µm. Guardar en oscuridad y a 4°C no más de 6 meses.

- Solución stock de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15%):

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 g

H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> 100 ml

Disolver los elementos y esterilizar por filtración mediante un filtro de tamaño de poro 0,22 µm. Guardar en oscuridad y a 4°C no más de 6 meses.

- Solución stock de MgCl<sub>2</sub> (1M):

MgCl<sub>2</sub> 4,27 g

H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> 100 ml

Disolver los elementos y esterilizar por autoclave a 121±3°C durante 15 min. Guardar a 4°C no más de 6 meses.

Medios utilizados para el cultivo de *Bifidobacterium*:

**CBA (Columbia Blood Agar)**

CBA 44 g

Glucosa 5 g

L-cisteína-HCl 0,5 g

H<sub>2</sub>O 1 L

Ácido Propiónico (99%) 5 ml

Mezclar todos los componentes excepto el ácido propiónico y esterilizar al autoclave a 121±3°C durante 15 min. Una vez se haya enfriado el medio (unos 55°C) añadir el resto de componentes. Finalmente ajustar el pH a 5,0 en condiciones de esterilidad.

**RCM (Reinforced Clostridium Medium)**

RCM 3 g

H<sub>2</sub>O 100 ml

Mezclar todos los componentes y esterilizar al autoclave a 121±3°C durante 15 min. Guardar a una temperatura entre 3 y 5°C durante un máximo de 30 días.

Soluciones utilizadas:

**PBS (Phosphate Buffered Saline)**

## 7.1. Medios de cultivo y soluciones

---

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1,52 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	1 L

Disolver por agitación y ajustar el pH entre 7,1 y 7,2. Esterilizar en la autoclave a 121±3°C durante 15 min.

### Tampón de fagos

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
NaCl	2,5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	500 ml
MgSO <sub>4</sub> 0,1 M	5 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	5 ml

Mezclar todos los componentes excepto el MgSO<sub>4</sub> y el CaCl<sub>2</sub> y esterilizar al autoclave a 121±3°C durante 15 min. Una vez se haya enfriado el medio (unos 55°C) añadir el resto de componentes.

### BSA (Bovine Serum Albumin) + sucrosa (crioprotector)

BSA	10 g
Sucrosa	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	100 ml

Disolver por agitación con ayuda de una mosca durante 1 h. Filtrar con filtros 0,22 µm y usar inmediatamente.



## 7.2. Métodos generales

### Aislamiento de cepas de *Bacteroides* (Payán y col. 2005):

- A partir de la muestra de agua residual realizar diluciones decimales seriadas y sembrarlas en placas de BBE agar.
- Incubar las placas a 37°C durante 20±4 h en condiciones de anaerobiosis.
- Seleccionar aquellas colonias que sean negras y/o que presenten un halo negro (Livingston 1978).
- Resembrarlas por duplicado en placas de BBE agar.
- Ambos duplicados se incuban a 37°C durante 20±4 h, pero uno en condiciones anaeróbicas y el otro en condiciones de aeróbicas.
- Seleccionar las colonias estrictamente anaeróbicas y realizar la tinción Gram.
- Seleccionar las colonias Gram negativas con morfología de bacilo.
- Sembrarlas en tubos de cristal con medio BPRM líquido (llenar los tubos completamente con el medio para generar un ambiente anaeróbico).
- Incubar los tubos a 37°C durante 20±4 h.
- Aquellas cepas que presenten un buen crecimiento se seleccionan para posteriores estudios de enumeración de fagos.

### Titulación de fagos de *Bacteroides* (ISO 10705-4 (2001)):

- Filtrar la muestra de estudio por filtros de 0,22 µm de baja adsorción proteica.
- Inocular la cepa en un tubo de vidrio con BPRM líquido. El tubo debe quedar lleno del medio de manera que no queden burbujas de aire y generar así la anaerobiosis. Incubar a 37°C en estático.
- Fundir, añadir los aditivos el BPRMss, dispensar 2,5 ml en tubos de 10 ml (hacer tantos tubos como sea necesario) y colocarlos en el baño previamente calentado a 45°C.
- Rotular las placas de BPRM agar y comprobar que están bien secas.
- Una vez el cultivo de la cepa se encuentre a una  $DO_{620nm}$  entre 0,3 y 0,5 proceder a la titulación.
- En cada tubo de 10 ml con los 2,5 ml de BPRMss añadir 1 ml de la muestra y 1 ml de la cepa. Agitar y verter sobre la placa de BPRM agar correspondiente. Repartirlo sobre toda la placa de manera homogénea y dejar enfriar sobre una superficie fría y llana.
- Realizar también un control de cepa (2,5 ml de BPRMss y 1 ml del cultivo), un control del BPRMss (2,5 ml de BPRMss) y, en caso de haber hecho diluciones, un control del PBS o Ringer ¼ (2,5 ml de BPRMss y 1 ml del medio de dispersión).

## 7.2. Métodos generales

---

- Una vez secas, colocar las placas en jarras de anaerobiosis (GasPaks™) con un generador de anaerobiosis (Anaerocult®) y una tira indicadora de anaerobiosis (Anaerotest®).
- Incubar a 37°C ON.
- Comprobar que se ha producido la anaerobiosis y contar el número de calvas (ufp/ml).

### **Titulación de SOMCPH (ISO 10705-2 (2000)):**

- Filtrar la muestra de estudio por filtros de 0,22 µm de baja adsorción proteica.
- Inocular la cepa E. coli WG5 en MSB. Incubar a 37°C en agitación.
- Fundir, añadir los aditivos el MSAss, dispensar 2,5 ml en tubos de 10 ml (hacer tantos tubos como sea necesario) y colocarlos en el baño previamente calentado a 45°C.
- Rotular las placas de MSA agar y comprobar que están bien secas.
- Una vez el cultivo de la cepa se encuentre a una DO<sub>600nm</sub> entre 0,3 y 0,5 proceder a la titulación.
- En cada tubo de 10 ml con los 2,5 ml de MSAss añadir 1 ml de la muestra y 1 ml de la cepa. Agitar y verter sobre la placa de MSA agar correspondiente. Repartirlo sobre toda la placa de manera homogénea y dejar enfriar sobre una superficie fría y llana.
- Realizar también un control de cepa (2,5 ml de MSAss y 1 ml del cultivo), un control del MSAss (2,5 ml de MSAss) y, en caso de haber hecho diluciones, un control del PBS o Ringer ¼ (2,5 ml de MSAss y 1 ml del medio de dispersión).
- Una vez secas, incubar a 37°C ON.
- Contar el número de calvas (ufp/ml).

### **Extracción de ADN de cepas de *Bifidobacterium* (Protocolo de Kellogg y col. 1990):**

- Coger 1 ml de un cultivo en RCM de 48 h y centrifugarlo a 14000 rpm durante 3 min.
- Hacer 2 lavados en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> estéril a 14000 rpm durante 3 min.
- Resuspender en:
  - o 0,2 ml de solución A (100 mM KCl, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl, pH 8,3).
  - o 0,2 ml de solución B (2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Tris-HCl, 1% Tween-20, Nonidet P40 1% pH 8,3).
  - o Añadir proteinasa K hasta una concentración de 120 µg/ml.
- Incubar a 55°C durante 1 h.
- Añadir 0,2 ml de matriz de InstaGene.

- Incubar a 55°C durante 15 min.
- Inactivar la proteinasa K mediante un choque térmico por ebullición: 100°C durante 8 min.
- Centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 3 min para acabar de eliminar los restos celulares y la matriz InstaGene.
- Guardar a -20°C.

Soluciones complementarias para la extracción del ADN de las cepas de *Bifidobacterium*:

- Solución A:

KCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
Tris-HCl	10 mM

Disolver por agitación y ajustar el pH a 8,0 con ácido acético glacial. Esterilizar 121°C 20 min.

- Solución B:

MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
Tris-HCl	10 mM
Tween-20	1%
Nonidet P	40%

Disolver por agitación y ajustar el pH a 8,0 con ácido acético glacial. Esterilizar 121°C 20 min.

**Protocolo amplificación y clonación en pGEM de un fragmento de ADN:**

**PCR convencional**

- Amplificación por PCR convencional el fragmento de interés.
- Observar el resultado mediante un gel de agarosa (pocillo grande, se cargan los 25µl).
- Recortar banda.
- Extracción y purificación de la banda (protocolo QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN).
- Electroforesis en gel de agarosa para comprobar que tenemos el ADN purificado.

**Clonación en el plásmido (pGEM)**

- Cultivo *over-night* (ON) (18h) de DH5α en 20 - 30 ml LB (DO<sub>600nm</sub>=0,5) a 37°C en agitación.
- Ponemos el cultivo en hielo durante 10 min, de este modo se para el crecimiento celular.
- Centrifugar el cultivo de 4 a 8 min a 3000 – 4000 rpm.

## 7.2. Métodos generales

---

- Descartar sobrenadante.

Siempre en hielo:

- Resuspender el pellet en 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> fría.
- Pasarlo a un tubo de 1,5 ml.
- Pulso de centrifuga.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> fría.
- Repetir el pulso de centrifuga y resuspender el pellet más de 5 veces.
- En la última resuspender el pellet en 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> fría.
- Añadir la mezcla de ligación (ver **Mezcla de ligación**).
- Pasarlo todo a una cubeta de electroporación.
- Electroporar.

Sin hielo:

- Tener preparado un tubo de 10 ml con 3 ml de LB.
- Sacar las células de la cubeta de electroporación y ponerlas en el tubo con los 3 ml de LB.

### **Mezcla de ligación**

- En tubo de PCR añadir:
  - o 5 µl 2x Ligation Buffer
  - o 1 µl pGEM
  - o 2 µl ADN purificado del gel de agarosa
  - o 1 µl ligasa
  - o 1 µl H<sub>2</sub>O
- Incubar la mezcla 1 h a temperatura ambiente.

### **Incubación de las células competentes con el plásmido (pGEM)**

- Incubar las células de 1 h a 1:30 h a 37°C en estático.
- Sembrar en placas de LB-Ampicilina<sub>100</sub> (por duplicado):
  - o 100 µl directamente
  - o 100 µl del concentrado de 500 µl (centrifugar 500 µl 5 min a 3000 rpm y sacar 400 µl del sobrenadante, resuspender y sembrar)
  - o 100 µl del concentrado de 1 ml (centrifugar 1 ml 5 min a 3000 rpm y sacar 900 µl del sobrenadante, resuspender y sembrar)
- Incubar durante 18 h a 37°C.

Al día siguiente:

- Repicar las colonias en placas de LB-Amp<sub>100</sub> haciendo estrías.
- Incubar durante 18 ha 37°C.

Al día siguiente:

- De algunas de las estrías hacer una PCR para comprobar que se ha incorporado el plásmido con el inserto:
  - o Cebadores: pGEMup – Fwd
  - o Cebadores: pGEMup – Rev
 De este modo sabemos en qué dirección se ha insertado.
- Observamos el resultado mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%).
- Secuenciación.

#### **Extracción y purificación del plásmido con el inserto**

- De las estrías que han incorporado el plásmido con el fragmento de ADN de interés se realiza el protocolo de extracción y purificación del plásmido con el inserto (protocolo HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit, Invitrogen).
- Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) para comprobar que ha salido correctamente.
- Cuantificar la cantidad de ADN purificado en el Nanodrop 1000 (ng/μl).

#### **Recta patrón (qPCR)**

- Realizar un banco de diluciones para tener el estándar.
- Hacer 7 réplicas en diferentes placas de qPCR para obtener la recta patrón.

#### **Cálculo de las CG/μl (copias genómicas por microlitro) de la reacción de qPCR:**

Para calcular el número de copias genómicas de cada stock preparado por cada gen se utilizó la siguiente ecuación:

$$CG/\mu l = \frac{\text{concentración de pGEM-T Easy::inserto (ng/\mu l)}}{\text{masa molecular (ng/mol)}} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}$$

#### **Gel DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (gel en paralelo): Realización y tinción:**

- Utilizar guantes durante todo el proceso.
- Lavar los vidrios, el peine y los plásticos espaciadores con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
- Montar los vidrios dentro de los cuales se formará el gel utilizando el soporte vertical del equipo de Dcode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, EUA).
- Montar la bomba peristáltica (Amersham Pharmacia Biotech) con la cubeta formadora de gradientes lineales (CBS Scientific Company, EUA) y el tubo que

## 7.2. Métodos generales

---

hace circular la acrilamida. Colocar el peine entre los vidrios y hacer una señal 1 cm más abajo. Retirar el peine. Poner el extremo del tubo que contiene una aguja entre los dos vidrios que sostendrán el gel. Conectar el otro extremo del tubo a las cubetas formadoras del gradiente sobre un agitador que permite que se mezcle las dos soluciones de acrilamida con diferente concentración de sustancias desnaturizantes.

- Preparación de las soluciones de acrilamida al 65% y al 40% (soluciones A y B):

Solución A	Solución B	Solución 0%
100 µl tampón de carga (5x GLB)		
10,6 ml stock 80%	6,5 ml stock 80%	
2,4 ml stock 0%	6,5 ml stock 0%	4 ml stock 0%
100 µl APS	100 µl APS	36 µl APS
10 µl TEMED	10 µl TEMED	3,6 µl TEMED

- Las soluciones se han de mantener en hielo para evitar que polimericen. Mezclarlas por agitación. El APS se añade justo antes de poner la acrilamida en la cubeta de formación del gradiente para evitar la polimerización.
- Se añaden 100 µl de tampón de carga (5x GLB) a la solución A para poder verificar visualmente la correcta formación del gel, ya que se podrá observar un gradiente de color.
- Verter la solución A en la cámara que sale primero de la cubeta formadora de geles de gradiente. Abrir el paso entre las dos cámaras de la cubeta de manera que se llene el conducto que las une y así evitar la formación de burbujas de aire entre las dos cámaras y cerrarlo de nuevo.
- Verter la solución B en la segunda cámara.
- Abrir el paso entre las dos cámaras y el de salida de la cubeta. Encender la bomba peristáltica con un flujo de 4 ml/min. un agitador en la cámara de la solución A permitirá que se vayan mezclando las dos soluciones. Vigilar que la aguja no toque el gel, si es necesario se ha de ir subiendo.
- Preparar la solución de acrilamida al 0% para formar una capa sobre el gel de gradiente y permitir la correcta formación de los pocillos.
- Cuando quede muy poco de las soluciones A y B juntarlas en la cámara de la solución A, cerrar el paso entre las dos cámaras y rellenar la cámara de la solución B con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Cuando el gel llegue a la señal retirar y descartar el exceso de mezcla de las soluciones A y B.
- En el momento en que se vacíe la cámara de la solución A, verter en ella la solución al 0%. Descartar las primeras gotas y volver a colocar la aguja entre los vidrios. Esperar a que se acabe de rellenar el gel, retirar la aguja, si es necesario

descartar el exceso de solución, y colocar el peine con mucho cuidado para evitar la formación de burbujas.

- Dejar polimerizar durante 2 h.
- Limpiar con abundante agua la cubeta formadora de gradiente y la bomba para evitar que queden restos de acrilamida polimerizada.
- Una hora antes de correr el gel de DGGE calentar el tampón TAE 1x de la cubeta de electroforesis hasta alcanzar los 60°C.
- Lavar con ayuda de una jeringuilla los pocillos del gel de DGGE con tampón TAE 1x.
- Colocar el gel dentro de la cubeta de electroforesis.
- Cargar las muestras de ADN y el marcador.
- Conectar la fuente y correr el gel durante 17 h a 85V y a una temperatura de 60°C.
- Una vez acabada la electroforesis, separar los vidrios con mucho cuidado para no romper el gel y recortar la parte superior en la que se encuentran los pocillos.
- Teñir el gel con 15 ml de tampón TNE 1x con 3 µl de SYBRGold utilizando una jeringuilla. Mantener el gel durante 45 min en oscuridad para permitir la tinción del ADN.
- Decantar el exceso de tinte y añadir 500 ml de TNE 1x para lavar el exceso de SYBRGold. Agitar con suavidad el vidrio dentro del TNE 1x para separar el gel del vidrio. Tocar el gel con los guantes muy mojados en tampón, de lo contrario se rompe con facilidad.
- Verter el exceso de TNE 1x una vez el gel se haya despegado del vidrio con mucho cuidado para que quede colocado sobre él.
- Cubrir el gel con un trozo de papel Whatman de la misma medida y adherir el gel. De este modo se podrá trasladar para ser analizado mediante un escáner, hacer una fotografía con el ImageMaster o cortar las bandas en un transiluminador de UV. Para despegar el gel del papel es necesario mojarlo con agua destilada.

**Recortar bandas de gel de DGGE y purificar el ADN:**

- Revelar y hacer foto del gel de DGGE (minimizar el tiempo de la foto en los UV).
- Poner la placa de vidrio azul sobre el transiluminador.
- Colocar encima el gel (en caso de moverlo siempre con papel Whatman y agua).
- Usar guantes y gafas naranjas, las cuales permiten ver la longitud de onda en la que se reflejan las bandas de ADN teñidas.
- Rotular según las bandas los tubos de PCR que sean necesarios.
- Con la ayuda de un cúter y unas pinzas limpias, recortar las bandas (limpiar a cada nuevo corte).

## 7.2. Métodos generales

---

- Una vez recortadas todas las bandas preparar un gel de agarosa al 1'5% de pocillos grandes. No verter toda la agarosa fundida en el molde, reservar 2-3 ml a 55°C para evitar que se solidifiquen.
- Una vez hecho el gel colocar con la ayuda de unas pinzas limpias cada banda recortada en un pocillo.
- Una vez colocadas todas cubrir los pocillos con la agarosa que se ha reservado.
- Introducir el gel en la cubeta de electroforesis y correr el gel a 130V durante 70 min.
- El ADN del gel se visualiza por tinción con bromuro de etidio unos 10 min.
- Colocar el gel de agarosa encima del transiluminador de luz UV para visualizar las bandas de ADN.
- Con la ayuda de un cúter limpio recortar las bandas y colocarlas en tubos de 1'5 ml.
- Purificar las bandas de ADN con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).
- A partir de los purificados correr un nuevo gel de agarosa al 1'5% para asegurarse de que la purificación ha salido correctamente.
- A partir del purificado realizamos una nueva amplificación por PCR.
- El amplificado se carga en un nuevo gel de agarosa al 1,5% (130V 70 min).
- El ADN del gel se visualiza por tinción en bromuro de etidio unos 10 min.
- Recortamos las bandas en el transiluminador y se purifican de nuevo con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

A partir de aquí se puede secuenciar las bandas, realizar nuevas amplificaciones, etc. Para conservar los purificados hay que guardarlos a -4°C.

### Soluciones y reactivos necesarios para la DGGE:

#### - TAE Buffer 20x:

Tris Base	96,8 g
Acético glacial	22,84 ml
EDTA 0,5M pH 8	40 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	1 L

Disolver por agitación. Esterilizar 121°C 20 min. Conservar a temperatura ambiente.

#### - TAE Buffer 1x:

Realizar una dilución 1/20 (v:v) a partir de la solución concentrada TAE 20x en H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>. Mezclar por agitación.



- TNE 10x:

Tris Base	12,1 g
EDTA-Na <sub>2</sub>	3,7 g
NaCl	54,8 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	1 L

Disolver por agitación. Ajustar el pH a 7,4. Esterilizar 121°C 20 min.

- TNE 1x:

Realizar una dilución 1/10 (v:v) a partir de la concentrada TNE 10x en H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>.

Mezclar por agitación.

- APS (10%):

Persulfato amónico	0,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	1 ml

Disolver por agitación. Conservar a -20±3°C.

- Tampón de carga:

Ficoll	2,5 g
Tris 1M pH 8	0,5 ml
EDTA 5mM	0,2 ml
20x SDS	0,5 ml
Azul de bromofenol 8%	0,25 ml
Xilen cianol 8%	0,25 ml

Enrasar con H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> hasta 20 ml. Disolver por agitación. Guardar a 4°C.

- Stocks de acrilamida:○ Acrilamida 0% desnaturalizante:

30% Acrilamida/Bis	66,66 ml
TAE Buffer 20x	12,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	Hasta 250 ml

Proteger el frasco de la luz. Guardar a 4°C.

○ Acrilamida 80% desnaturalizante:

30% Acrilamida/Bis	66,66 ml
TAE Buffer 20x	12,5 ml
Formamida	80 ml
Urea	84 g
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	Hasta 250 ml

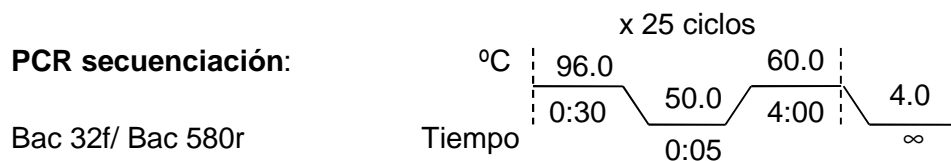
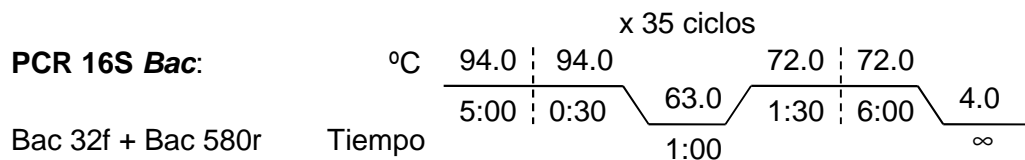
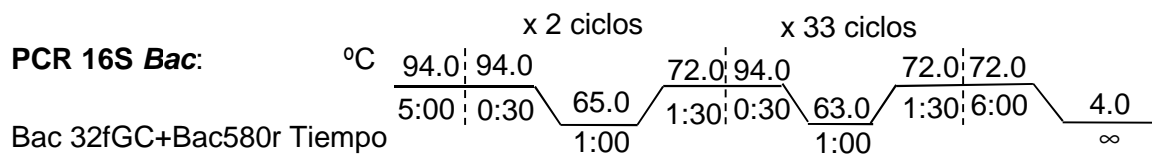
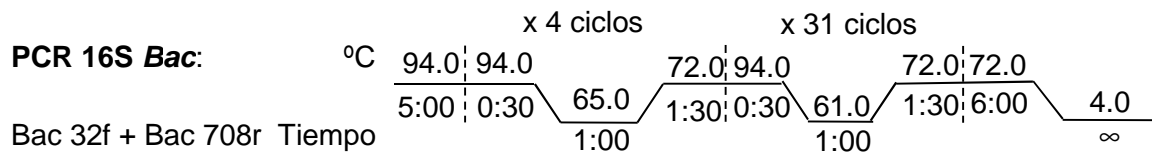
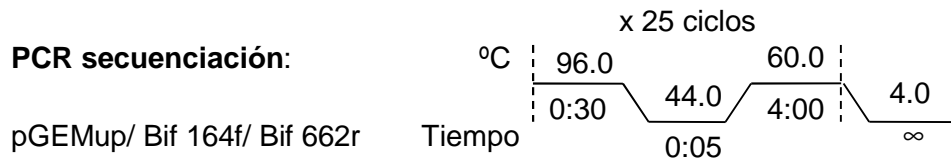
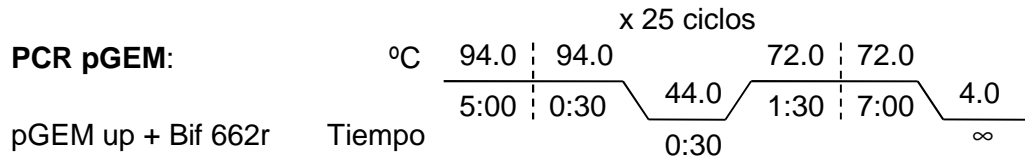
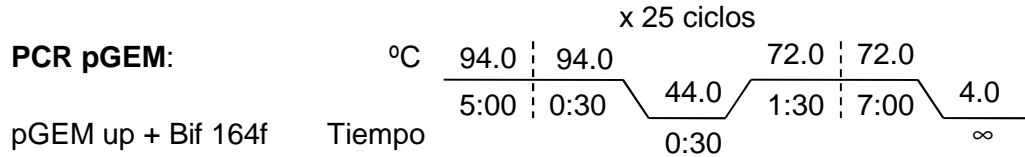
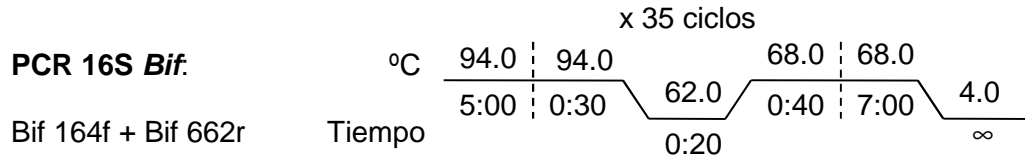
## 7.2. Métodos generales

---

Proteger el frasco de la luz. Disolver por agitación con ayuda de una mosca durante 30 min. Guardar a 4°C.

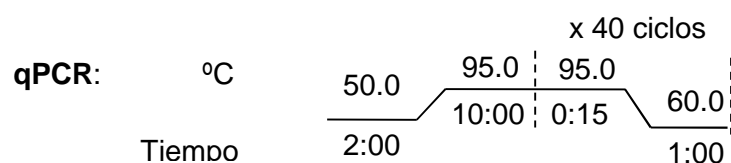
7.3. Programas de PCR y qPCR y listado de cebadores y sondas

Condiciones de PCR convencional



### 7.3. Programas de PCR y qPCR y listado de cebadores y sondas

#### Condiciones de qPCR



#### Listado de cebadores y sondas

Nombre	Secuencia 5'→3'	Referencia
Bif 164f	GGGTGGTAATGCCGGATG	Kok y col. 1996
Bif 662r	CCACCGTTACACCGGGAA	Kok y col. 1996
Bif F <sup>a</sup>	TTCGGGTTGTAAACCGCTTTT	Gómez-Doñate y col. 2012
Bif R <sup>a</sup>	TACGTATTACCGCGGCTGCT	Gómez-Doñate y col. 2012
pGEMup	TGTAATACGACTCACTAT	Serra-Moreno y col. 2008
HMprobe <sup>b</sup>	TCGGGGTGAGTGACCT	Gómez-Doñate y col. 2012
PLprobe <sup>b</sup>	GAGAGTGAGTGACCCGTT	Gómez-Doñate y col. 2012
PGprobe <sup>b</sup>	CGCAAGTGAGTGACCTT	Gómez-Doñate y col. 2012
CWprobe <sup>b</sup>	TTCGGCCGTGTTGAGT	Gómez-Doñate y col. 2012
32F	AACGCTAGCTACAGGCTT	Bernhard and Field 2000
708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG	Bernhard and Field 2000
32F-GC	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGG CGGGGGCACGGGGG- AACGCTAGCTACAGGCTT	Myers et al. 1985a, 1985b
580R	CGCTCCCTTTAAACCCAAT	Elaboración propia (artículo 4)
Bac-FW <sup>a</sup>	GGCGCACGGGTGAGTAAC	Elaboración propia (artículo 4)
Bac-Rev <sup>a</sup>	TGTGGGGGACCTTCCTCTC	Elaboración propia (artículo 4)
HMprobeBac <sup>b</sup>	GTGAGGGCATCTAATCA	Elaboración propia (artículo 4)
PLprobeBac <sup>b</sup>	TCCGCATGAAGGACTT	Elaboración propia (artículo 4)
PGprobeBac <sup>b</sup>	TATGATAGCATTAGAGTGTGACGAA	Elaboración propia (artículo 4)
CWprobeBac <sup>b</sup>	CTATGGGATGGGGATGC	Elaboración propia (artículo 4)

<sup>a</sup> La concentración de cada cebador por cada reacción de qPCR (20 µl) es de 900 nM.

<sup>b</sup> La concentración de cada sonda por cada reacción de qPCR (20 µl) es de 250 nM.

**7.4. Bacteriófagos y su utilización como indicadores de contaminación fecal vírica en aguas y alimentos**

---

**7.4. Bacteriófagos y su utilización como indicadores de contaminación fecal vírica en aguas y alimentos.**



# BACTERIÓFAGOS Y SU UTILIZACIÓN COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL VÍRICA EN AGUAS Y ALIMENTOS

## BACTERIOPHAGES AND THEIR USE AS VIRAL FECAL CONTAMINATION INDICATORS IN WATER AND FOOD SAMPLES

Marta Gómez Doñate y Maite Muniesa Pérez

*Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.  
Avda. Diagonal 643, 08028, Barcelona.  
mmuniesa@ub.edu*

### Resumen

---

La contaminación fecal de aguas y alimentos comporta un alto riesgo de transmisión de patógenos por ruta fecal-oral. Por ello es necesario el uso de indicadores capaces de determinar la presencia contaminación fecal en las muestras.

Los primeros microorganismos indicadores fecales propuestos fueron *Escherichia coli*, coliformes fecales y estreptococos fecales. Pero los indicadores bacterianos clásicos no son representativos de la presencia de virus patógenos de origen fecal. Por ello fue necesario introducir otro tipo de indicadores para virus, proponiéndose el uso de bacteriófagos. Los bacteriófagos son buenos indicadores de la presencia de virus patógenos, puesto que son de la misma naturaleza y responden de manera similar a los procesos de inactivación. Los bacteriófagos virulentos infectan y lisan a sus bacterias huésped produciendo calvas de lisis fácilmente identificables. Por el momento se han propuesto tres grupos de bacteriófagos: colifagos somáticos, fagos ARN F+ específicos y fagos que infectan a *Bacteroides* spp.

Además de detectar la contaminación fecal es importante conocer su origen a fin de poder remediarla. El uso de algunos bacteriófagos, como los fagos ARN F+ específicos o los fagos que infectan a ciertas cepas de *Bacteroides*, pueden ser usados para discriminar el origen (humano o animal) de la contaminación.

Los bacteriófagos representan, por tanto, una metodología rápida, sencilla y muy barata que permite detectar contaminación fecal y su origen y que representan una interesante propuesta como indicadores de virus de origen fecal.

## Abstract

---

Fecal contamination of water and food entails a high-risk of transmission of pathogens by fecal-oral route. Because of this reason, it is necessary the use of indicators that would be able to determine the presence of fecal contamination in the samples.

The first proposed fecal indicators microorganisms were *Escherichia coli*, fecal coliforms and fecal streptococci. However, classical bacterial indicators are not representative of the presence of pathogenic viruses from fecal origin. It was therefore necessary to introduce other indicators for viruses, as the bacteriophages. Bacteriophages are good viral indicators because they have the same nature and persist in a similar way to inactivation processes. Virulent bacteriophages infect and lyse their bacterial host and produce lytic plaques easy to identify. Three groups of bacteriophages have been proposed so far: somatic coliphages, F+ specific RNA phages and phages infecting *Bacteroides* spp.

In addition to the detection of fecal contamination, sometimes it is important to know the origin of this contamination in order to remediate it. Some bacteriophages, such as F+ specific RNA phages or phages infecting *Bacteroides* strains, can be used to determine the source (human or animal) of the fecal pollution.

Bacteriophages are a fast, simple and cheap methodology that allows the detection of fecal contamination and its origin, and they represent an interesting proposal to be used as indicators of viruses of fecal origin.

## 1. Introducción

---

La calidad de los alimentos y aguas de consumo así como de las aguas recreacionales son una prioridad para garantizar la seguridad de los consumidores. Desde el punto de vista microbiológico, el principal objetivo es garantizar que las aguas y los alimentos aptos para el consumo humano estén libres de contaminación fecal y minimizar así el riesgo de transmisión de patógenos por la ruta fecal-oral. Uno de los principales retos que se deben asumir en la gestión del agua y alimentos es evitar las contaminaciones de las fuentes de suministro y de los alimentos en el origen de la cadena de producción, pero también se ha de evitar que los productos se contaminen durante el procesamiento o, en el caso de las aguas, durante los procesos de distribución. Para conseguir dichos objetivos se precisa de mecanismos que permitan determinar los niveles de contaminación fecal de una muestra, así como discernir las fuentes que contribuyen mayoritariamente a su contaminación, con miras a elaborar estrategias para evitarla y de este modo mejorar y mantener la calidad y seguridad de los productos.

Dada la imposibilidad de analizar todos y cada uno de los patógenos existentes en una muestra, se propone el uso de organismos indicadores, entendidos como aquellos que si están presentes, indican la posible presencia simultánea de microorganismos patógenos ecológicamente relacionados. Así, por ejemplo, *Escherichia coli* ha venido utilizándose como índice de posible presencia de patógenos de procedencia entérica en el agua y los alimentos.

Actualmente la contaminación microbiológica del agua y los alimentos se valora estimando las concentraciones de indicadores fecales bacterianos como los coliformes fecales o *Escherichia coli*. La presencia de estos microorganismos se asocia con materia fecal de humanos y otros animales de sangre caliente y se utiliza para indicar la existencia potencial de patógenos entéricos que



podrían causar enfermedad en personas que se expongan a este agua o alimento (Dufour 1984). La contaminación fecal no sólo implica un riesgo potencialmente alto para la salud humana, sino que además, da lugar a pérdidas económicas significativas debido, por ejemplo, al cierre de áreas destinadas a la cosecha de mariscos, al descarte de lotes enteros de productos alimentarios o a la clausura de playas recreativas (Rabinovici y col. 2004).

Es importante, no obstante, no sólo determinar el nivel de contaminación de una muestra, sino determinar la fuente de la contaminación fecal a fin de poder corregir dicha contaminación desde el origen. El origen de la contaminación puede ser determinado usando métodos microbiológicos, genotípicos, fenotípicos y químicos, y ha dado origen al término "*microbial source tracking*" (Scott y col. 2002) o trazabilidad del origen fecal de los microbios. Aunque la intención de la determinación del origen de la contaminación fecal es una idea antigua, el término en sí se ha sido acuñado recientemente. Los primeros intentos de emplear microorganismos para determinar el origen de la contaminación en aguas utilizaban las concentraciones de coliformes fecales y estreptococos fecales para discriminar en un sentido general, el origen de la contaminación entre humano y categorías no humanas. Actualmente, es aceptado que esta aproximación no puede distinguir con precisión entre origen fecal humano o animal (America Public Health Association, 1995).

Un buen indicador debe presentar un comportamiento similar frente a diferentes tratamientos de inactivación aplicados en alimentos y aguas, por lo que su presencia o ausencia sirva para determinar si dicho tratamiento se ha aplicado de forma correcta y ha logrado el objetivo de eliminar el patógeno de la muestra. Los bacteriófagos (o fagos) cumplen con todos los requisitos necesarios para ser usados como indicadores de virus de origen fecal.

## 2. Bacteriófagos como indicadores

Los bacteriófagos constituyen el grupo más grande de todos los virus en cuanto se refiere al número que se ha descrito de ellos. Se estima el enorme número de  $10^{31}$  bacteriófagos en el planeta tierra. Se pueden encontrar bacteriófagos que infectan a huéspedes tanto del dominio Archaea y como del Bacteria (Ackermann y DuBow 1987). Muchos bacteriófagos se encuentran con mayor frecuencia insertos dentro del genoma de sus huéspedes bacterianos que en estado libre en el ambiente. Las descripciones de nuevos bacteriófagos generalmente incluyen fotografías al microscopio electrónico, siendo las revisiones periódicas de estas descripciones la base de la taxonomía de los bacteriófagos (Ackermann 2001).

Se ha demostrado ampliamente que los indicadores bacterianos no reflejan adecuadamente la presencia de patógenos no bacterianos en efluentes de aguas residuales desinfectadas debido a su alta susceptibilidad a factores inactivadores (Miesciery col. 1982; Katzenelson y col. 1974; Payment y col. 1993) y a que consistentemente fallan en correlacionarse con la presencia de parásitos no bacterianos como protozoos (Bonadonna y col. 2002) y con virus (Havelaar y col. 1993). Por eso es necesario incluir otros tipos de indicadores que se parezcan más a estos otros patógenos. Los bacteriófagos han sido propuestos como indicadores de contaminación fecal vírica (Grabow 2001; Jofre 2002). Se eligen estos microorganismos indicadores puesto que se ha visto que son más similares a los virus que a las bacterias en cuanto a resistencia a tratamientos de inactivación (Havelaar y col. 1993). Aunque la mayoría de los estudios que han utilizado bacteriófagos como indicadores se han llevado a cabo en aguas, éstos serían igualmente aplicables como indicadores de contaminación fecal en alimentos.

### 3. Determinación de bacteriófagos

La determinación de bacteriófagos como indicadores es muy sencilla y, sobretodo, barata. Para detectarlos se mezcla un cultivo de la cepa huésped susceptible a la infección por los bacteriófagos y crecida en su fase exponencial, con la muestra (1 ml) conteniendo los bacteriófagos que se quiere analizar y se mezcla con el medio de cultivo (2,5 ml) conteniendo un 0.7 % de agar (agar blando o semisólido) mantenido a 44°C para mantenerlo en estado líquido. La mezcla se deposita sobre una placa conteniendo el mismo medio de cultivo con una concentración del 1.4% de agar. Una vez depositada la mezcla fagos-bacteria-agar blando sobre esta placa, se deja solidificar por enfriamiento sobre una superficie. Las placas se incuban a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria. Si en la muestra hay bacteriófagos, estos se unirán a la bacteria huésped, la infectarán, propagarán y acabarán produciendo la lisis bacteriana. Después de una noche de incubación, se puede observar dicha lisis por la generación de una "calva de lisis" en la superficie del agar (Figura 1). Cada calva de lisis se considera una "unidad formadora de calva" o UFP y permite evaluar la cantidad de bacteriófagos en una determinada muestra en relación al volumen de dicha muestra que se haya analizado. Mayor número de bacteriófagos de origen fecal, indica un nivel más elevado de contaminación fecal en la muestra.

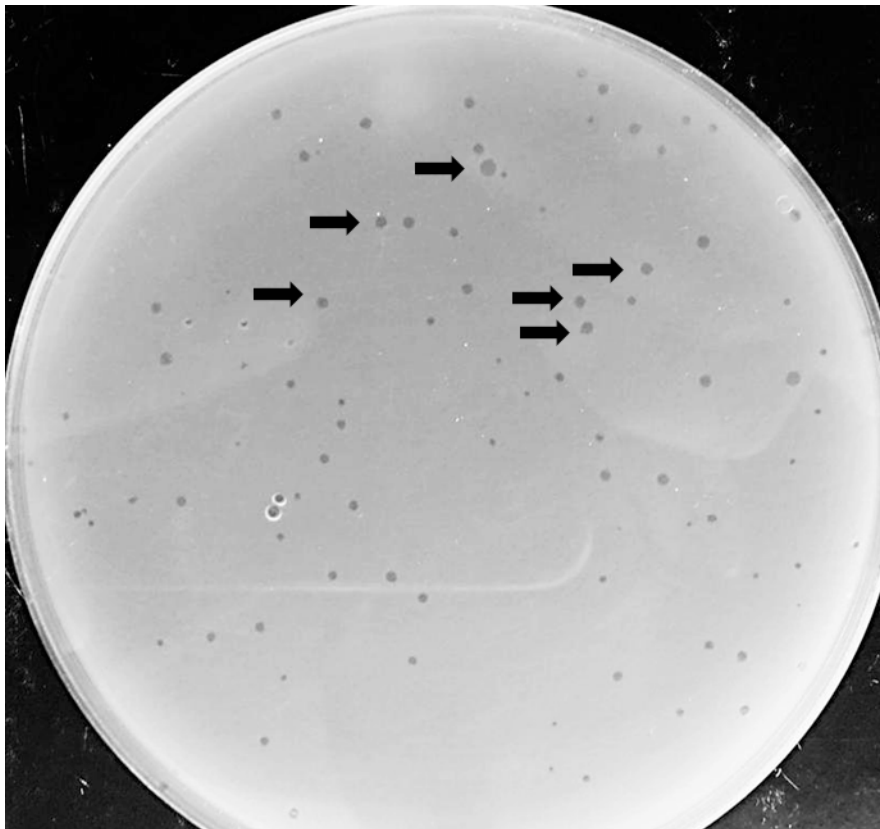


Figura 1.-Aspecto de calvas de lisis producidas por bacteriófagos líticos obtenidos de agua residual sobre la cepa GA17 de *Bacteroides fragilis*. Las flechas indican algunas de las calvas generadas.

Hasta el presente se han propuesto tres grupos de bacteriófagos como posibles indicadores de calidad microbiológica del agua: colifagos somáticos, fagos F+ específicos y bacteriófagos que infectan *Bacteroides* spp.

### 3.1. Colifagos somáticos

Los colifagos somáticos son virus que infectan y replican en bacterias coliformes uniéndose a receptores localizados en la pared celular. Este grupo incluye bacteriófagos diferentes. Son de ADN o ARN de acuerdo con la composición de su genoma.

Los colifagos somáticos han sido usados como indicadores de calidad en estuarios, agua de mar, agua dulce, agua potable, agua residual y biosólidos (Mocé y col. 2003), así como en alimentos (Hsu y col. 2002), en marisco (Muniain-Mujica y col. 2003) y en piensos animales (Maciorowski y col. 2001). También se han usado como indicadores de procesos de eficiencia de remoción de microorganismos en plantas de tratamiento de aguas (Bitton 1987; Gantzer y col. 1998). La determinación de colifagos somáticos es extremadamente fácil y la cepa huésped que se utiliza, *Escherichia coli*, es de fácil manejo en el laboratorio. El método por tanto supera a cualquier otro por su robustez.

Además, recientemente se están desarrollando métodos que puedan permitir la aplicación de este método en bajos tiempos de incubación. Dada la rapidez con la que *Escherichia coli* puede crecer, se pueden observar resultados a partir de las 4 horas, lo que supone una indudable ventaja del método. Hasta el momento no existe ningún otro indicador cultivable que permita la obtención de resultados en tan poco tiempo.

La limitación de los colifagos somáticos radica en el hecho que no sirven para determinar el origen de la contaminación. Pero presentan numerosas ventajas para la determinación del nivel de contaminación fecal y para la evaluación de la efectividad de los tratamientos de inactivación de microorganismos comúnmente aplicados en aguas y alimentos. Es el método de determinación de fagos más robusto de todos los propuestos.

### 3.2. Fagos ARN F+ específicos

Igual que los colifagos somáticos, se encuentran en elevada concentración en aguas residuales y además presentan una relativamente alta resistencia a la cloración (Havelaar y col. 1990; Nasser y col. 1993).

Una de las ventajas de este grupo es que su análisis puede ayudar a distinguir entre la contaminación fecal de origen humano y la contaminación fecal animal. Para ello es necesario hacer un tipado de los bacteriófagos presentes en las calvas de lisis para ver su correspondencia con uno de los cuatro subgrupos que conforman el grupo de ARN F+ específicos (Havelaar y col. 1990; Nasser y col. 1993; Hsu y col. 2002; Grabow y col. 2001; Griffin y col. 2000). Los estudios ecológicos han demostrado que los grupos I y IV están generalmente asociados con contaminación animal, mientras que los grupos II y III son más específicos de aguas residuales humanas (Schaper y col. 2002; Cole y col. 2003). Aunque hay excepciones a esta regla.

Si bien la determinación de estos fagos mediante el ensayo de calvas de lisis no presenta complicaciones, la tipificación de los subgrupos puede resultar algo más compleja, requiriendo técnicas moleculares o inmunológicas. La tipificación también supone un encarecimiento del proceso.

### 3.3. Fagos que infectan *Bacteroides* spp

Si bien la idea de considerar a los bacteriófagos que infectan bacterias anaerobias como

posibles indicadores de contaminación fecal vírica es antigua, la primera mención del uso de bacteriófagos que infectan *Bacteroides* spp como potenciales marcadores del origen de la contaminación fecal fue sugerida por Tartera y col. (Tartera y Jofre 1987; Tartera y col. 1989). Ellos mostraron que los bacteriófagos que infectaban determinadas cepas de *Bacteroides* no replicaban en el medio ambiente y que estaban presentes sólo en aguas residuales o contaminadas con materia fecal de origen exclusivamente humano. Algunas cepas de *Bacteroides* presentan limitaciones en su aplicación para la detección de bacteriófagos, puesto que se detectan en números menores que los grupos de bacteriófagos anteriormente citados. Más adelante se han encontrado nuevas cepas de *Bacteroides* (Puig y col. 1999) con capacidad de detectar mayores números de bacteriófagos en aguas con contaminación fecal. A pesar que la determinación de bacteriófagos de *Bacteroides* es esencialmente igual a la de los otros bacteriófagos, el manejo de cepas de *Bacteroides*, al ser una bacteria anaeróbica, complica algo el método y dificulta su implantación en laboratorios sin experiencia previa en el cultivo de bacterias anaeróbicas.

Este método demuestra una clara ventaja respecto a los anteriores, y es que usando la cepa huésped adecuada, por ejemplo humana, se detectan sólo bacteriófagos con origen fecal humano, con lo que el método es altamente específico para la determinación del origen de la contaminación fecal. Del mismo modo una cepa específica para un origen fecal animal, permite detectar bacteriófagos de ese origen, permitiendo además diferenciar entre diferentes grupos de animales (vacas, cerdos, pollos, etc) (Scott y col. 2002; Gómez-Doñate y col. 2011; Payan y col. 2005). Los bacteriófagos de *Bacteroides*, dada la naturaleza anaeróbica de la cepa, no pueden replicar en el medio ambiente y su presencia ha sido correlacionada de manera significativa con la presencia de enterovirus humanos (Jofre y col. 1989).

A pesar de todo, existe una variabilidad geográfica que es necesaria tener en cuenta. Así una cepa específica para contaminación fecal humana detecta bacteriófagos de origen fecal humano en el área geográfica Mediterránea y no detecta bacteriófagos de origen fecal animal, con lo que resulta una herramienta muy útil. Sin embargo la misma cepa no detecta ningún fago en EEUU. Es necesario entonces aislar una cepa específica para humanos que detecte bacteriófagos de origen fecal humano en EEUU. La aplicabilidad de los bacteriófagos de *Bacteroides* parece limitada a la zona geográfica, probablemente debida a la variabilidad de la microbiota intestinal de las diversas poblaciones en diferentes zonas geográficas (Blanch y col. 2006).

## 4. Persistencia de los bacteriófagos

Comparados con las bacterias y otros virus entéricos, los bacteriófagos muestran relativa resistencia a condiciones medioambientales adversas (Tartera y col. 1988). En todo caso, persisten mejor que las bacterias y de forma más parecida a otros virus, puesto que son de su misma naturaleza. Esta característica favorece su valor como modelos para predecir la presencia de virus en medios acuáticos y como modelos para predecir la supervivencia de virus entéricos en procesos de tratamiento y desinfección de aguas y alimentos.

Además se ha establecido que los bacteriófagos son más resistentes a procesos de inactivación natural que las bacterias (Sun y col. 1997; Muniesa y col. 1999). Entre los bacteriófagos, no todos los tipos morfológicos parecen persistir del mismo modo, aparentemente los bacteriófagos del grupo *Siphoviridae* presentan mayor persistencia ante procesos de inactivación que otros grupos

de bacteriófagos (Dee y Fogleman 1992; Muniesa 1999; Durán y col. 2002).

## 5. Otros aspectos de los bacteriófagos

Todos los bacteriófagos causan una infección de tipo lítica, es decir, tras la inyección de su ácido nucleico en el citoplasma celular tiene lugar su expresión y replicación, se ensamblan nuevas partículas víricas y se liberan al exterior mediante lisis bacteriana (Waldor y col. 2005). Existen bacteriófagos que únicamente son capaces de causar este tipo de infección. Estos bacteriófagos son conocidos como virulentos y son los que se describen en la sección anterior para ser usados como indicadores. Sus calvas de lisis son claras y fácilmente visibles y mantienen una relación del tipo depredador/presa con su huésped bacteriano. Por ello estos bacteriófagos son buenos indicadores, porque se encontrarán en los mismos nichos ecológicos que sus huéspedes bacterianos, y si las bacterias son de origen fecal, los bacteriófagos tendrán el mismo origen. Teniendo en cuenta este hecho, sumado a la elevada persistencia de los bacteriófagos en comparación con sus bacterias huésped, se comprende el interés de utilizarlos como indicadores de contaminación fecal.

Sin embargo, no todos los bacteriófagos sirven como indicadores ya que no todos tienen el mismo ciclo replicativo. Existe otro tipo de bacteriófagos que pueden realizar infecciones virulentas pero que también pueden permanecer como profagos (integrando su genoma en el cromosoma bacteriano). A estos bacteriófagos se les llama bacteriófagos atemperados o atenuados y el ciclo que llevan a cabo se denomina ciclo lisogénico. Durante la lisogenia el genoma del fago permanece de forma latente en el interior celular y se replica cada vez que la célula duplica su material genético para dividirse. El profago puede revertir al ciclo lítico, dependiendo de las condiciones intracelulares y del estrés ambiental. En estado de profago los genes del bacteriófago pasan a formar parte del genoma bacteriano y pueden ser expresados por la bacteria. En estos casos se habla de conversión lisogénica. La bacteria adquiere el gen del fago y este gen puede ser de muy distinta naturaleza.

Dada su relación con la patogenicidad de las bacterias, muchos estudios se han centrado en los genes de virulencia, como las toxinas. Este es el caso de los bacteriófagos que codifican para exotoxinas en gram positivos, incluyendo la toxina diftérica en *Corynebacterium diphtheriae* (Freeman 1951), Enterotoxina A, Exfoliatina A, staphylokinasa r Leukocidina en *Staphylococcus aureus* (Novick 2002), toxina estreptocócica eritrogénica (Johnson y col. 1986), o toxina estreptocócica pirogénica C (Goshorn y Schlievert 1989). En organismos gram negativos encontramos los genes de la toxina Shiga de *Escherichia coli*, la toxina citotóxica de *Pseudomonas aeruginosa*, (Hayashi y col. 1990); la toxina colérica en *Vibrio cholerae*, codificada en el genoma de un bacteriófago filamentoso (Waldor y Mekalanos 1996); la Cytolethal distending toxin (CDTs) que causan un bloque del ciclo replicativo de las células eucarióticas y que se encuentran diversos géneros bacterianos, como *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y, diversas especies de *Campylobacter* y *Helicobacter* (Jinadasa y col. 2011)

A pesar de que los mecanismos son variables, muchos de estos bacteriófagos incrementan la producción de la toxina por parte de las bacterias al activar su ciclo lítico (por ejemplo los bacteriófagos de la toxina Stx en *Escherichia coli*, lo que se traduce en un aumento de la virulencia de estas cepas. Estos fagos también producen calvas de lisis, pero éstas suelen ser turbias o poco visibles, puesto que estos bacteriófagos tienen la tendencia a insertar su genoma en la bacteria huésped más que a lisarla.



## Referencias

Ackermann, H.W. y DuBow, M.S. (1987). Viruses of prokaryotes, Vol. I: General properties of bacteriophages (pp. 13-47). Florida: CRC Press.

Ackermann, H.W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Archives of Virology. 146, 843-857.

American Public Health Association (1995). In: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC: American Public Health Association, Inc.

Bitton, G. (1987). Fate of bacteriophages in water and wastewater treatment plants. En Goyal, S.M., C.P. Gerba and G. Bitton (Eds.), Phage Ecology (pp. 181-195). New York: Wiley Interscience.

Blanch, A.R, 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, Skraber, S., Papageorgiou, G.T, Taylor, H., Wallis, J. y Jofre, J. (2006). Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. Applied and Environmental Microbiology. 72, 5915-5926.

Bonadonna, L, Briancesco, R, Ottaviani, M. y Veschetti, E. (2002). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. Environmental Monitoring and Assessment. 75, 241-252.

Cole, D., Long, S.C. y Sobsey, M.D. (2003). Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. Applied and Environmental Microbiology. 69, 6507-6514.

Dee, S.W. y Fogleman, J.C. (1992). Rates of inactivation of waterborne coliphages by monochloramine. Applied and Environmental Microbiology. 58, 3136-3141.

Dufour, A.P. (1984). EPA. Health effects criteria for fresh recreational waters. Office of Research and Development United States Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, North Carolina.

Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., y Jofre, J. (2002). Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. Journal of Applied Microbiology. 92, 338-347.

Freeman, V. (1951). Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. Journal of Bacteriology. 70, 3985-3993.

Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M. y Schwartzbrod, L. (1998). Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. Applied and Environmental Microbiology. 64, 4307-4312.

Gómez-Doñate, M., Payán, A., Cortés, I., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J. y Muniesa, M. (2011). Isolation of bacteriophage host strains of *Bacteroides* species suitable for tracking sources of

animal faecal pollution in water. *Environmental Microbiology*. 13, 1622-1631.

.....

Goshorn, S.C. y Schlievert, P.M. (1989). Bacteriophage association of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *Journal of Bacteriology*. 171, 3068-3073.

.....

Grabow, W.O.K. (2001). Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA*. 27, 251-268.

.....

Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M., Furuse, K., Pot, R. y Hormann, M.P. (1990). F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *Journal of Applied Microbiology*. 69, 30-37.

.....

Havelaar, A.H. (1993). Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *ASM News*. 59, 614-619.

.....

Hayashi, T., Baba, T., Matsumoto, H. y Terawaki, Y. (1990). Phage-conversion of cytotoxin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. 4, 1703-1709.

.....

Hsu, F.C., Shieh, Y.S. y Sobsey, M.D. (2002). Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *Journal of Food Protection*. 65, 93-99.

.....

Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S. y Duhamel, G.E. (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology*. 157, 1851-1875.

.....

Jofre, J., Blasi, M., Bosch, A. y Lucena, F. (1989). Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. *Water Science and Technology*. 21, 15-21.

.....

Jofre, J. (2002). Bacteriophage as indicators. In: *Encyclopaedia of Environmental Microbiology*. (ed. Bitton G). Willey and Sons (pp: 354-363). New York.

.....

Johnson, L.P., Tomai, M.A. y Schlievert, P.M. (1986). Bacteriophage involvement in group A streptococcal pyrogenic exotoxin A production. *Journal of Bacteriology*. 166, 623-627.

.....

Katzenelson, E., Lketter, B., Schechter H. y Shuval, H.I. (1974). Inactivation of viruses and bacteria by ozone. In A.J. Rubin (ed.), *Chemistry of water supply: treatment and distribution* (pp. 409-421). Ann Arbor, Mich: Ann Arbor Science.

.....

Maciorowski, K.G., Pillai, S.D. y Ricke, S.C. (2001). Presence of bacteriophages in animal feed as indicators of fecal contamination. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*. 36, 699-708.

.....

Miescier, J.J. y Cabelli, V.J. (1982). Enterococci and other microbial indicators in municipal wastewater effluents. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 54, 1599-1606.

.....

Mocé, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F. y Jofre, J. (2003). Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1452-1456.

Muniain-Mujica I., Calvo, M., Lucena F. y Girones, R. (2003). Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *International Journal of Food Microbiology*. 83, 75–85.

Muniesa, M., Lucena, F. y Jofre, J. (1999). Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *Journal of Applied Microbiology*. 87, 402–409.

Nasser, A.M., Tchorch, Y. y Fattal, B. (1993). Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewaters and groundwaters. *Water Science and Technology*. 27, 401–407.

Novick, R. (2002). Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *S. aureus*. *Plasmid*. 49, 93–105.

Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J. y Muniesa, M. (2005). Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 5659–5662.

Payment, P., Franco, E. y Siemiatycki, J. (1993). Absence of relationship between health effects due to tap water consumption and drinking water quality parameters. *Water Science and Technology*. 27, 137–143.

Puig, A., Queralt, N., Jofre, J. y Araujo, R. (1999). 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, 1772–1776.

Rabinovici, S.J.M., Berhknopf, R.L., Wein, A.M., Coursey D.L. y Whitman, R.L. (2004). Economic and health risk trade-offs of swim closures at a Lake Michigan Beach. *Environmental Science and Technology*. 38, 2737–2745.

Schaper, M., Jofre, J., Uys, M. y Grabow, W.O.K. (2002). Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 657–667.

Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R. y Lukasik, J. (2002). Microbial Source Tracking: Current methodology and future Directions. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 5796–5803.

Sun, Z.P., Levi, Y., Kiene, L., Dumoutier, M. y Lucena, F. (1997). Quantification of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in environmental water samples of Seine river. *Water, Air, and Soil Pollution*. 96, 175–183.

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

Tartera, C., Bosch A. y Jofre, J. (1988). The inactivation of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* by chlorine treatment and UV-irradiation. *FEMS Microbiololy Letters*. 56, 313–316.

Tartera, C., Lucena, F., y Jofre, J. (1989) Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages



present in the environment. *Appl Environ Microbiol.* 55, 2696-2701.

.....  
Waldor, M.K., y Mekalanos, J.J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 272, 1910-1914.

.....  
Waldor, M.K. y Friedman, D.I. (2005). Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology.* 8, 459-465.





