



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGIA
Ecología

**CUANTIFICACION DE INDICADORES MOLECULARES Y
ANALISIS MULTIVARIADO EN CUERPOS DE AGUA
INTERTROPICALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Luis José René Arredondo Hernández

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Marisa Mazari Hiriart
LANCIS, Instituto de Ecología. UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Facultad de Medicina UNAM

DR. Carlos Diaz Avalos
Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas

CIUDAD DE MÉXICO. mayo,2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGIA

Ecología

**CUANTIFICACION DE INDICADORES MOLECULARES Y
ANALISIS MULTIVARIADO EN CUERPOS DE AGUA
INTERTROPICALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIA

PRESENTA:

Luis José René Arredondo Hernández

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Marisa Mazari Hiriart
LANCIS, Instituto de Ecología. UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Facultad de Medicina UNAM

DR. Carlos Diaz Avalos

Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas

MÉXICO, D.F. mayo, 2017.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 27 de febrero de 2017., aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, del Posgrado en Ciencias Biológicas, del alumno **ARREDONDO HERNÁNDEZ LUIS JOSÉ RENÉ** con número de cuenta **95516541**, con la tesis titulada: **"CUANTIFICACIÓN DE INDICADORES MOLECULARES Y ANÁLISIS MULTIVARIADO EN CUERPOS DE AGUA INTERTROPICALES"**, bajo la dirección de la **DRA. MARISA MAZARI HIRIART**:

Presidente:	DRA. LUISA ISaura FALCÓN ÁLVAREZ
Vocal:	DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Secretario:	DR. CARLOS DÍAZ AVALOS
Suplente:	DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ
Suplente	DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., 12 de mayo de 2017

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM

A los proyectos CONACYT y DGAPA: IO110/ 193/10 CONACYT–DFG y CB83441, y DGAPA/PAPIIT IN215910and DGAPA/PAPIIT IG-200213 otorgados a la Dra. Marisa Mazari Hiriart.

Al proyecto CONACyT, C0009-2014-02-239182 otorgado a la Dra. Yolanda López Vidal.

Al proyecto CONACyT, SALUD2009-CO1112588 otorgado al Dr. Gonzalo Castillo Rojas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgar la beca número 34380 para cursar estudios de doctorado.

A la Dra. Marisa Mazari Hiriart, por su guía, pero sobre todo solidaridad en esta etapa.

A los miembros del comité tutor; Dr. Carlos Diaz Avalos y Dr. Gonzalo Castillo Rojas por sus comentarios y contribuciones que resultaron en este trabajo de tesis.

Agradecimientos a título personal

Al Instituto de Ecología. UNAM. por brindar todas las facilidades para el trabajo de campo, colección de muestras, análisis fisicoquímicos y bacteriológicos que aparecen en este trabajo de tesis.

A la Facultad de Medicina por brindar las facilidades para la estandarización y elaboración de ensayos de RT-qPCR y qPCR

A la Dra. Yolanda López Vidal por el ánimo infundido y confianza depositada durante el doctorado.

A mi jefe, el Dr. Samuel Ponce de León Rosales por permitirme alcanzar esta meta

A los Doctores:

Dr. Luis Alcaraz Peraza

Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal

Dr. Carlos Diaz Avalos

Dra. Luisa Falcón Álvarez

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez.

Por sus valiosos comentarios y aportaciones surgidas de la revisión de este documento.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Química, (Instituto de Ecología. UNAM), y del Programa de Inmunología Molecular Microbiana (Facultad de Medicina. UNAM), por su amistad a lo largo de esta etapa.

Índice.

	Página
1 Antecedentes	1
1.1 Definición del tema de Investigación	1
1.2 Peso de la enfermedad transmitida a través de agua	3
1.3 Virus entéricos; adenovirus	4
1.3.1 Adenovirus en el medio ambiente	5
1.3.2 Adenovirus como indicador	5
1.4 Fuentes de emisión de virus entéricos	6
1.5 Bacteriófagos FRNA	7
1.5.1 Evolución de los bacteriófagos FRNA	7
1.5.2 Genotipos del bacteriófago FRNA como indicadores	9
1.5.3 Genotipos del bacteriófago FRNA en el rastreo de fuentes	10
1.6 Variables fisicoquímicas	11
1.7 Fuentes de contaminación fecal e impacto urbano	12
1.8 Efectos de la entrada de efluentes residuales a cuerpos de agua	13
1.8.1 Efectos agudos de la entrada de efluentes residuales	13
1.9 Análisis estadísticos multivariados y calidad de agua	14
1.9.1 Análisis de Componentes Principales	14
1.9.2 Árboles de clasificación regresión	15
2 Hipótesis y Objetivos	17
3 Material y métodos	19
3.1 Diseño experimental	19
3.2 Características generales de áreas de muestreo	21
3.2.1 Chamela-Cuixmala	24
3.2.2 Río Magdalena	27
3.2.3 Xochimilco	29
3.2.4 El Valle del Mezquital	31
3.3 Análisis de parámetros fisicoquímicos	34
3.4 Colección y concentración de muestras	34

3.5	Análisis bacteriológicos	35
3.6	Características de las observaciones en puntos de muestreo	37
3.7	Métodos moleculares	40
3.7.1	Controles y curvas de qPCR de indicadores virales	40
3.7.2	Extracción de ácidos nucleicos	43
3.7.3	Transcripción reversa	43
	Cuantificación de genomas de Adenovirus Humano, Adenovirus	
3.8	41, y bacteriófagos FRNA genotipos I, II y III.	44
3.8.1	Mezcla de reacción	44
3.8.2	Condiciones de amplificación y mezcla de reacción	44
3.9	Métodos estadísticos	45
3.9.1	insumos	45
3.10	Análisis multivariados	45
4	Resultados	48
	Estandarización del método de cuantificación de genomas por	
4.1	qPCR.	48
4.2	Control de calidad de las reacciones de qPCR	48
	Depuración de la base de datos de calidad de agua del laboratorio	
4.3	de Ecología Química y selección de variables	49
4.4	Resultado de análisis estadísticos multivariados	52
4.4.1	Análisis de Componentes Principales y regresión "PLS"	52
4.4.2	Arboles de Clasificación-regresión	59
	Cuantificación de enterococos fecales e indicadores virales en	
4.5	agua	62
5	Discusión y Conclusiones	68
	Bibliografía	79
	Artículo publicado; Arredondo-Hernandez, Luis Jose Rene, et al. "FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems." <i>PloS one</i> 12.1 (2017): e0170399.	

Índice de tablas

	Pagina
Tabla	
1. Parámetros de control de calidad de la qPCR en la amplificación de indicadores virales	49

Índice de figuras

	Pagina
1 Diseño experimental	20
2 Diagrama. Análisis bacteriológicos	36
3 Título de enterococos y temperatura Clusters por disimilitud.	38
4 Conductividad y concentración de NH ₃ . Clusters por disimilitud	39
5 Estrategia para la construcción de controles de amplificación	41
6 Secuenciación de una sección de fragmento clonado	42
7 Depuración de bases de datos y calidad de agua	50
8 Concentración de oxígeno disuelto y NH ₃ en observaciones por percentil de enterococos fecales	51
9 Análisis de Componentes Principales	58
10 Árbol de decisión-regresión	61
11 Indicadores microbiológicos; Título de indicadores virales y enterococos fecales	64
12 Indicadores microbiológicos; Título de indicadores virales y virus entéricos	65

Índice de mapas

		pg
I	Localización de las áreas de muestreo en zona intertropical	22
II	Localización de las áreas de muestreo zona centro del país	23
III	Cuenca Chamela-Cuixmala. Puntos de muestreo	26
IV	Río Magdalena. Puntos de muestreo	28
V	Canales de Xochimilco. Puntos de muestreo	30
VII	Valle del Mezquital. Puntos de muestreo	33

Resumen

En países de ingresos medios y bajos, localizados en latitudes tropicales y subtropicales, la acelerada urbanización ha resultado en acceso inequitativo a servicio de drenaje y tratamiento de agua residual. En México, el mal manejo del agua residual no solo altera las funciones ecosistémicas, sino incrementa el riesgo de exposición a virus a través agua en actividades recreativas, por contacto o consumo. En tanto que, los indicadores bacterianos podrían carecer sensibilidad y especificidad para advertir de la mezcla de agua con contaminación fecal, pocos estudios han investigado indicadores moleculares para virus y otros patógenos emergentes respecto de indicadores bacteriano de contaminación fecal, a lo largo de una amplia gama de condiciones y perfiles de agua. Por tanto, el propósito de este estudio fue determinar las variables conductoras, explorar una clasificación que muestre los paralelismos entre enterococos fecales en muestras ambientales, y determinar si, genotipos de bacteriófagos de la familia *Leviviridae*, bacteriófagos F- específicos (bacteriófagos FRNA) tienen capacidades como indicador viral en muestras colectadas de sistemas acuáticos diversos. Los resultados soportan la viabilidad de caracterizar la contaminación, y discernir adecuadamente grupos de calidad de agua. Más aún, la amplificación por RT-qPCR y análisis, mostraron que los bacteriófagos FRNA son útiles como indicadores virales y para determinar el origen humano.

Abstract

In low and middle income countries at tropical and subtropical latitudes, an accelerated urbanization has resulted in uneven drainage and inadequate wastewater treatment. In Mexico, mishandled wastewater, not only disturbs ecosystem functions, but enhances the risk of exposure to viruses via contact, recreational or source water. Whereas bacterial indicators might lack sensitivity and specific to advice of water mixture with fecal pollution, few studies have investigated molecular indicators for viruses and other emerging pathogens with respect to the bacterial index of fecal pollution across a wide range of water profile conditions. Therefore, the aims of the present study were to assess driving variables, to explore triage classification parallels of fecal enterococci colony forming units (logFE) in environmental water samples and to determine if *Leviviridae*, F-receptor specific bacteriophages (FRNA bacteriophage) genotypes capabilities as virus indicators in samples from various aquatic systems. The results support the feasibility of characterizing pollution, and accurately discern water quality groups. Furthermore, RT-qPCR amplification and analysis showed that FRNA bacteriophages are useful as fecal and viral indicators, and to address human source.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Definición del tema de investigación

El agua, fundamental para la vida, sostén del funcionamiento de los ecosistemas y el progreso humano. Es, además, un riesgo ambiental, debido a la exposición a patógenos; siempre que estos se encuentren en el agua potable, o no sean eliminados del agua residual.

A pesar de que del año 2000 al año 2016, se redujera por la mitad el número de personas con acceso a agua limpia, cumpliendo esta meta del milenio, información del Instituto para la Medición y Evaluación de la Salud (IHME), el grupo de Yale, sugieren que este avance, solo refleja al crecimiento de los sistemas de distribución de agua intubada, por la urbanización y advierte que en una proporción significativa del agua que transporta no es tratada. Por otra parte 86% del agua residual es vertida al ambiente sin tratamiento (A. Hsu et al., 2016).

En tanto, evitar niveles de exposición capaces de causar enfermedad, y los posibles efectos ecológicos resultantes de procesos de eutrofización y acidificación continúan siendo una prioridad, es claro que identificar las fuentes para conocer los riesgos específicos y proveer niveles de referencia de calidad de agua solo será posible con indicadores sensibles y específicos (Yates, 2007).

El uso de indicadores limitados en sensibilidad o especificidad. En tan solo 60% de los brotes de gastroenteritis, en los que se cuenta con información de la calidad del agua previa y durante el brote, es posible aislar coliformes fecales. Esta falta de concordancia, es atribuible a la mayor resistencia de virus entéricos -como adenovirus y norovirus entre otros-, al tratamiento del agua, en comparación de los indicadores bacterianos. Aunado a las bajas dosis infectivas requeridas (Bonifait *et al.*, 2015), una mayor sobrevivencia, en cuerpos de agua naturales puede ser una de las causas, del porque hoy día, virus y parásitos son los agentes que más comúnmente causan brotes, asociados al agua.

Por otra parte, se desconocen los costos que la habituación de indicadores bacterianos a sistemas acuáticos pueda generar, en países tropicales como el nuestro. Dada la ventaja que en cuanto a protección reporta la detección de indicadores, respecto de la detección de patógenos en particular, se ha planteado como una alternativa, el uso de indicadores moleculares de virus y bacteriófagos del mismo origen, más resistentes a los factores ambientales e incapaces de multiplicarse en cuerpos de agua, -y por tanto específicos de agua residual de origen municipal- son una de las alternativas de solución que se han propuesto a la baja sensibilidad y falta de correlación entre virus entéricos e indicadores bacterianos como *Escherichia coli* en aguas naturales.

Por otra parte, un conocimiento preciso de los cambios en la calidad fisicoquímica del agua en relación al título de indicadores de contaminación fecal, podría dar pistas sobre el origen y orientar la elaboración de planes de monitoreo. No olvidemos que, por ejemplo, que el mayor brote debido a *Cryptosporidium spp*, afectando a 403,000 personas en Milwaukee, se acompañó de un aumento de la turbidez del agua (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Al igual que este brote, estadísticamente, la mayor parte de los brotes de infecciones gastrointestinales en Estados Unidos tienen lugar tras eventos de lluvia intensa (Curriero, Patz, Rose, & Lele, 2001).

El uso de métodos de clasificación multivariada, que tiene como fin condensar información puede ayudar a interpretar los datos existentes sobre la mezcla de agua de diferente calidad. En este sentido, una mejor clasificación de la calidad del agua,

conduce a una correcta asignación de volúmenes a usos particulares y/o tratamientos específicos. Por otro lado, los mismos métodos de clasificación multivariada, como los árboles de clasificación regresión, cobran relevancia en la predicción de nichos y refugio de patógenos una vez excretados a cuerpos de agua.

1.2 Peso de la enfermedad transmitida a través de agua.

Se estima que las muertes debidas a diarrea en todo el mundo, suman hasta 2.19 millones al año; ocurren mayoritariamente en menores de cinco años y principalmente en Asia y en África (Boschi-Pinto, Velebit, & Shibuya, 2008)(, hasta el 80% de los casos, son resultado del consumo de agua de baja calidad. En América Latina, con menores tasas de crecimiento poblacional y una urbanización acelerada (Martine & Alex Marshall, 2007), el peso de la enfermedad es menor, sin embargo, aun en un país de ingresos medios como México, donde la media nacional de muerte en niños menores de cinco años es de 0.17 por cada 1,000 niños, existen grandes disparidades en la distribución de casos. En áreas marginadas de algunos municipios de los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Noreste de Puebla, y áreas montañosas de Durango, Chihuahua y Nayarit, la probabilidad que tiene un niño menor de cinco años de morir aumenta, registrándose tasas superiores a 2 muertes por cada 1,000 niños. Considerando la exposición al agua de baja calidad como un riesgo ambiental históricamente importante, y a pesar de que su efecto en la mortalidad infantil se halla limitado por medio de la rehidratación oral, otros efectos, como los vinculados al desarrollo probablemente no (Stevens *et al.*, 2008)..

En áreas marginadas de México, tan solo el 31% de muestras de agua podrían mantener una calidad microbiológica aceptable (Sánchez-Pérez, Vargas-Morales, & Méndez-Sánchez, 2000), sin embargo, el problema no es del todo exclusivo de áreas marginadas y hasta el 46% de las muestras de agua tomadas en el sistema de distribución en dos ciudades de tamaño medio del noroeste del mismo país tienen indicios de re-contaminación en la red incluyendo 3% de muestras positivas

para *Escherichia coli* por el método de filtración por membrana (Chaidez, Soto, Martínez, & Keswick, 2008).

No es de extrañar la presencia de indicadores fecales y la probable exposición a patógenos entéricos a través del agua, si se consideran la carencia de un sistema de alcantarillado que para el año 2009 alcanzaba una cobertura del 86% en áreas urbanas, pero de solo el 63% en las rurales (Comisión Nacional del Agua, 2012). Con infraestructura para tratar solo el 32% del agua residual captada, en su mayor parte de origen municipal, y un volumen tres veces mayor proveniente de actividades agropecuarias (Jiménez *et al.*, 2010), las oportunidades de contaminación a partir de agua residual y/o agua rica en nutrientes son numerosas. Ciertamente, la probabilidad de exposición podría aumentar debido a una serie de deficiencias en la operación de los sistemas de distribución de agua - fallas en desinfección, nivel de desinfección residual, baja presión en la tubería, servicio intermitente, comunes a países en desarrollo (Lee & Schwab, 2005), que tienen como finalidad proteger el caudal de contaminación.

1.3 Virus entéricos y adenovirus.

En tanto que, por lo menos un agente viral es encontrado en el 43% de las muestras de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, resulta evidente que una proporción significativa de las diarreas en niños, es atribuible a la infección por virus entéricos. Globalmente, se estima que la diarrea ocasiona 1.87 millones de muertes en niños menores de cinco años, la mayor parte, 1.46 millones tienen lugar en países de África y el sureste de Asia. Rotavirus A, es el agente causal de diarrea más frecuentemente aislado en niños menores de cinco años (Ramani & Kang, 2009) y fue responsable de al menos 475,000 y hasta 580,000 muertes anuales previo al desarrollo y aplicación de una vacuna (Parashar *et al.*, 2009).

La partícula viral que posee dos proteínas de cápside (Vp4 y Vp7), son los principales antígenos que dan lugar a la clasificación en subtipos (Staat *et al.*, 2011). El genoma

de RNA segmentado de doble cadena es más estable y resistente a la luz ultravioleta en el ambiente y a otros procesos de tratamiento de agua. (Gerba, Rose, Haas, & K, 1996). Adenovirus, es un virus icosaédrico portador de un genoma de DNA de doble cadena, es la segunda causa de gastroenteritis viral, después de rotavirus. Algunas estimaciones indican que es responsable de entre el 5 y hasta el 20% de las hospitalizaciones debidas a diarrea en países en desarrollo, afecciones respiratorias y una causa común de brotes de conjuntivitis transmitida a través de agua. Como los 51 genotipos descritos son excretados en heces y no solo los entéricos- genotipos 40 y 41 (Reynolds, Mena, & Gerba, 2008), se ha asociado la exposición a través de actividades recreativas, e incluso sin contacto directo, con un riesgo incrementado de transmisión.

1.3.1 Adenovirus en el medio ambiente.

Los virus entéricos humanos - más de 140 géneros - pueden permanecer estables en el agua por largos periodos de tiempo e infectar al huésped aun a dosis bajas de entre 1 y 10 partículas virales infectivas (Sibanda & Okoh, 2012), pero son excretado en grandes números en las heces humanas (hasta 10^{11} partículas virales por gramo). Incluso en agua que solo está marginalmente contaminada y que cumple con los requerimientos de calidad puede ser fuente de brotes de enfermedad o contener virus entéricos (Rose, Zhou, Griffin, & Paul, 1997; Sinclair, Jones, & Gerba, 2009), de modo que Adenovirus es la causa más comúnmente reportada de brotes asociados a virus en albercas y en los últimos 20 años es el que más ha contribuido a la morbilidad con 1648 casos.

1.3.2 Adenovirus como indicadores.

Los Adenovirus Humanos son detectables en el agua residual cruda con mayor frecuencia que cualquier otro virus entérico (Pina, Puig, Lucena, Jofre, & Girones, 1998), en agua tratada, y en el suministro de agua para uso y consumo humano en todo el mundo, los adenovirus humanos han sido detectados en agua residual cruda y tratada en títulos de 10^4 a 10^9 y de 10^2 - 10^7 virus por litro respectivamente (Simmons

& Xagorarakis, 2011), por lo que han sido propuestos como un indicador útil para la indicación de contaminación viral en ambientes acuáticos.

Los Adenovirus tipo F, están fuertemente asociados a aguas dominadas por efluentes y otras fuentes puntuales de contaminación fecal humana, entre tanto que los enterovirus no, indicando que los adenovirus cuantificados por PCR son mejores blancos que los enterovirus para detectar descargas de agua residual a aguas superficiales, dado que es detectado con mayor frecuencia y en promedio, en mayor concentración en sistemas dominados por efluentes cuando se compara con otras localizaciones de muestreo (Aslan, Xagorarakis, Simmons, Rose, & Dorevitch, 2011).

1.4 Fuentes de emisión de virus entéricos

En tanto los costos globales de la contaminación del agua, podrían alcanzar el 8% del PIB como ocurriera en China, hace 20 años. Hoy día es posible modelar las emisiones de patógenos al agua superficial para generar análisis de riesgo y/o elaborar estrategias de manejo. De este modo se ha calculado que el 87% de las 2×10^{18} partículas virales de rotavirus al año que son emitidas a cuerpos de agua provienen de áreas urbanas (Nicholas M Kiulia *et al.*, 2015). Tres factores son determinantes del valor de emisión en un área de 0.5 X 0.5 grados; el tamaño de la población, el tipo de sistema sanitario y el tratamiento del agua residual (Kiulia *et al.*, 2015; Kroeze *et al.*, 2016). Para darnos una idea, del peso de un tratamiento de agua efectivo, Hofstra & Vermeulen, 2016 mostraron en su modelo de emisión para *Cryptosporidium* que una mejora significativa de saneamiento y tratamiento de agua representaría una reducción del total de emisiones de oocistos del 24% anual hacia el año 2050 en un escenario donde el crecimiento poblacional es limitado, la urbanización grande, o un aumento del 70% si el tratamiento de agua residual permanece como hasta el año 2010.

Sobre el número de partículas virales que estarían siendo emitidas, esto depende el virus y tipo de tratamiento, además de que se ha descrito una gran variabilidad en el

número de genomas por litro en el influente de plantas de tratamiento pequeñas y medianas respecto de las que sirven a más de 130,000 personas en Nueva Zelanda (Hewitt, Leonard, Greening, & Lewis, 2011). En un estudio que involucró dos plantas de tratamiento en la región de monastir en Túnez, en donde en poco más 72% de las muestras se detectó y cuantificó rotavirus grupo A con una carga viral similar en el influente crudo que en el agua tratada (Hassine-Zaafrane *et al.*, 2015).

Aun en países desarrollados como en los Estados Unidos, los virus entéricos son introducidos diariamente al medio ambiente a través de las descargas de agua residual proveniente de plantas de tratamiento, debido a que los procesos de tratamiento de agua residual, tales como las lagunas de oxidación, carbón activado, filtración o cloración, únicamente eliminan entre el 50 y 90% de los virus presentes en el agua (Okoh, Sibanda, & Gusha, 2010).

Lo anterior significa que, considerando un grado de remoción de virus infecciosos de entre 1.9 y 5 unidades logarítmicas, (en promedio 4.2 unidades logarítmicas) en efluentes finales, se descargan en las mejores condiciones 1.6×10^1 virus por 100 L (Simmons & Xagorarakis, 2011). En la revisión que hace Reynolds *et al.*, (2008) sobre el riesgo de transmisión de virus entéricos, basado en datos de infectividad y número de adenovirus detectados en agua con calidad para diferentes usos a partir de estudios publicados en la literatura, señala; la necesidad de tratamiento adicional cuando se encuentra entre 1.6 y 2.11 número más probable de virus por 100 L.

1.5 Bacteriófagos FRNA

1.5.1 Evolución de los bacteriófagos FRNA

A pesar de que la última década del siglo pasado, la falta de conocimiento sobre la ecología y evolución de los bacteriófagos con genoma de RNA, que emplean el pilli F para infectar a su huésped, llevó a poner en cuestión su utilidad como indicador. Hoy día, se ha enriquecido la panorámica de la evolución de los bacteriófagos de RNA. El descubrimiento en bases de datos genómicos, de

nuevos filotipos no relacionados a los ya conocidos, anuncia una radiación adaptativa mucho más amplia de lo que se pensaba (Krishnamurthy, Janowski, Zhao, & Barouch, 2016).

Por otro lado, al tiempo que, se ha detallado la microevolución de los bacteriófagos tipo, se ha reforzado el concepto de que los bacteriófagos de cadena sencilla de RNA colapsan en un solo grupo monofilético (Bollback & Huelsenbeck, 2001), la familia *Leviviridae* en los dos géneros que agrupa; *Levivirus* (subgrupos I y II) y *Allolevirus* (subgrupos III y IV) muestran organización genómica distinta, producto de expansión génica, -posiblemente por recombinación (Stephanie D Friedman, Snellgrove, Genthner, Division, & Breeze, 2012) a partir de un ancestro común que evolucionó para usar el plásmido F como medio de adhesión a la célula y vía de entrada. La evolución subsecuente, aumento el tamaño del genoma, eliminó el gen de lisis y aumentó la proteína “read through”, que caracteriza a los *allolevirus*.

La separación que da origen a la familia, debió ocurrir en un momento temprano, puesto que, PP7-bacteriófago de ssRNA, que tiene como hospedero a *Pseudomonas*- aparece apartado de estas ramas. Por otro lado, la maleabilidad genómica de los bacteriófagos de cadena de RNA sencilla continua bajo estudio, dado que algunos bacteriófagos, dependientes del plásmido R, muestran estructura genómica similar y pueden ser ubicados en el cluster de *Levivirus* (Kannoly, Shao, & Wang, 2012)

Al igual que otros virus con genoma de RNA, muestran altas tasas de mutación, que son dirigidas por la presión más astringente, a través de la selección de un set común de mutaciones (Arribas, Kubota, Cabanillas, & Lázaro, 2014). En la adaptación térmica, una de las mutaciones que se producen en la región no codificante, tiene efecto positivo sobre mutaciones posteriores, que traducidas a proteína mejoran la aptitud (Kashiwagi, Sugawara, Tsushima, Kumagai, & Yomo, 2014).

1.5.2 Genotipos del bacteriófago FRNA como indicadores

Los bacteriófagos FRNA tienen características particularmente atractivas como modelos de virus entéricos humanos, porque en principio, como los virus entéricos, no pueden multiplicarse en el ambiente. A diferencia de los indicadores bacterianos, como *Escherichia coli* y otras enterobacterias que pueden habituarse, los bacteriófagos FRNA requieren que el hospedero bacteriano encuentre temperaturas mayores a 30°C, para que el pilli F-que funciona como único receptor-sea sintetizado.

El hecho de que, los bacteriófagos FRNA son liberados de la bacteria huésped en agua residual, de humanos o animales de sangre caliente, donde frecuentemente son encontrados en grandes números ha llevado a considerarlos como indicadores de contaminación por agua proveniente del drenaje sanitario. Debido a que, en términos de composición, estructura y tamaño, se asemejan a los virus entéricos humanos, (hebra única de RNA rodeada por una cápside de proteína), tal como astrovirus, calicivirus, hepatitis A y E), ha resultado un modelo más adecuado que los indicadores bacterianos para probar algunos procesos de tratamiento de agua. Empleado consistentemente como modelo de investigación para una multiplicidad de procesos de tratamiento de agua y transporte a través de medios porosos (Havelaar, Van Olphen, & Drost, 1993). Sin embargo, aun encontrándose en agua residual en títulos similares al de ciertos virus entéricos humanos, se ha corroborado que son menos resistentes a la inactivación que la mayoría de los virus entéricos contra los que han sido probados bajo diferentes condiciones.

Dicho lo cual, la presencia de estos bacteriófagos típicamente asociado con excretas humanas y animales, indica el potencial de que virus entéricos estén presentes, pero su ausencia no lo descarta. Por otro lado, la detección cuantitativa de bacteriófagos FRNA en cuerpos de agua ambientales y fuentes de suministro de agua para consumo humano, es un indicador útil y puede servir para identificar puntos de entrada de contaminantes, para medir eficiencias y métodos de recuperación.

1.5.3 Genotipos del bacteriófago FRNA en el rastreo de fuentes.

Entre los indicadores de contaminación fecal con potencial como indicadores de virus y rastreo de fuentes de contaminación actualmente en uso, se encuentran los bacteriófagos de la Familia *Leviviridae*, también conocidos como bacteriófagos FRNA por su material genético y tener como receptor el pilli sexual en la célula bacteriana. Los genotipos (II y III) identificados por hibridación molecular, habrían sido descritos como los predominantes en heces humanas, en tanto que los grupos I y IV son encontrados predominantemente en animales (F. C. Hsu, Shieh, Van Duin, Beekwilder, & Sobsey, 1995). En tanto que diferencias estructurales afectan la sobrevivencia y pueden impactar en la proporción de genotipos detectados por cultivo e hibridación (Brion, Meschke, & Sobsey, 2002; Durán et al., 2002). El problema de conocer el número inicial de cada genotipo, se resuelve a través de la detección molecular mediante amplificación por RT-qPCR, y empleando oligonucleótidos específicos. El resultado es la cuantificación de una señal más duradera, pero con tasas de extinción similares entre genotipos (Kirs & Smith, 2007) y una mayor sensibilidad.

Las comparaciones entre amplificaciones por PCR y cultivo, empleando los primeros oligonucleótidos diseñados, mostraban disparidades en el número de muestras positivas tras la amplificación y en el agar en placa, esto debido a la falta de reactividad con la secuencia blanco (Rose et al., 1997).

Debido a la discordancia puntual entre las secuencias nucleotídicas, que como en el subclado perteneciente al genotipo III puede alcanzar el 36% sobre la región 5' codificante de la proteína maturasa (Stewart *et al.*, 2006). Más tarde, Friedman *et al.* (2009) compararon 30 genomas completos, 19 de los cuales fueron recientemente secuenciados e incorporados a la base de datos de GenBank, NCBI (S D Friedman, Genthner, Gentry, Sobsey, & Vinje, 2009). El mismo autor estimó un coeficiente de variación del 50% de similitud entre el mismo grupo del género *Levivirus* y aproximadamente, de entre el 70% al 98% de entre cada grupo.

Empleando los mismos oligonucleótidos y pruebas moleculares, tres de los cuatro genotipos fueron identificados en agua residual (Ogorzaly & Gantzer, 2006). Poco

después se encontró una correlación positiva entre el número de genomas del genotipo II, indicadores bacterianos y adenovirus humanos en la porción inferior de la cuenca del Río Meurthe (Ogorzaly, Tissier, Bertrand, Maul, & Gantzer, 2009). Debido a que la especificidad de huésped entre humanos y animales de granja para los diferentes genotipos de bacteriófagos FRNA no es absoluta, por ello de acuerdo con Wolf *et al* (2010) es necesario usar múltiples indicadores a fin de aumentar la tasa de identificación correcta de la fuente.

1.6 Variables fisicoquímicas.

El valor de pH de un sistema determina su utilidad en una variedad de propósitos. Los valores de pH muy bajos han sido reportados como tóxicos para la vida acuática, ya que alteran la solubilidad de otros componentes químicos, así como de algunos elementos esenciales en los sistemas acuáticos. Un intervalo de pH entre 5.5-6.0 parece ser un límite por debajo del cual, el daño a la biota sensible comienza a ser un problema ambiental significativo (Camargo & Alonso, 2006).

La temperatura del agua es uno de los factores conductores en el funcionamiento de los sistemas acuáticos. Su efecto sobre la solubilidad de los gases, y las tasas metabólicas de consumo de oxígeno, indirectamente determinan el estado de oxidación y disponibilidad de otros elementos. De este modo, afectan la toxicidad de algunos químicos (ej. Metales pesados). El oxígeno disuelto es esencial para mantener el balance de oxígeno en el sistema acuático; niveles de oxígeno bajo en el sistema tienen efectos adversos en la vida acuática, aumentando la sensibilidad de numerosos organismos acuáticos a sustancias tóxicas, limitando la capacidad de nado, alterando la alimentación, migración y en último término llevando a la muerte a organismos acuáticos (Wetzel, 2001). En los cuerpos de agua eutróficos, las concentraciones de oxígeno disuelto más bajas, tienen lugar durante los picos de la tasa respiratoria. Del modo que se calcula esta tasa, el volumen de biomasa, que a su vez depende de los nutrientes, es fundamental.

Nitritos, nitratos y amonio; las formas biodisponibles del ciclo del nitrógeno, producto del metabolismo bacteriano, y de la lixiviación de fertilizantes tienen efectos adversos en la salud en menores de cuatro meses -NO₃ y metahemoglobinemia - y eutrofización en cuerpos acuáticos.

El NH₃, incrementa las concentraciones de protones (H⁺) en los ecosistemas de agua dulce sin mucha capacidad de amortiguamiento, resultando en la acidificación de estos sistemas. Así mismo, al alcanzar niveles tóxicos, el NH₃ limita la capacidad de los animales acuáticos para sobrevivir, crecer o reproducirse (Camargo & Alonso, 2006; Carey & Migliaccio, 2009) .

1.7 Fuentes de contaminación fecal e impacto urbano.

Cuatro principales tipos de agua residual han sido identificados; 1) agua residual doméstica; 2) agua residual industrial, 3) agua residual agrícola; generada en procesos que rodean las granjas, es cada vez más significativa por el uso de fertilizantes y pesticidas, 4) agua residual urbana; definida como una combinación de agua residual doméstica e industrial, agua de lluvia e infiltración del drenaje (Naidoo & Olaniran, 2014).

Line (2013) entre otros, destaca la presencia de gran número enterococos fecales en efluentes urbanos (Line, 2013). En un análisis de siete ríos en Carolina del Norte encontró una correlación significativa entre el porcentaje de superficie impermeable y las tasas anuales de exportación de amonio, pero no de otras formas de nitrógeno y fosforo. En el mismo trabajo, en cinco de las siete subcuencas estudiadas con menor desarrollo, se correlacionó el número de enterococos fecales, en el flujo medio con el porcentaje de área urbana.

En áreas urbanas, la alta densidad poblacional y subsecuente producción de desechos orgánicos que son vertidos, junto con una menor resistencia a la

escorrentía -debido a la mayor área impermeable -, son dos de las causas del gran número de indicadores fecales y patógenos que alcanzan los cuerpos de agua. A manera de ejemplo, en la ciudad de París, durante un evento extraordinario de lluvia, el sobre flujo puede descargar hasta 79 veces más *E. coli* y hasta 100 veces más enterococos fecales que los contenidos en el agua residual (Passerat, Ouattara, Mouchel, Vincent Rocher, & Servais, 2011).

1.8 Efectos de la entrada de efluentes residuales a cuerpos de agua

Habitualmente se distinguen dos grandes peligros derivados de la descarga de efluentes residuales a los cuerpos de agua: 1) el influjo de nutrientes que puede transformar las condiciones de un hábitat, alterar las cadenas tróficas y la comunidad biótica. El segundo gran peligro es la contaminación microbiológica y la principal preocupación asociada, es el riesgo de enfermedad en humanos y ganado tras la exposición patógenos (Naidoo & Olaniran, 2014).

Ambos peligros son limitantes para el uso del agua, propósito específico. Así, la Organización Mundial de la Salud ha pugnado por las “fuentes de agua mejorada”, (entendido como la protección de fuentes de agua y desinfección), libre de patógenos (dentro de las posibilidades técnicas) para el consumo humano. Nuevos riesgos, como la transferencia de genes de resistencia en el agua residual y desde el resistoma del suelo y/o agua (Subirats, Sánchez-Melsió, Borrego, Balcázar, & Simonet, 2016), o el impacto del microbioma del agua residual tiene sobre comunidades sensibles de los arrecifes coralinos están íntimamente relacionados con el uso de suelo y el origen del agua residual- humana o animal- apenas comienzan a ser explorados (Staley *et al.*, 2017).

1.8.1 Efectos agudos de la entrada de efluentes residuales.

En los ríos que reciben entrada de nutrientes provenientes de plantas de tratamiento, el NH_3 en el agua residual puede afectar directamente la

concentración de oxígeno disuelto (OD) y ser responsable de hasta 60% de la variación del mismo.

También en forma aguda, la entrada de efluentes producto de sobre flujos del sistema de drenaje a ríos es causa de 1) depleción de oxígeno, debido a la biodegradación de la alta carga de materia orgánica acarreada por el agua residual no tratada, 2) aumento de la turbidez llevando a la reducción de la producción primaria fotosintética, 3) incremento en la concentración de algunos micro contaminantes orgánicos, 4) incremento en la concentración de metales, 5) incremento en la concentración de patógenos y de microorganismos indicadores (Passerat *et al.*, 2011).

1.9 Análisis estadísticos multivariados y calidad de agua.

1.9.1 Análisis de Componentes Principales.

Utiliza las correlaciones entre los múltiples constituyentes de la calidad de agua, para reducir efectivamente el número de variables y asistir en la identificación y descripción de procesos hidrológicos, geoquímicos o de contaminación.

El análisis de componentes principales transforma un conjunto de datos conteniendo p variables (constituyentes analíticos), interrelacionados o correlacionados en diferente grado, a un nuevo grupo de datos conteniendo p nuevas variables ortogonales, no correlacionadas, llamadas componentes principales. Los componentes principales son funciones lineales de las variables originales, tal que la suma de sus varianzas, es igual a la de las variables originales. Los componentes principales se ordenan a partir de la varianza más alta, a la siguiente más alta, etc (Olsen, Chappell, & Loftis, 2012).

La meta es que los primeros componentes principales retendrán la mayor parte de la información de todas las variables p originales, de esta forma reduciendo, la dimensionalidad del conjunto de datos.

Los coeficientes o cargas derivados de los valores característicos (eigenvalues) del análisis de componentes principales pueden ser usados para calcular una matriz de componentes principales (un valor numérico para cada componente principal por cada muestra). Estos componentes principales pueden indicar la importancia de un proceso ambiental dado, o fuentes de contaminación. Por ejemplo, un clado de muestras alrededor de una planta de tratamiento de aguas residuales que pueden ser comparados con muestras de referencia.

1.9.2 Árboles de clasificación regresión.

Los árboles de clasificación y regresión o modelos CART, son ampliamente conocidos y empleados en la estandarización y optimización procesos a partir de conocer el estado de las covariables de dicho proceso. Un ejemplo común, es la derivación de enfermos a servicios de urgencias, dando prioridad a casos con mayor probabilidad de tener consecuencias graves. La asignación se lleva a cabo en función la presencia de síntomas, o su magnitud (covariables). Útiles cuando hay una gran cantidad de factores o variables predictores posibles, cuando faltan datos o existen indicios de interacciones complejas entre los distintos factores.

Los modelos tipo CART, como una técnica de minería de datos, son altamente apreciados por su valor predictivo y por definir el peso la interacción entre factores de riesgo, en relación a un resultado particular. En la investigación biomédica el modelo ha mostrado su valor evidenciando a nivel de interactoma, conexiones potenciales entre, la magnitud en la expresión alélica de variantes de TGF- β y un riesgo incrementado de cáncer de vejiga (Wei *et al.*, 2012). En la investigación epidemiológica (Calle & Sánchez-espigares, 2007) ha sido empleado con éxito para identificar los factores que incrementan el riesgo de padecer echinococosis alveolar en Francia (Piarroux *et al.*, 2013), también para predecir brotes de criptosporidiosis en Queensland, Australia con base en variables socioeconómicas y climáticas (Hu, Mengersen, & Tong, 2010), o delimitar las clases de riesgo para patógenos zoonóticos en base a uso del suelo, clima y variables de calidad de agua (Wilkes *et al.*, 2013).

Desde un punto de vista matemático, la propensión a pertenecer a una clase (Westreich, Lessler, & Funk, 2010) y el hecho de que los puntos de corte que minimizan la diversidad en los nodos finales (clases homogéneas) sea específico entre árboles, posibilita modelar con cierta precisión el comportamiento de indicadores de contaminación fecal (Bae, Olson, Hsu, & Sorooshian, 2010). Más aun, el análisis de la segregación de un modelo CART de un indicador de contaminación fecal humana (*Bacteroides. thetaiotaomicron*) vs uno de contaminación fecal no específico (*Escherichia coli*), reproduce el peso de cada factor y en términos prácticos, anticipa que atender el número y estado de letrinas y fosas sépticas es la mejor receta para limitar la contaminación fecal difusa en condiciones de flujo base a lo largo de la parte baja de la península de Michigan (Verhougstraete, Martin, Kendall, Hyndman, & Rose, 2015).

..

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

La caracterización genotípica de los bacteriófagos FRNA discriminará eficientemente el tipo de contaminación fecal humana cuando los grupos II y III de bacteriófagos FRNA estén asociados a adenovirus 40-41 (humano)

Objetivo general.

Conocer la capacidad de discriminación y riesgo de fuentes de contaminación fecal en agua de diferente calidad mediante el uso de indicadores virales.

Objetivos particulares.

- Determinar el origen y grado de la contaminación fecal en agua mediante la caracterización de los bacteriófagos FRNA por RT-qPCR y qPCR.
- Conocer la contaminación de origen humano o animal en relación con la respuesta ambiental de los bacteriófagos FRNA por análisis de componentes principales.
- Determinar la correlación entre los bacteriófagos FRNA y los virus humanos por análisis de componentes principales y regresión multivariada.

Esta hoja fue dejada en
blanco de forma intencional

Capítulo 3

Material y métodos.

3.1 Diseño experimental.

Para la consecución de los objetivos de este proyecto, se pensó como crítico contar con un espectro amplio de condiciones con la intención de intentar disgregar los efectos específicos de sitio. Se seleccionaron cinco variables fisicoquímicas comúnmente medidas para informar la calidad del agua; concentración de oxígeno disuelto, pH, conductividad eléctrica, temperatura, concentración de amonio, en relación con indicadores microbiológicos de contaminación fecal y de virus entéricos en agua.

Por ser un indicador bacteriano ampliamente usado en la medición de la calidad de agua en cuerpos naturales, mayor sensibilidad y especificidad que los coliformes fecales, se seleccionó la cuantificación de enterococos fecales como eje vertebral de la clasificación de la calidad multivariada de agua y comparación con indicadores de virus.

El generar una clasificación, solo fue posible aprovechando la experiencia en las áreas de muestreo. Del mismo modo, se integraron largas series de datos obtenidos de muestreos previos, empleando métodos estandarizados por el grupo de Ecología Química en sitios predefinidos.

Muestras independientes unas de otra fueron obtenidas de una selección de los mismos puntos de muestreo a fin de cuantificar indicadores virales y conocer su relación con algunas de las variables fisicoquímicas.

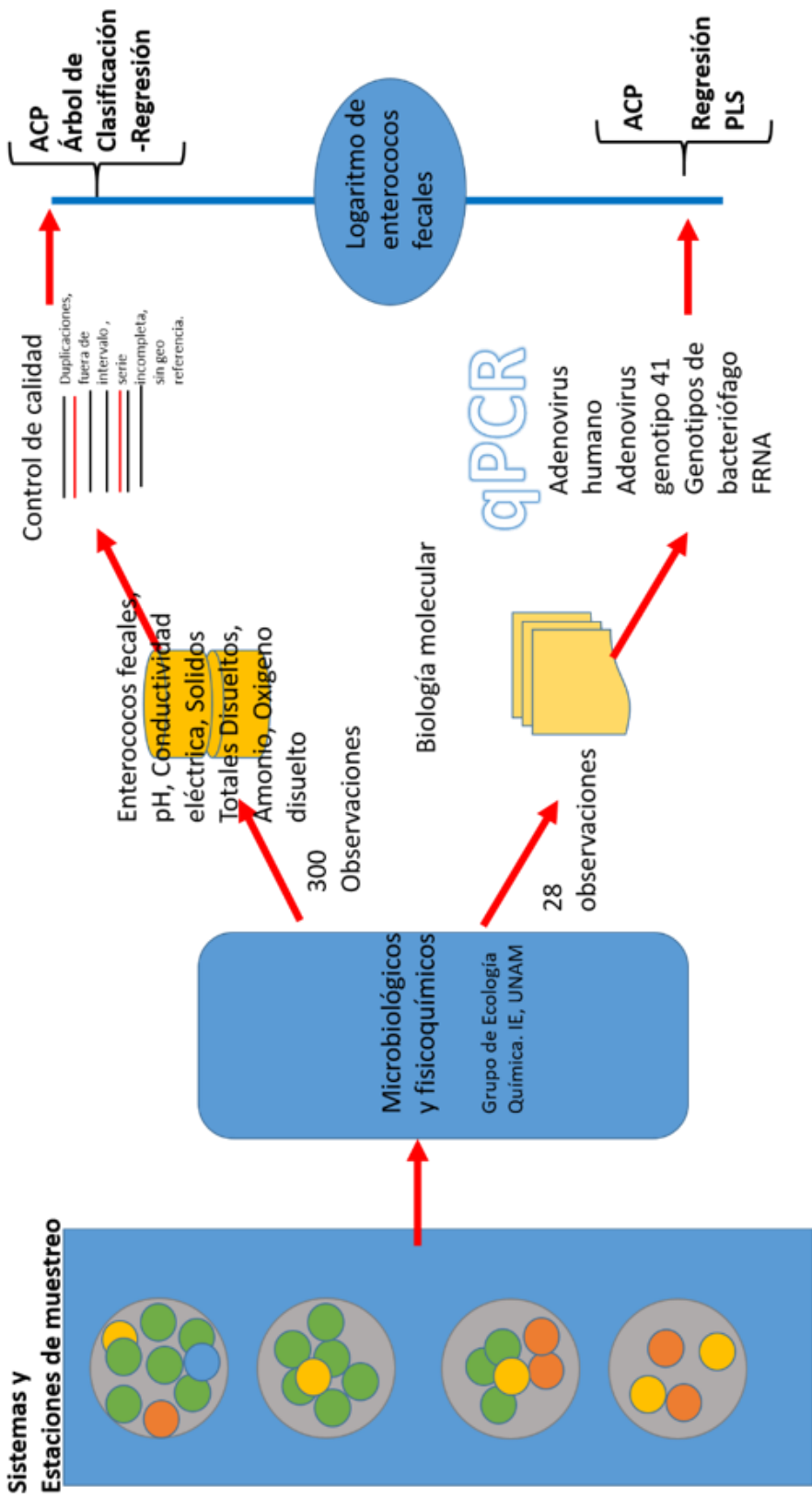


Figura 1. Se muestra el diseño del estudio. Observe que el número de enterococos fecales liga la base de datos y las observaciones de los genotipos de los bacteriófagos de FRNA y virus

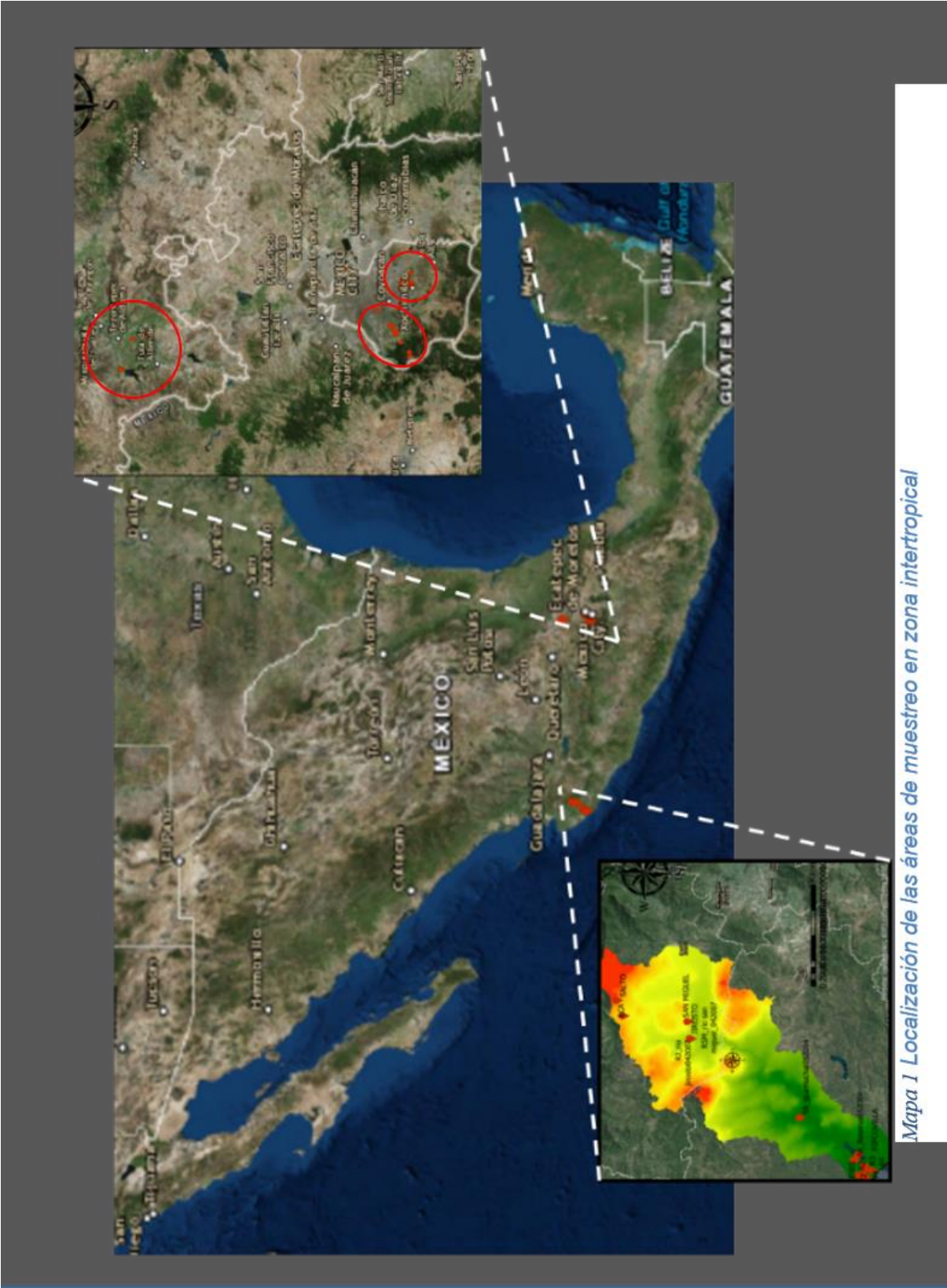
3.2 Características generales de las áreas de muestreo

Los cuatro sistemas monitoreados - Río Magdalena, Río Cuixmala, humedal Xochimilco, canales del Valle del Mezquital, representan por sus características sistemas acuáticos divergentes de la región intertropical, el centro de México.

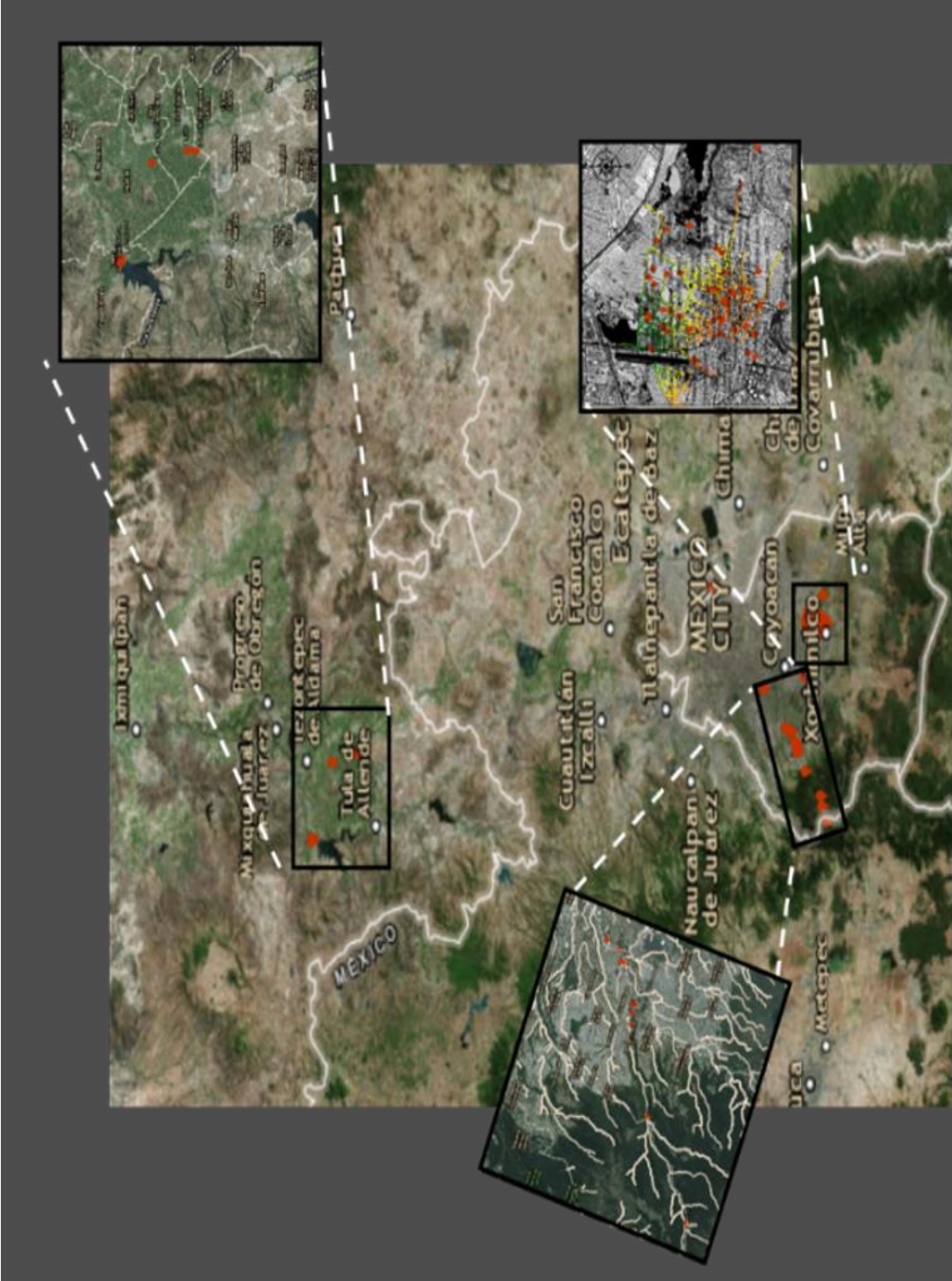
Además, de que, dentro de cada sistema, los sitios presentan diferentes impactos de contaminación fecal y condiciones que facilitan nichos microbianos. Brevemente; el Río Magdalena es un sistema periurbano localizado en los alrededores de la Ciudad de México. Fluye a través de un área boscosa y es usado como fuente de abastecimiento para producción de agua potable. Una vez entrando al área urbana, el río recibe descargas de agua residual de origen municipal (Mazari-Hiriart *et al.*, 2014).

El Río Cuítmala es un sistema acuático que fluye a lo largo de una reserva tropical, con muy escasa población; la cuenca de este río, está localizada en estado de Jalisco en el occidente de México (Sánchez-Azofeifa, Quesada, Cuevas-Reyes, Castillo, & Sánchez-Montoya, 2009).

El humedal de Xochimilco es una de las reminiscencias de la Cuenca lacustre del Valle de México (Mazari-Hiriart *et al.*, 2008). Es un sistema acuático administrado, que es recargado con agua residual tratada y recibe efluentes urbanos durante la época de lluvias. En un área hidrológicamente conectada, aunque distante, se encuentra la región conocida como el Valle del Mezquital, en el estado de Hidalgo, donde se practica el riego agrícola con agua residual. Allí, una proporción significativa de agua residual de origen municipal proveniente de la Ciudad de México es descargada sin tratamiento (Anda & Shear, 2008).



Mapa 1 Localización de las áreas de muestreo en zona intertropical



Mapa 2. Localización de las áreas de muestreo zona centro del país; Rio Magdalena, Canales del humedal de altura- Xochimilco, Valle del Mezquital. Hgo

3.2.1 Chamela-Cuixmala

Enclavada en un área de 13,600 km², que conforma la costa pacífico del Estado de Jalisco se identifican nueve cuencas, incluyendo las de Chamela y Cuixmala. El patrón de precipitación es marcadamente estacional, concentrándose en 5 meses con lluvias en el año, pero influenciado de forma importante por el número de ciclones en la temporada que se acercan a la costa, la precipitación media anual es variable, y definida regionalmente. En la estación biológica "Chamela", la precipitación anual es de 752 mm y el patrón de lluvias aleatorio. El clima oscila entre cálido en la parte baja de la cuenca (600 msnm) y templado en las cumbres de la cuenca, aunque la característica más distintiva del clima de la costa del pacífico es su fuerte estacionalidad en el patrón de precipitación, concentrándose en los meses de junio a octubre.

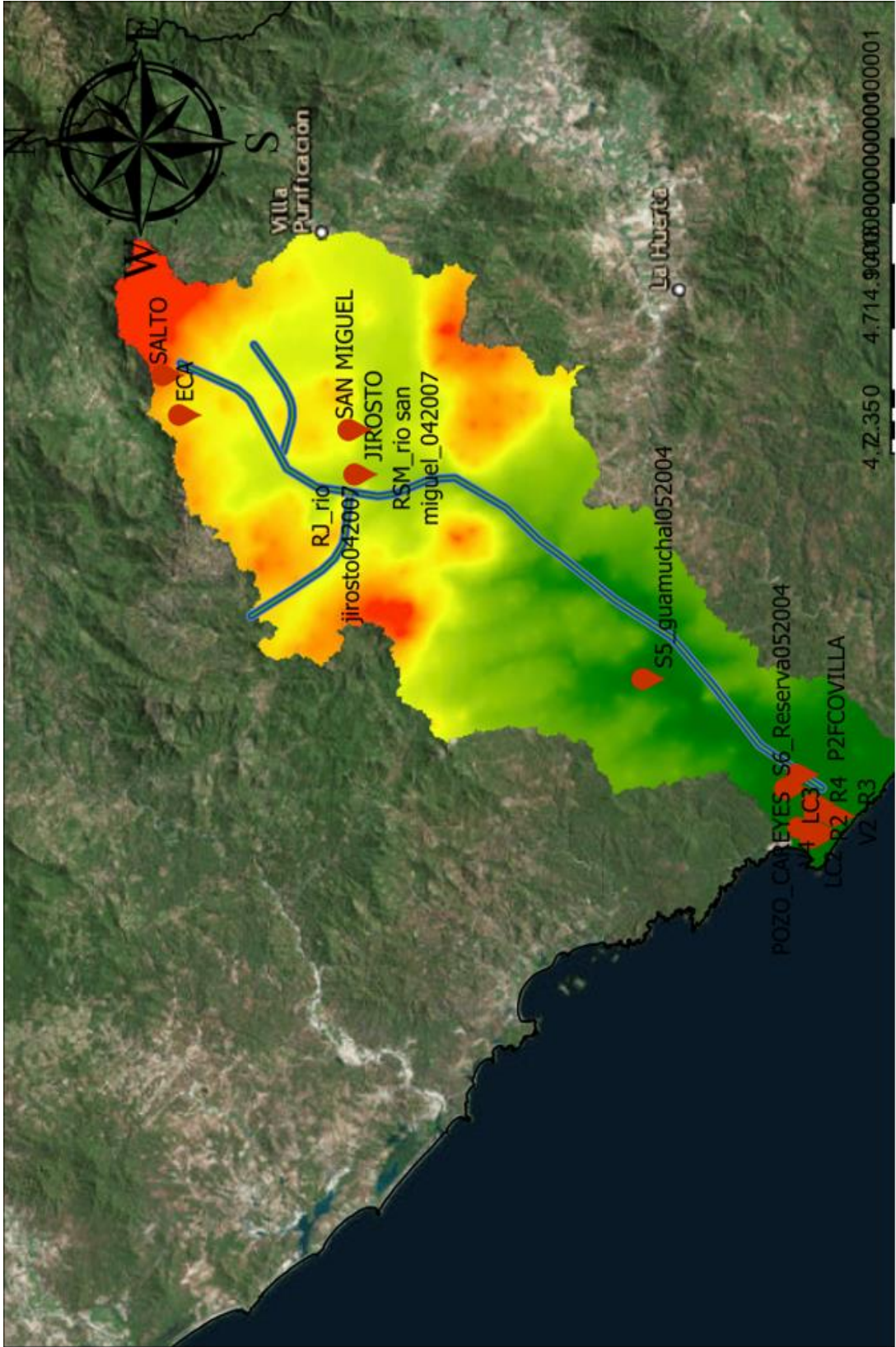
A pesar de su importancia como puerto durante la colonia, no es sino hasta después de mediados del siglo XIX y especialmente a partir de 1950 que se da un auge en la colonización de esta costa.

Actualmente, existen cerca de 50 asentamientos humanos, dispersos en el territorio, la mayoría con menos de 1000 habitantes, siendo que la población total ronda las 23,428 personas (INEGI, 2010).

La reserva de la biosfera es la zona que mejor conserva el bosque tropical caducifolio. Los ejidos inmediatamente adyacentes conservan entre el 70 y 80% de este tipo de bosque y en la zona buffer es de al menos del 55%. Pero se ha descrito una tendencia hacia una mayor fragmentación conforme uno se aleja de la reserva. En tanto que solo se encuentran suelos adecuados para la agricultura en la parte baja de la cuenca, es ahí donde ha tenido lugar la mayor transformación de uso de suelo hacia pastizales, y es el único lugar donde las actividades del campo llegan a ser intensivas. De acuerdo con el INEGI, poco más de un tercio de la población se dedica a actividades relacionadas con la agricultura, ganadería y silvicultura que hasta ahora son de bajo impacto.

Existe un cierto número de corrientes perenes y otras permanentes que aumentan su caudal, sobre todo hacia la parte media y baja de la cuenca que se asocia a manchones de bosque tropical caducifolio rodeando el cuerpo de agua.

Los servicios eco sistémicos de conservación de la biodiversidad, y disponibilidad de agua y calidad de agua dependen de estos bosques por su efecto en la evapotranspiración, regulación de la esorrentía e infiltración. En un futuro se espera que el desarrollo y actividades turísticas intensifiquen la modificación del uso de suelo, sobre todo en la zona costera.



Mapa 3. Cuenca Chamela-Cuixmala. Observe la localización de los puntos de muestreo a lo largo de la trayectoria del río y la pendiente en este modelo.

3.2.2 Río Magdalena

Al sur poniente la Ciudad de México se encuentra la cuenca que alberga el único río vivo y el cuerpo de agua superficial más importante de la Ciudad. La cuenca localizada en los 19°15'00" N y 99° 17'30" W cubre un área de 33 Km²

La corriente principal nace a 3,600 msnm y fluye a lo largo de 22 KM con un caudal base en la parte baja de la cuenca de 0.67 m³/s, lo que representa alrededor del 1% de la demanda de agua de la ciudad. Un tercio del volumen (200L/s), es potabilizado y el resto es usado como drenaje a partir de la presa Anzaldo. Diez kilómetros después de haber ingresado al área urbana, el río Magdalena es intubado en los viveros de Coyoacán, junto con lo que era el río Churubusco.

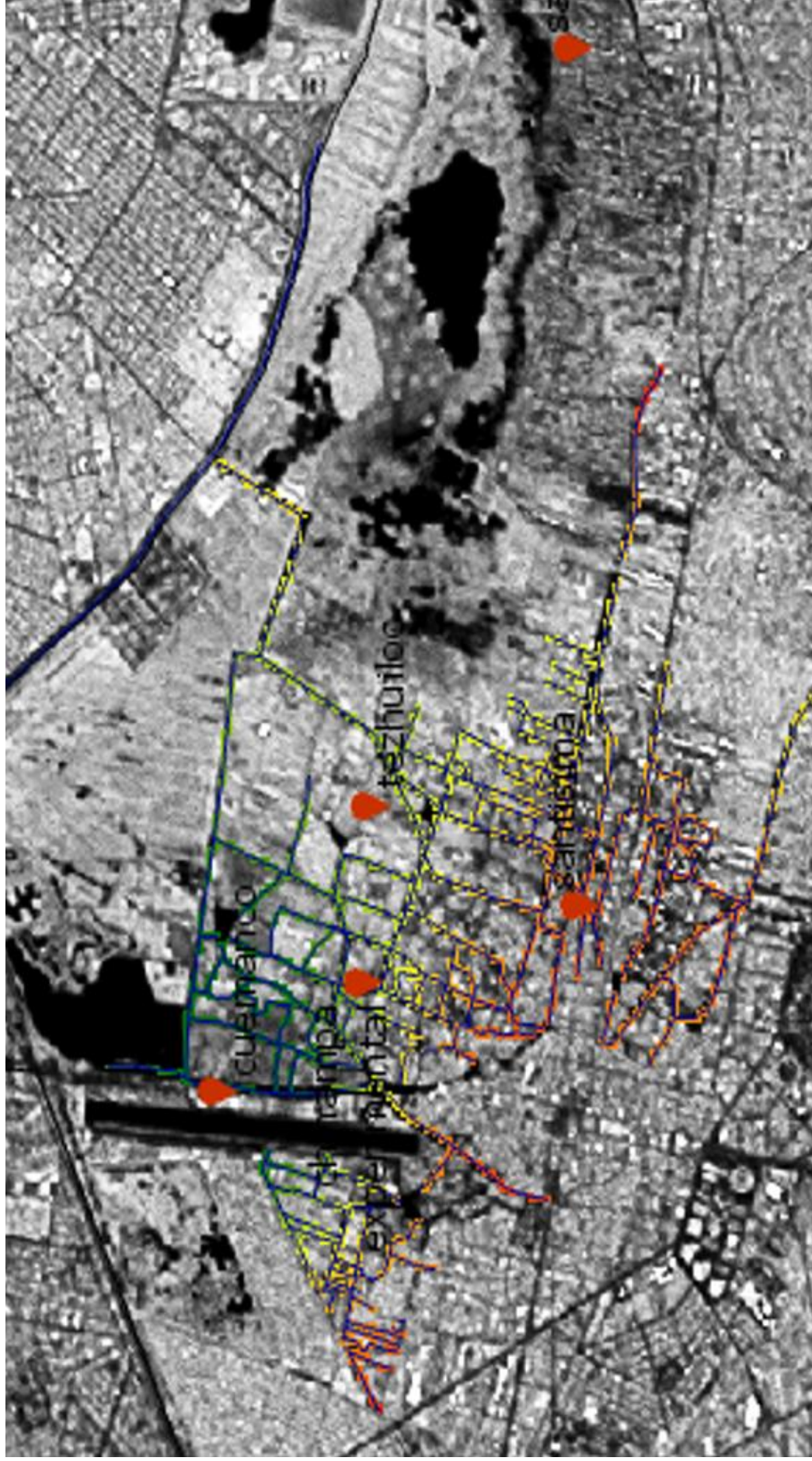
El Magdalena es un ejemplo de río urbano, cuya agua disminuye de calidad conforme se interna en el área urbana. Trabajos previos como Jujnovsky *et al.*, , 2012 (Jujnovsky, González-Martínez, Cantoral-Uriza, & Almeida-Leñero, 2012) han documentado descargas de agua residual de la estación de muestreo II a 2530 msnm. Al final de su recorrido (de los 2,801 a los 2,308 msnm) el río comienza a recibir el influjo de fauna doméstica y en la última estación descargas municipales, por lo cual la calidad bacteriológica del agua se degrada, encontrando cuentas de unidades formadoras de colonia de coliformes fecales y enterococos por 100 mL en el intervalo de 10⁵–10⁶ (Jujnovsky *et al.*, 2017).



Mapa 4. Río Magdalena. Observe la localización de los puntos de muestreo a lo largo de la trayectoria del río y una vez entrando a la mancha urbana

3.2.3 Xochimilco

Este ecosistema acuático tropical comprende una red interconectada de canales y lagos, sobre los que existe influencia de actividades agrícolas y urbanas. Es un sistema heterogéneo, poco profundo, cálido, bien oxigenado, turbido, y extremadamente rico en nutrientes. Xochimilco presenta una amplia heterogeneidad local debido al uso de suelo y las barreras físicas de cada región. Un ejemplo es la mayor diversidad de rotíferos litorales y cladóceros cuya riqueza es significativamente mayor en las partes bajas del lago, en donde Nandini *et al* (2016), encontraron cepas toxigénicas y no toxigénicas de *Vibrio cholerae* (Nandini & Garcia, 2015). Sin embargo, el número de coliformes y quistes de *Giardia lamblia* fue extremadamente elevado sugiriendo que la planta es ineficaz en el tratamiento de virus y parásitos. Además, que ocurren eventos de re-contaminación en los canales. En un estudio posterior Espinosa *et al.* (2008) detectaron entre 30 y 40% de muestras positivas para rotavirus en agua de los canales de Xochimilco dependiendo de la época del año (Espinosa et al., 2008). Los canales cubren un área de 125 Km² y son alimentados con agua residual tratada proveniente de la planta de Cerro de la estrella.



Mapa 5. Canales de Xochimilco. Observe la localización de los puntos de muestreo sobre un modelo de concentración de enterococos fecales

3.2.4 El Valle del Mezquital.

Se ubica al sur del Estado de Hidalgo, aproximadamente a 100 Km al norte de la Ciudad de México, entre 19° 54' y 20°30' de latitud norte y 99° 22' y 98° 56' longitud oeste a una altitud promedio de 1,900 msnm y tiene una extensión de 85,000 hectáreas de tierra de cultivo que son regadas con agua residual, domésticas, industriales y comerciales proveniente de la Ciudad de México (Jimenez & Chávez, 2004).

En promedio, 52 m³/s de aguas negras, son drenados a través de gran canal del desagüe, el interceptor poniente y el emisor central a través de los túneles de Tequisquiac y el tajo de Nochistongo, para incorporarse al río Salado y a el Salto. Este último, descarga en la presa Requena y luego continua como el río Tula.

Existen cinco canales principales; El Salto-Tlamalco, canal de Fuerza, canal Dendhó, canal Endhó y canal Requena, sus aguas constituyen el 80% de la recarga de los acuíferos superficial y profundo, que tienen retorno a los canales de riego y a cierto número de manantiales.

En la literatura, Jiménez y colaboradores, han demostrado que existe un grado de autodepuración del agua residual. En lo que respecta a indicadores bacteriológicos, a lo largo de su tránsito por los canales, es el equivalente a un tratamiento secundario. Sin embargo, aguas abajo de la presa Endhó, el río Tula vuelve a recibir descargas.

De acuerdo con Lesser et al., (2011) en los “los 65 pozos analizados químicamente, el sodio y los sólidos totales disueltos generalmente se encuentran por arriba del límite máximo permisible para agua de uso y consumo humano” en tanto que “También en varios pozos se detectaron arsénico, fluoruros y plomo en concentraciones que superan el límite máximo permisible” y se detectaron

coliformes aun en agua de pozos, aun habiendo sido clorados (Lesser-Carrillo, Lesser-Illades, Arellano-Islas, & González-Posadas, 2011).



Mapa 6. Puntos de muestreo en el distrito de riego 03. El Valle del Mezquital Hgo. Se observan la presa Endhó, el río "El Salto", y el manantial Cerro colorado

3.3. Análisis de parámetros fisicoquímicos.

Las variables fisicoquímicas tales como oxígeno disuelto, pH, conductividad eléctrica, y temperatura fueron determinados in situ. Los siguientes sensores fueron usados: sensor rox optical para oxígeno disuelto (mg/L) (YSI), pH; sensor 6561 (YSI), temperatura (°C) (YSI), conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) (YSI), y sólidos totales disueltos (mg/l) (YSI). Estos sensores fueron calibrados apropiadamente siguiendo las instrucciones del fabricante. Los parámetros fueron medidos en el sitio, empleando una sonda YSI6600V2 (YSI Incorporated, Yellow Spring, OH).

3.4 Colección y concentración de muestras

De acuerdo con conteos previos de colonias de enterococos fecales, muestras de agua de un litro o de 20 L fueron colectadas en triplicado en botes de polipropileno estériles y transportados al laboratorio a 4°C para concentración de virus.. Posteriormente, las muestras fueron procesadas siguiendo procedimientos estandarizados dentro de las siguientes seis horas de haber sido colectadas (APHA, 2005)). Las muestras de agua de 20 L fueron concentradas por ultrafiltración utilizando ultra filtros de policarbonato (Hemoflow F80A, Fresenius Medical Care, Waltham, MA), en tanto que la detección de Adenovirus requirió de concentración adicional usando unidades de centrifugación Amicon (30,000 MW CO. Merck. Millipore, Billerica, MA). A continuación, las muestras fueron bloqueadas con polisulfona con una perfusión de 1,700 mL/min y concentrado a un volumen final de 200 mL (Hill *et al.*, 2005). Los 150 mL restantes de cada muestra fueron almacenados en alícuotas de 40 mL y empleados para extracción de RNA para evaluar los grupos genotípicos de bacteriófagos FRNA por RT- qPCR. Submuestras fueron congeladas y almacenadas a -70°C (Sambrook & Russell David, 2001) y el DNA fue extraído.

3.5 Análisis bacteriológicos.

Las muestras fueron procesadas mediante el método de filtración a través de membrana (APHA, 2005) con un diámetro de poro de 0.45 μm . Los filtros empleados con cada una de las diluciones fueron incubados por triplicado en medios selectivos para la cuantificación del número de colonias; en su caso, coliformes, coliformes fecales y enterococos fecales por 100 mL.

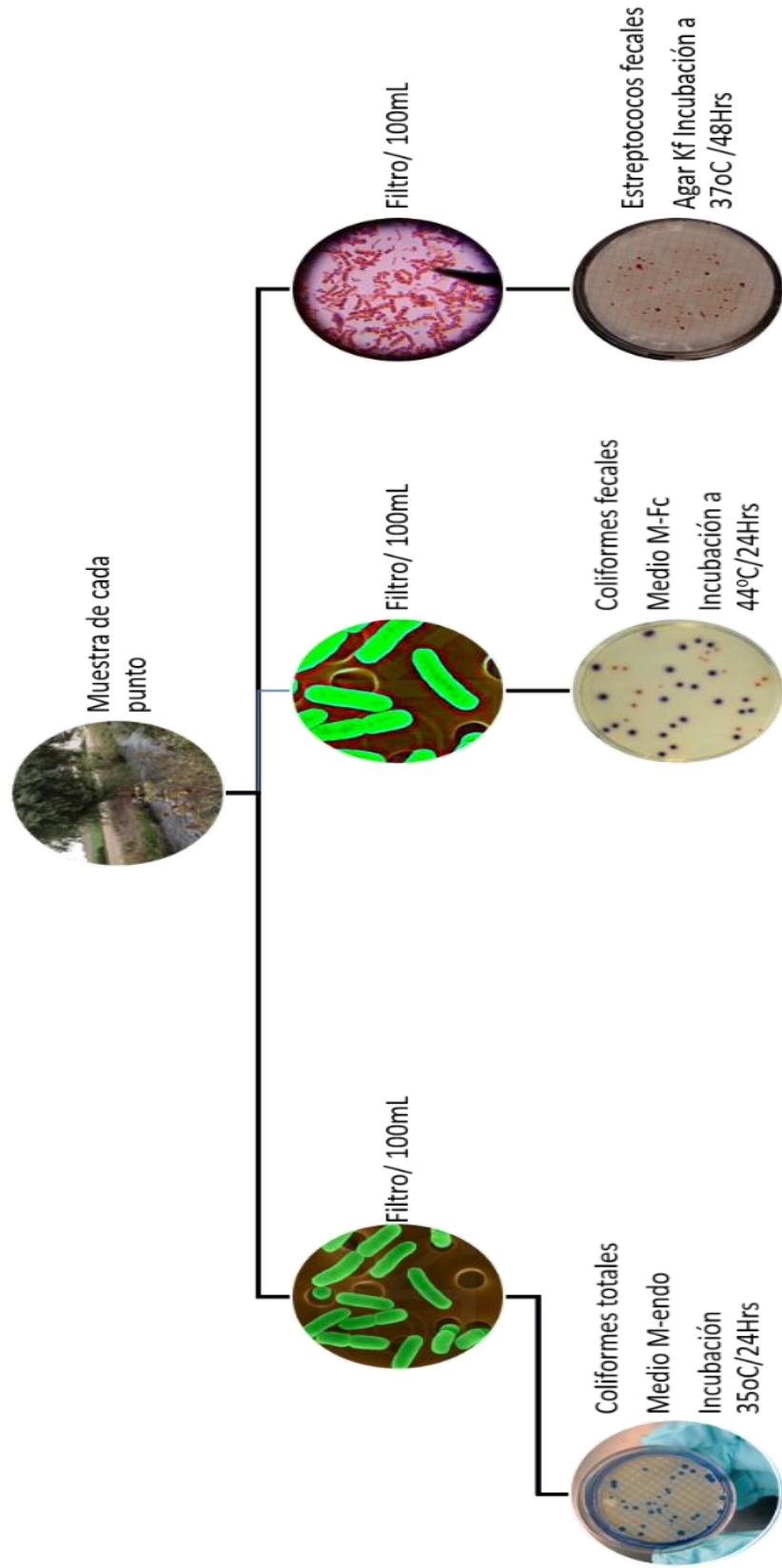


Figura 2. Diagrama de flujo para la medición de la calidad bacteriológica del agua.

3.6 Características de las observaciones en puntos de muestreo.

Un total de 315 observaciones cumplieron los requisitos de tener asociado una posición geográfica, no ser duplicados, incluir las variables del estudio, y no contener datos fuera del intervalo físicamente posible.

En las figuras 3, y 4 se muestra la media y desviación estándar de las observaciones agrupadas en cinco clusters de acuerdo a disimilitud. Las variables que se muestran son: logaritmo de enterococos fecales por 100 mL, temperatura (°C), unidades logarítmicas de potencial hidrogeno (pH), conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), concentración de oxígeno (mg/L), concentración de amonio (mg/L).

Gráficos de las variables estandarizadas respecto del 100% se pueden consultar en la sección de anexos.

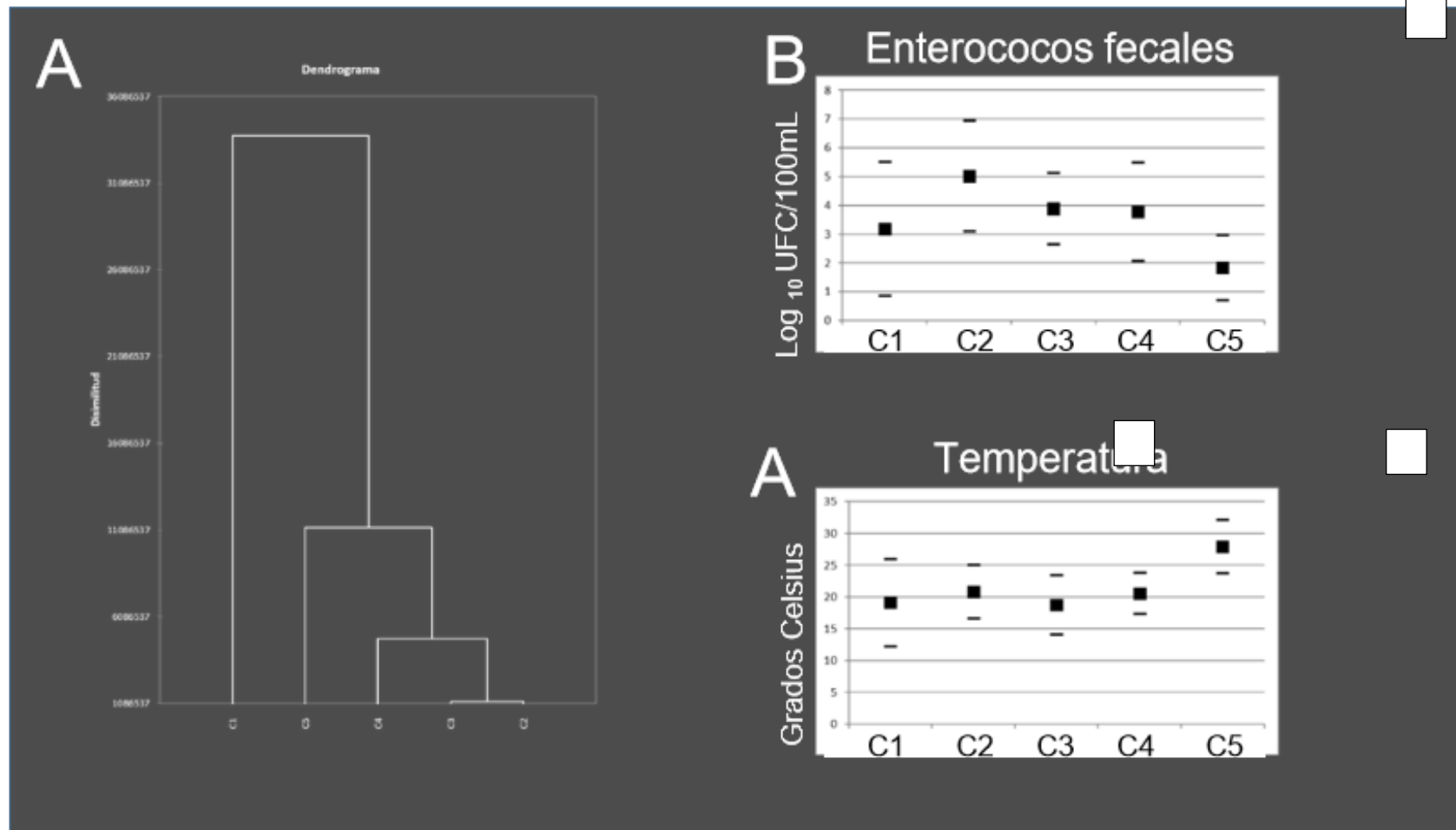


Figura 3. *Parámetros bacteriológicos y fisicoquímicos. A) Diagrama de Disimilitud formando cinco grupos, B) Observe título de enterococos fecales de acuerdo a disimilitud. C) Variación de la temperatura por grupo*

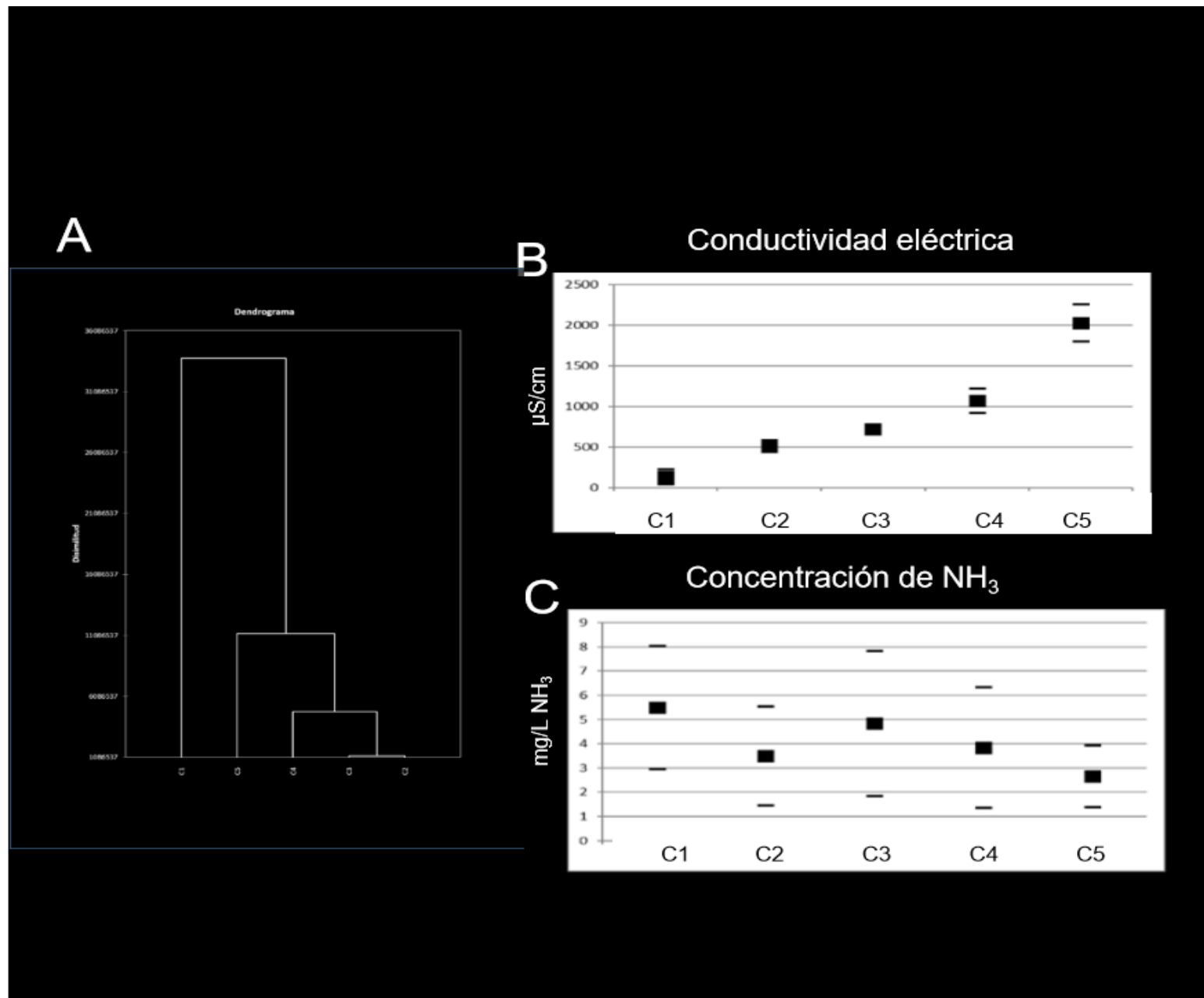


Figura 4. *Parámetros bacteriológicos y fisicoquímicos. A) Diagrama de Disimilitud formando cinco grupos, B) Conductividad eléctrica, C) Concentración de NH_3*

3.7 Métodos moleculares

Los oligonucleótidos y pruebas MGB diseñadas por Ogorzaly (Ogorzaly & Gantzer, 2006, 2007); GI forward :3' TCGATGGTCCATACCTTAGATGC5', GI reverse: 3'ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT5', sonda para GI; FAM-CTCGTTCGACAATGG-MGBNFQ, GII forward; 3'TGCAAACCTA ACTCGGAATGG5', GII reverse 3'AGGAGAGAACGCAGGCCTCTA5', sonda para GIII; FAM-TCCCTCTATTTCTC-MGBNFQ, GIII forward; 3'CCGCGTGGGGTAAATCC5', GIII reverse; 'TTCTTACGATTGCGAGAAGGCT5', sonda para GIII; FAM-AAGCGGGTGCAGTT-MGBNFQ fueron sintetizadas (Applied Biosystems) y usadas: 500 nmol de cada oligonucleótido y 250 nmol de cada prueba en reacciones monoplex. Las curvas de amplificación de adenovirus humano, construidas empleando los oligonucleótidos y pruebas diseñados por Jothikumar *et al.*, (2005) JTVXF; 3'GGACGCCTCGGAGTACCTGAG5', JTVXR; 3'AC1GTGGGGTTTCTGAACTTGTT5', JTVXP sonda; 6-FAM-CTGGTGACAG- TTCGCCCGTGCCA-BHQ, en tanto que para adenovirus genotipo 41 se emplearon los oligonucleótidos, HAdV-F4041-hex157f; 3'ACCCACGATGTAACACAGAC5', HAdV-F41-hex246r; 3'CACTTTGTAAGAATAAGCGGTGTC5', sonda HAdV-F4041-hex214 sonda 6-FAM- CGACKGGCACGAACKCGCAGCG-T-BHQ-1, como ha sido descrito previamente por He & Jiang, *et al* (2005), (Jothikumar *et al.*, 2005; Xagorarakis, Kuo, Wong, Wong, & Rose, 2007)

3.7.1 Controles y curvas de qPCR de indicadores virales.

El bacteriófago MS2 (ATCC 15597-B1) FRNA genotipo (GI) and Q β (ATCC23631-B1) bacteriófago FRNA genotipo III (G III) fueron cultivados a partir de viales stock adquiridos de ATCC; El bacteriófago FRNA genotipo II (GII) fue aislado a partir de

agua residual. El RNA fue extraído y retro-transcrito a cDNA, el cual fue

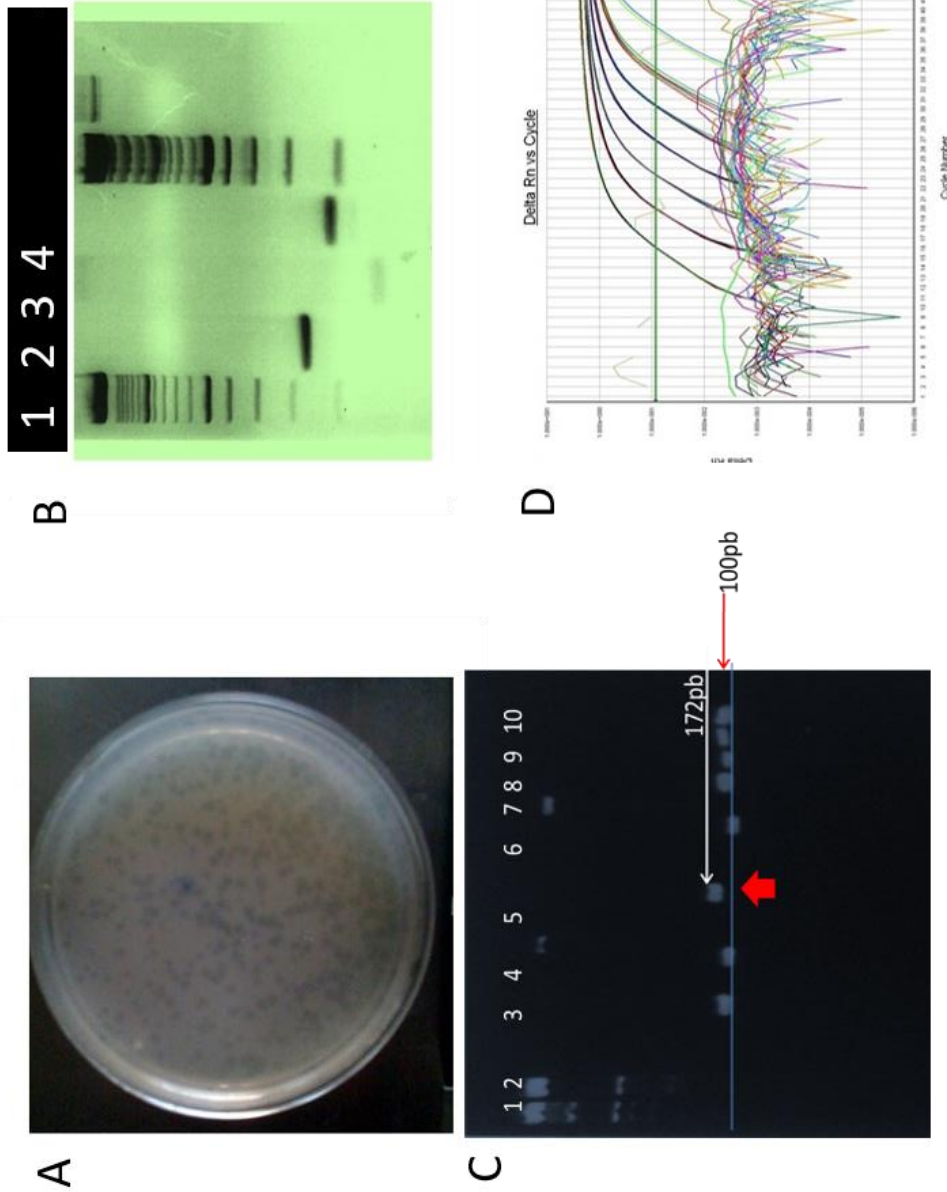


Figura 5. Estandarización de qPCR para cuantificación de bacteriófagos FRNA por qPCR. A) Placas líticas de bacteriófago FRNA, previo al aislamiento de bacteriófago FRNA GII silvestre. B) Productos de amplificación específicos de tres genotipos de bacteriófagos FRNA: De izquierda a derecha; Carril 1;PM; carril 2, FRNA GI (168pb);carril 3, FRNA GII (72pb); carril 4, FRNAGIII (115pb). C) DNA plasmídico extraído de clonas seleccionadas con kanamicina: Carril 1 PM; carril 2 PM; carril 3, Vector sin inserto; carril 4;Vector mas inserto. D) Curva de amplificación por qPCR construida a partir de diluciones seriadas fragmento clonado.

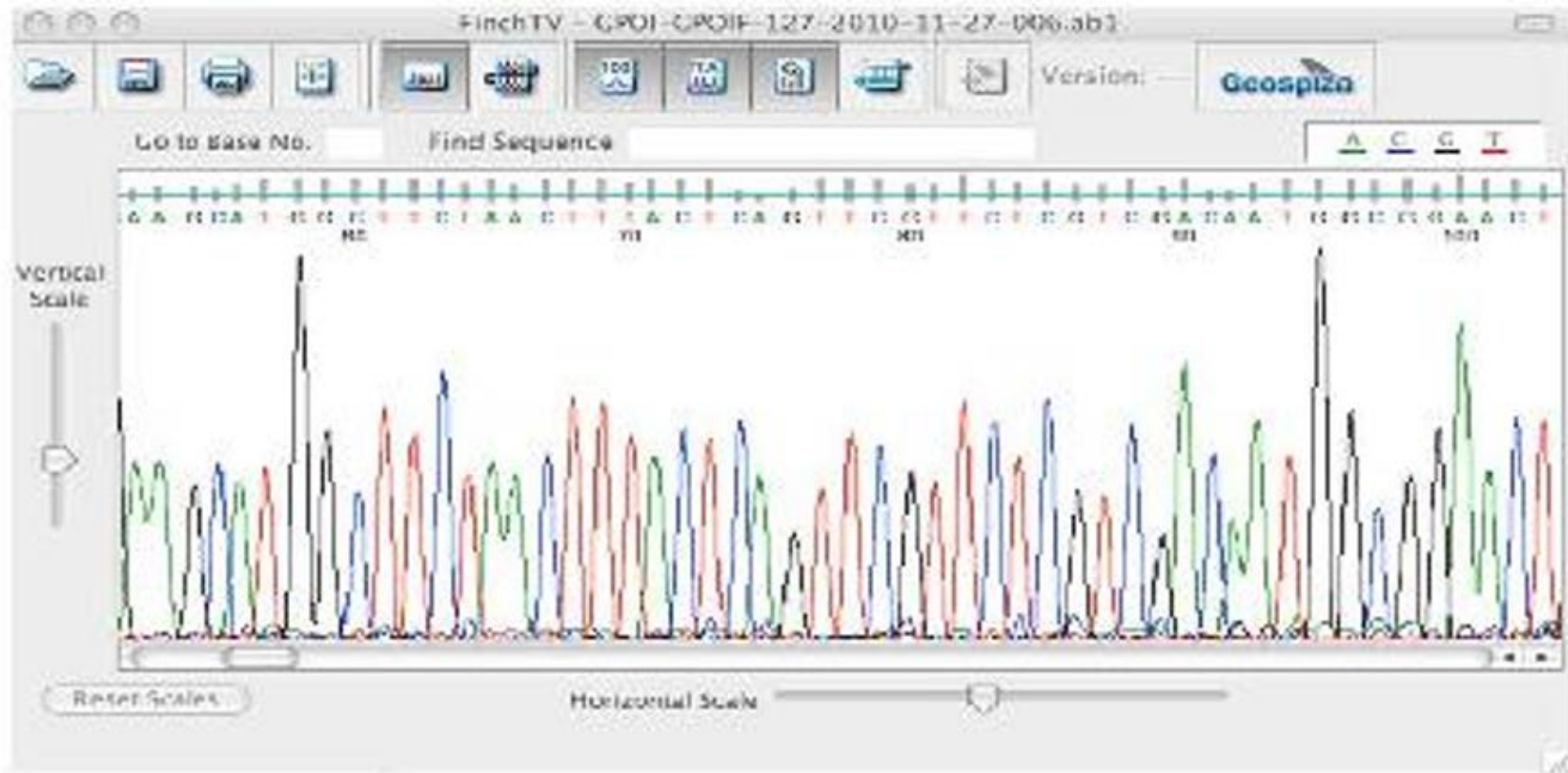


Figura 6. Las construcciones fueron secuenciadas para garantizar la identidad de los controles. Se muestra una porción del fragmento de amplificación secuenciado. Note; la definición de los picos de la reacción.

clonado en un vector pCR 2.1TOPO, vector de clonación. El estándar de DNA de Adenovirus Humano y del genotipo 41 fueron adquiridos del American Type Culture Collection (ATCC VR-930D). Los amplicones obtenidos de una reacción de PCR punto final fueron subsecuentemente clonados a vector plasmídico (pCR2.1-TOPO), usando la transformación química "one-shot chemical transformation" como fue descrita por el fabricante (TOPO TA Cloning Kit for secuenciación; Invitrogen, Carlsbad, CA).

La construcción con el plásmido fue purificada en columna y ajustada a 2×10^8 copias/ μL como solución stock del estándar. El estándar fue diluido a un título de 10^5 y hasta 10^1 copias para calibrar la concentración del gen blanco para detectar el genotipo de bacteriófago FRNA.

3.7.2 Extracción de ácidos nucleicos:

Extracción de RNA viral.

Los ácidos nucleicos virales fueron extraídos de las muestras utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA.) siguiendo el protocolo del fabricante.

Extracción de DNA viral.

Se seleccionó el kit QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen, Valencia, CA). Para remover inhibidores ambientales (Sambrook & Russell David, 2001) se llevaron a cabo los lavados habituales y adicionalmente, se acopló un protocolo de ultra filtración descrito por Rodríguez *et al.*, (2012) (Rodríguez, Thie, Gibbons, & Sobsey, 2012). Todos los extractos fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

3.7.3 Transcripción reversa de bacteriófagos FRNA.

Oligonucleótidos anti sentido específicos de cada uno de los genotipos de los bacteriófagos FRNA, descritos por Ogorzaly, fueron empleados para iniciar la reacción. Para máxima sensibilidad se empleó la transcriptasa reversa, SuperScript

III (Life technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 5 min a 65°C para eliminar estructuras secundarias, 7.5 µL RNA fueron preparados. A continuación, el cDNA fue sintetizado a 50°C por 1 h en termociclador (GeneAmp PCR system 9700, Life technologies, Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.8 Cuantificación de genomas de Adenovirus Humano, Adenovirus 41, y bacteriófagos FRNA genotipos I, II y III.

Todas las muestras fueron amplificadas usando el sistema de PCR en tiempo real 7500 (Life technologies Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada muestra (i.e., extractos de DNA viral o retro transcritos de cDNA), así como el control positivo fueron ensayados en triplicado. Todas las determinaciones de bacteriófagos y virus por PCR incluyeron como control negativo la mezcla de reacción (H₂O grado PCR sin templado).

3.8.1 Mezcla de reacción.

La reacción de PCR en tiempo real para HADV fue llevada a cabo en un volumen de 20 µL con 10 µL de TaqMan Master Mix, 1 µL 10 µM del oligonucleótido forward, 1 µL del oligonucleótido reverse (10 µM), 0.6 µL de prueba TaqMan 10 µM, y 5 µL DNA de la muestra o estándar.

3.8.2 Condiciones de amplificación.

Adenovirus Humano.

El perfil térmico consistió en un ciclo a 95°C (15 min); 45 ciclos a 95°C (15 s), 55°C (33 s) and 72 °C (33 s).

Adenovirus 41.

El programa de PCR tiempo real consistió en 15 min a 95°C, seguido de 45 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 33 s, y 72°C por 33 s.

Genotipos del bacteriófago FRNA.

Fueron amplificadas con el siguiente programa: 15 min a 95°C, seguido por 45 ciclos a 95°C por 15 s y 60°C por 60 s.

3.9 Métodos estadísticos.

3.9.1 Insumos.

Para responder la primera pregunta se contó con una base de datos producto de diez años de esfuerzo de muestreo y análisis del grupo de Ecología Química del Instituto de Ecología. UNAM, dirigido por la Dra. Marisa Mazari Hiriart. Dicha base de datos contiene 315 observaciones en los sistemas arriba mencionados.

A manera de un control de calidad, para identificar las observaciones fuera de intervalo, y duplicación de observaciones como se mencionó líneas arriba.

Así como los datos completos de las variables fisicoquímicas; conductividad, oxígeno disuelto, pH, temperatura, en todas las observaciones, en tanto que en lo que respecta a las variables de indicadores bacteriológicos y nutrientes; el número de colonias de enterococos fecales y la concentración de NH_3 fueron las mediciones que contenían el menor número de datos perdidos.

El título de cada microorganismo fue transformado a logaritmo base 10, ordenado en percentiles y la linealidad fue determinada usando Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Los análisis estadísticos multivariados se llevaron a cabo usando el software XLSTAT versión 13.4.03 (Addinsoft, Paris).

3.10 Análisis multivariados

Un árbol de clasificación -regresión fue generado empleando la rutina basada en el algoritmo CHAID. La transformación a logaritmo base 10 del título de enterococos fecales se ordenó en una serie de grandes percentiles, mismos que fueron tomados como la variable dependiente en la construcción del árbol. El conjunto mínimo de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos de cada

observación (variables para la medición de la calidad de agua recién mencionadas), fueron usadas para explicar dichos percentiles.

Para identificar las variables más destacadas por percentil, establecer las correlaciones e identificar los procesos e hipótesis de contaminación que, a lugar, se realizó una regresión tipo "PLS" y Análisis de Componentes Principales (ACP).

Para definir el potencial de indicadores moleculares de virus entéricos, se exploraron los paralelismos entre los indicadores virales a lo largo de los percentiles de enterococos fecales mediante ACP y un análisis factorial para explorar las correlaciones entre variables fisicoquímicas entre la hipótesis de contaminación y los indicadores moleculares (bacteriófagos FRNA grupos I, II y III, adenovirus humano y adenovirus genotipo 41) para los puntos de muestreo. Finalmente, las variables más importantes para explicar el comportamiento de los indicadores de virus, en cada percentil fueron incluidas en un análisis de regresión tipo "PLS".

Esta hoja fue dejada en
blanco de forma intencional

Capítulo 4

Resultados

4.1 Estandarización del método de cuantificación de genomas por qPCR.

Los resultados de la estandarización del método de detección de bacteriófagos FRNA, parte del aislamiento de agua residual del bacteriófago FRNA cuya secuencia corresponde al genotipo II. El aislamiento ambiental y los bacteriófagos FRNA tipo fueron cultivados en *Escherichia coli* k12.

Los productos de amplificación por RT-qPCR que se muestran en la figura 5, fueron clonados exitosamente en el vector pCR2.1-TOPO y empleado en la construcción de una curva patrón como se describe en la sección de material y métodos. El mismo procedimiento, se siguió en la construcción de las curvas patrón para adenovirus humano y para el genotipo 41, a partir de la amplificación de DNA.

4.2 Control de calidad de las reacciones de qPCR

El límite de detección se calculó en 2 fentogramos, lo que corresponde aproximadamente a 10 genomas. Para cada uno de los ensayos de qPCR se registró el coeficiente de determinación R^2 y la pendiente, que en promedio fue de 0.986 y 3.48, respectivamente.

Tabla 1. Parámetros de control de calidad de la qPCR en la amplificación de indicadores virales

Detector	Pendiente	Intercepto	R ²	Límite de detección (fg)	Rango dinámico
ADVH	-3.758874	46.970768	0.98634	2	20fg-200pg
adv41	-3.179571	34.551502	0.992983	2	20fg-200pg
FRNAGI	-3.469521	39.882114	0.994887	2	20fg-200pg
FRNAGII	-3.557347	47.73193	0.995316	2	20fg-200pg
FRNAGIII	-3.517509	42.449028	0.982401	2	20fg-200pg

4.3 Depuración de la base de datos de calidad de agua del laboratorio de Ecología Química y selección de variables.

En la selección de sitios de muestreo, se analizó y depuró la base de datos del grupo de Ecología Química, con la finalidad de eliminar para el análisis los registros con valores físicamente imposibles, identificar las observaciones con variables faltantes, y relación entre variables por percentil de enterococos fecales. El análisis de los datos demostró en una serie de regresiones lineales que el número de enterococos y la concentración de oxígeno por percentiles del logaritmo de enterococos fecales se puede explicar a través de una regresión lineal, aunque sus pendientes son de signo contrario y la desviación estándar entre observaciones es significativamente mayor para mediciones de oxígeno dentro de un mismo percentil, en comparación al número de enterococos. En tanto que fue, el modelo polinomial fue, el que mejor explica las concentraciones de amonio ($r^2=0.93$) como ha sido descrito con anterioridad.

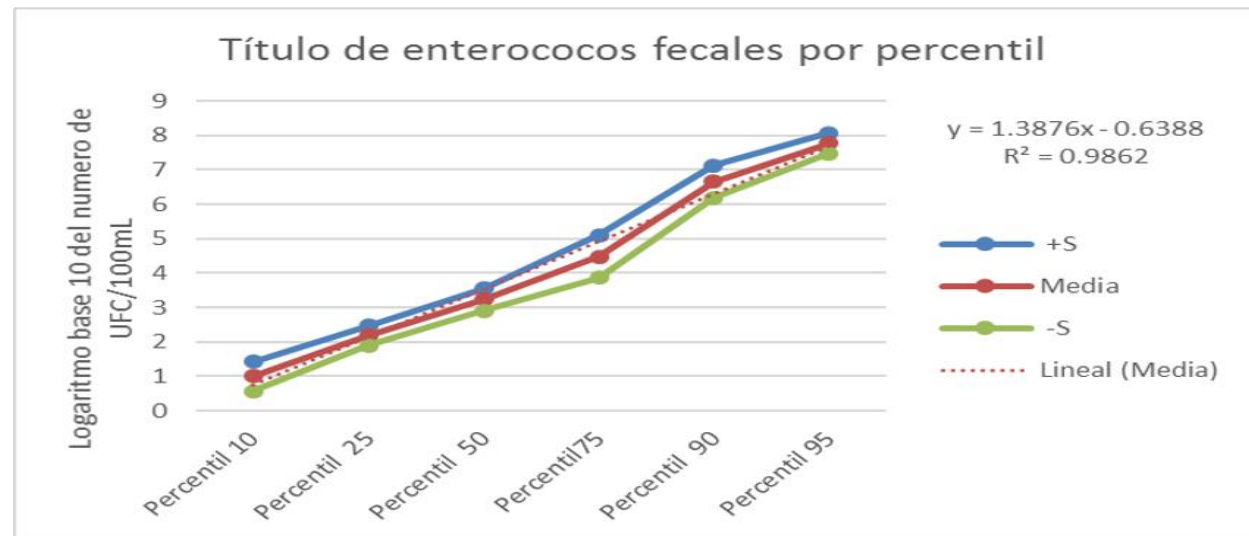
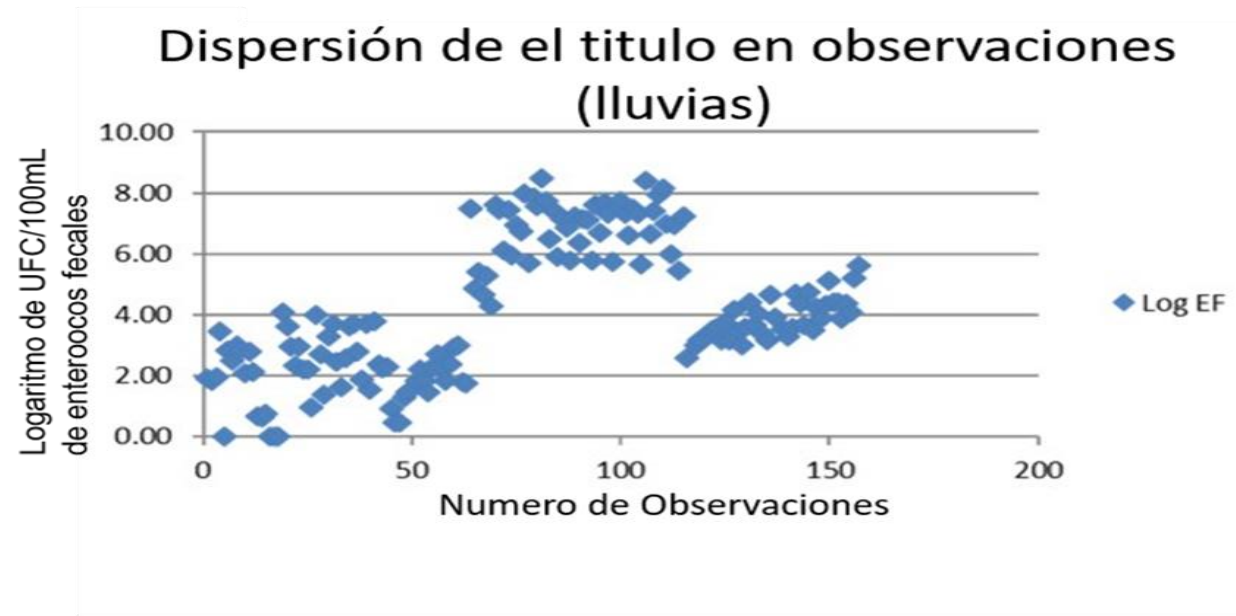
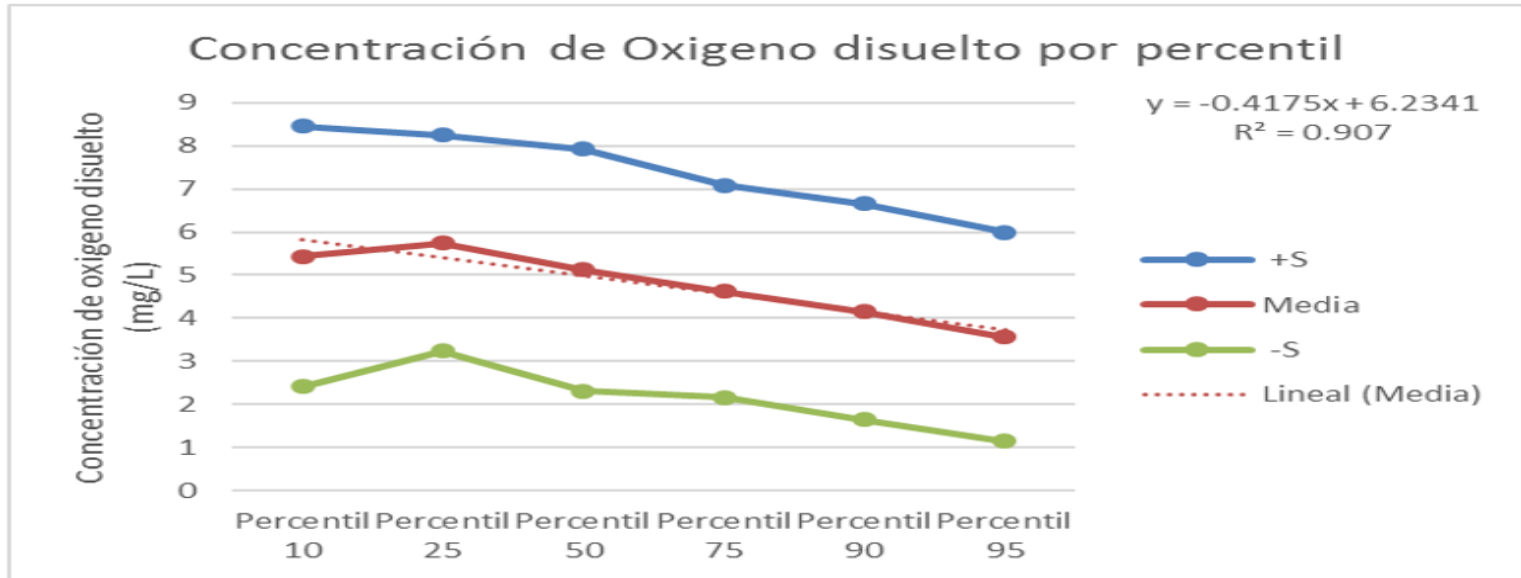


Figura 7. Depuración de bases de datos de calidad de agua. A) Dispersión de valores observados para el logaritmo de enterococos fecales. B) Regresión lineal para el numero de enterococos fecales por percentil..

A



B

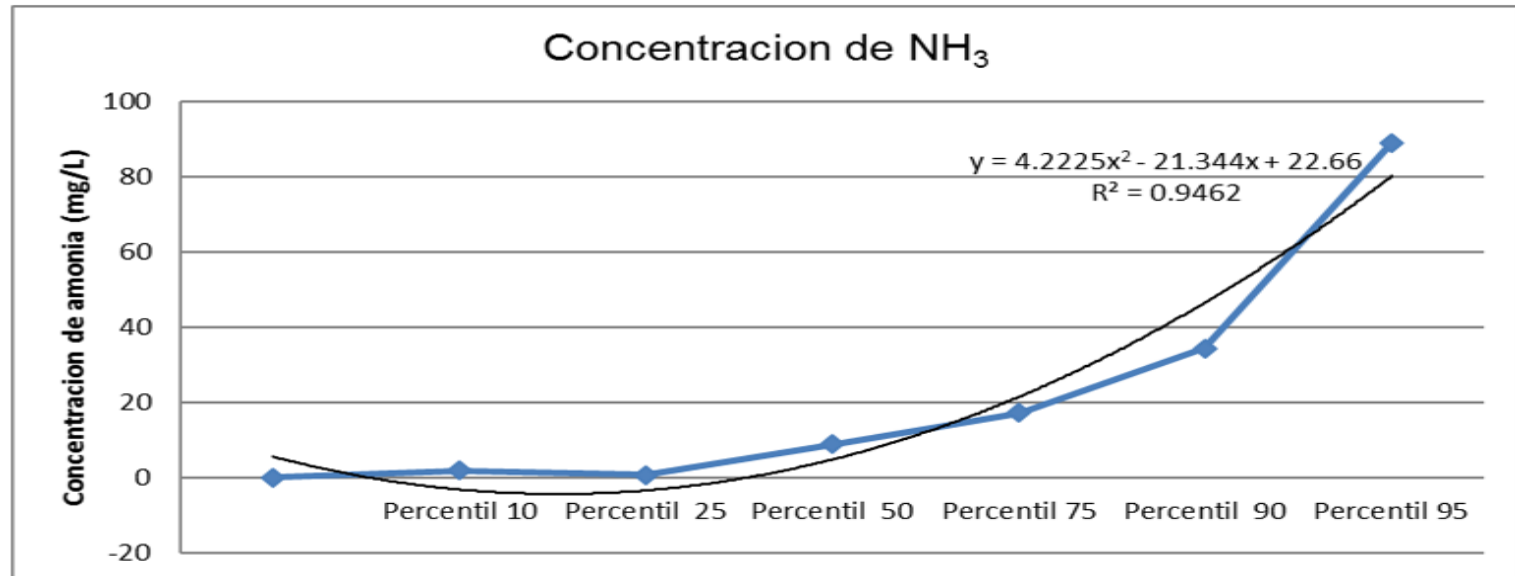


Figura 7. A) Concentración de Oxígeno Disuelto. Observe la amplitud en la desviación estándar (S) B) Concentración de NH_3 por percentil de enterococos fecales, Notar aumento después del percentil 50°

4.4 Resultado de análisis estadísticos multivariados.

En un segundo momento el análisis de componentes principales para las observaciones con registros completos de las variables seleccionadas (pH, conductividad, oxígeno disuelto, unidades formadoras de enterococos, temperatura y amonio) muestra las colindancias en el espacio de estas variables y la colindancia entre observaciones de un mismo percentil o grupos con características semejantes.

4.4.1 Análisis de Componentes Principales y regresión “PLS”

En el primer decil de muestras de agua (título de enterococos fecales entre 0.4 y 1.74 unidades logarítmicas), la media, alcanzó el 59% (1.17 unidades logarítmicas) del máximo del grupo. La concentración media de oxígeno disuelto tuvo un valor de 5.98 mg/L, y la concentración media de NH₃ alcanzó 0.37% del valor máximo del grupo (1.13 mg/L). La variable con la mayor desviación estándar fue la temperatura (37% ó 7.9°C), seguido de la conductividad eléctrica (30%) y el título de enterococos fecales en unidades logarítmicas (30.8%). Los primeros tres factores del análisis mostraron significancia, cada factor “F”, es una combinación de variables latentes que corresponde a las variables originales, y explicó 44.64% de la varianza de observaciones en percentil de “muy buena calidad”. F1 que explicó el 27.25% de la varianza, se conforma con las siguientes cargas; conductividad eléctrica (0.908) y temperatura (0.537), ambas correlacionan de forma negativa con la concentración de oxígeno disuelto (-0.604). Las diferencias en temperatura y conductividad eléctrica se deben al origen de las muestras, el Río Cuixmala, con un recorrido más largo y cercano a la línea de costa, (767 μ S/cm), y temperatura de 28.7°C vs 12.5 °C en muestras de la cabecera del Río Magdalena, en donde se determinó una conductividad eléctrica de 104 μ S/cm. Además, el flujo turbulento en este último río oxigena el agua (5.9 mg/L). En contraste, una menor velocidad de flujo y mayores temperaturas como las del Río Cuixmala, se asociaron a menor concentración de oxígeno disuelto en comparación.

El componente principal, F2 explicó el 17.39% de la varianza del conjunto de muestras y mostró cargas positivas para NH_3 (0.855) y enterococos fecales (0.383), que representan la actividad biológica. Las mayores concentraciones de NH_3 en el grupo corresponden a muestras del manantial “Cerro Colorado” en el Valle del Mezquital, que recibe agua residual infiltrada a través del suelo. El nivel de NH_3 en el manantial “Cerro Colorado” fue 75 veces mayor que en el resto de las demás observaciones del percentil, a pesar de que el título máximo de enterococos fecales fue de solo 1.074 unidades logarítmicas en el Río Magdalena (6.41 veces mayor que en el Río Cuixmala en Jalisco, México).

Mientras que F3 tuvo cargas positivas para pH (0.412). A pesar de que no se detectaron diferencias significativas respecto de los valores de pH, los datos se dispersan, del primer cuartil que fue aproximadamente 20% del valor máximo de grupo, al tercer cuartil que fue 64% del valor máximo, que tuvo lugar en la parte alta del Río Magdalena. Coincidente con el menor recorrido del agua y los suelos volcánicos, la conductividad eléctrica del agua fue menor ($45 \mu\text{S}/\text{cm}$).

La regresión tipo “PLS” mostro que las variables; oxígeno disuelto y NH_3 son las que explican mejor el título de enterococos fecales, sugiriendo que podrían ser usadas como proxy, hasta un título de 1.73 unidades logarítmicas del título de enterococos fecales. Cuando se incluyeron en el análisis factores, el número de genomas de bacteriófagos FRNA GI y GIII, el primer factor (F1), fue suficiente para explicar la varianza del conjunto de observaciones en agua de “muy buena calidad”. Las cargas para GI y GIII se correlacionaron de forma negativa con la carga de enterococos fecales, lo cual establece el límite inferior del título de enterococos fecales (1.8 unidades logarítmicas), por debajo del cual no es posible determinar el origen de la fuente. Las variables más importantes para explicar el número de bacteriófagos FRNA fueron; el título de enterococos fecales, el número de genomas de bacteriófagos GIII y la temperatura del agua. Los enterococos fecales en estas muestras de agua pueden haberse originado en fuentes no puntuales.

Para los percentiles 10 al 25 (1.75 a 2.66 unidades logarítmicas de enterococos fecales), tres factores de análisis resultaron significativos, explicando el 33.55% de la varianza. El primer factor, que explica el 19.65% de la varianza mostro cargas positivas con la temperatura (0.690), conductividad eléctrica (0.615), y NH_3 (0.315). F2 mostro carga positiva para la concentración de oxígeno disuelto y para el título de enterococos fecales. El primero, tiene correlación negativa con NH_3 . Los puntos de muestreo con mayor conductividad eléctrica y concentraciones más altas de NH_3 se ubican cerca de la línea de costa y áreas con uso de suelo predominantemente de tipo agrícola en la zona rural de Cuitzmala o en el Xochimilco semi-urbano.

Los títulos más bajos de enterococos dentro del percentil, tuvieron lugar en puntos de muestreo cerca de la cabecera de los Ríos Cuixmala y Magdalena, donde la temperatura es menor y la concentración de oxígeno más alta. El título de enterococos más alto del percentil, correspondió a muestras relativamente alcalinas (pH de 8.7), de mayor temperatura (28.8°C) y conductividad eléctrica en la periferia de las localidades rurales y semi urbanas, donde la concentración de NH_3 es intermedia en comparación con el resto de las observaciones dentro del percentil (min 0.03 mg/L, max 6.1 mg/L). Es posible que las concentraciones más altas de NH_3 , aunque variables, se relacionen con la oxidación de la materia orgánica, un fenómeno común en humedales.

En el análisis de factores se observe que el bacteriófago FRNA GI y el título de enterococos fecales correlacionó fuertemente. La variable pH, que pertenece a F3 corre en paralelo de los dos indicadores microbiológicos antes mencionados. El número de genomas de bacteriófago FRNA GIII, aún en el mismo cuadrante, está menos relacionado con los otros. Sin embargo, esta anti-correlacionado con la temperatura, lo cual es debido a que este grupo no fue detectado en muestras del Río Cuixmala.

Respecto de los percentiles 25 a 50, los primeros dos factores (F1 y F2) explican el 41.58% de la varianza. F1 (28.32%) mostro carga positiva para las variables; concentración de oxígeno disuelto y pH, en puntos de muestreo en una marisma

costera y el humedal de altura, Xochimilco. Una tasa respiratoria mayor a la tasa fotosintética, podría ser la explicación de este factor biogeoquímico. En las observaciones del percentil, la variable NH_3 se comportó de modo que, 60% de las muestras tuvieron concentraciones menores a 1 mg/L, en tanto que otras, mostraron concentraciones tan altas como 10 mg/L, que representó el 2% de la frecuencia acumulativa. F2 mostró una carga positiva importante para la variable temperatura, pero negativa, respecto del título de enterococos fecales. Las temperaturas más altas fueron registradas en la parte baja de la Cuenca del río, junto con los valores más bajos de enterococos de las muestras que se agrupan en el percentil. Del mismo modo, F3 presentó cargas negativas para la conductividad eléctrica NH_3 . Los vectores de conductividad eléctrica y amonio se separan por los puntos de muestreo con posible influencia marina. Aparte de eso, la conductividad se relacionó con fuentes puntuales de agua residual y sitios cercanos a áreas de cría de ganado. En base a la regresión tipo "PLS", las variables más importantes o explicativas fueron temperatura y concentración de oxígeno disuelto, en tanto que el pH resultó marginal.

Respecto del percentil 50°, (Título de enterococos fecales 3.77 a 5.80 unidades logarítmicas), F1; las variables con cargas positivas fueron, el título de enterococos y la concentración de NH_3 , que se relacionaron en forma negativa con la temperatura. Estos factores reflejarían contaminación fecal humana, acumulación de descargas al Río Magdalena en dentro del área urbana y asentamientos irregulares en Xochimilco. F2 tuvo cargas significativas de signo negativo para la concentración de oxígeno disuelto (0.602) y cargas positivas para conductividad eléctrica (0.375). Un gradiente de concentración de oxígeno fue observado en el límite del área rural en la cuenca del Cuixmala. Observaciones en muestras anaerobias, valores de pH ácidos, y un incremento de la conductividad eléctrica fue común en canales pequeños de Xochimilco.

La variable más importante para explicar el título de enterococos fecales en las muestras agrupadas en este percentil fue, la concentración de NH_3 , que está asociado con descarga puntuales, y la temperatura del agua.

Los bacteriófagos FRNA de los genotipos GI y GIII correlacionaron el título de enterococos fecales. La variable que representa el número de genomas del bacteriófago FRNA GIII, se aproxima al comportamiento de la variable pH, y ambas están inversamente correlacionadas con la temperatura. La mejor correlación se da entre la variable bacteriófago FRNA GI y la conductividad eléctrica en agua del Río Magdalena en el área de crecimiento de la mancha urbana y en la principal localidad en la cuenca de parte media -alta de la cuenca del Río Cuixmala, (la Eca).

Para el grupo de observaciones agrupadas dentro del percentil 75° al 90°; observaciones con títulos de enterococos entre 5.92 y 7.33 unidades logarítmicas, pertenecen al área urbana del Río Magdalena, y el punto de muestreo denominado “San Cristóbal”, en el humedal de altura Xochimilco. Los primeros dos factores son significativos, explicando el 30.5% de la varianza, este factor fisicoquímico mostró que la conductividad se incrementa consistentemente con la acumulación de agua residual. Los vectores de la conductividad eléctrica y de la temperatura, se mantienen casi paralelos, Con la conductividad más alta registrada tuvo lugar en un punto de muestreo, inmediatamente antes de que el Río Magdalena fluya al Sistema de drenaje de la Ciudad de México. En contraposición, las muestras mejor oxigenadas del grupo, se encontraron en el área urbana y presa Endhó, donde se precipitan el material más pesado. Las variables explicativas fueron el pH y temperatura.

Se observa una buena correlación entre el título de enterococos fecales, la conductividad eléctrica y el bacteriófago FRNA GIII. En términos absolutos, el número de genomas del genotipo GI sobrepasó al de GIII en la sección del Río Magdalena que es impactada por agua residual.

Del percentil 90° en adelante, (7.39 a 8.4 unidades logarítmicas), los primeros dos factores explican el 36.77% de la varianza. Las variables con cargas positivas, NH_3 (0.9935) y enterococos fecales (0.550), indican la naturaleza del agua residual urbana. El vector que representa en la concentración de oxígeno disuelto fue insustancial, debido a que todas las observaciones son de muestras anaeróbicas. El segundo factor, F2, tuvo cargas positivas para las variables de temperatura (0.555),

y negativas para pH (<0.630). La temperatura del agua fue más fría y el pH más alcalino en puntos de muestreo del área urbana que en el efluente de la presa Endhó.

Distribución de observaciones según aporte en tres componentes principales

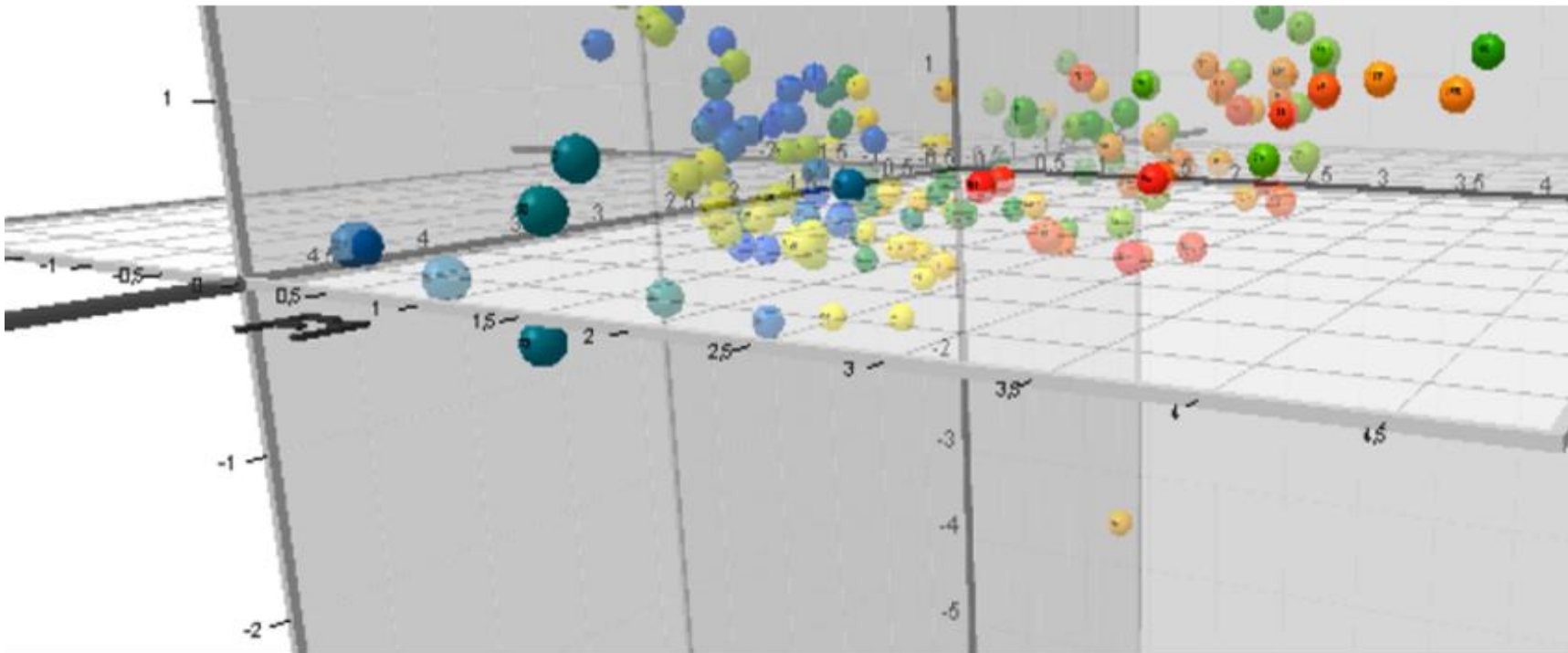


Figura 9. Representación espacial de la distribución de observaciones de calidad de agua producto de Análisis de Componentes Principales de 315 observaciones.

La escala de colores el valor respectivo en F1 y F2 con carga positiva de las variables título de enterococos fecales, amonio , conductividad; concentración de oxígeno, temperatura y pH respectivamente .

4.4.2 Árboles de Clasificación-regresión

Por otra parte, la elaboración de un árbol de decisión para categorizar cada percentil del número de enterococos en una clasificación en relación a puntos de corte para las otras variables de calidad de agua. El resultado permitiría predecir los intervalos de cada variable asociados a un percentil y calidad de agua como se resume adelante.

- **Percentil 90 y superior (muy mala calidad).** Dos nodos terminales con una pureza del 100 y 75%, definen mala calidad de agua; concentraciones de amonio superiores a 37.81 mg/L, un título de enterococos fecales entre 7 8.4 unidades logarítmicas y conductividad eléctrica entre 1092 y 1200 $\mu\text{S/cm}$.
- **Percentil 75 (Mala calidad)** La mala calidad se definió por una concentración NH_3 de 37.81 mg/L, un título de enterococos fecales de 6.8 unidades logarítmicas y una temperatura máxima de 23°C.
- **Percentil 50 (calidad media).** La calidad media del agua se catalogó por los siguientes valores: Un título máximo de enterococos fecales de 6.8 unidades logarítmicas. El límite inferior en la concentración de NH_3 fue de 18.6 mg/L en el 91% de los casos. Muestras con un título enterococos fecales menor a 5 unidades logarítmicas y valores de pH en el intervalo de 1.97 a 3.39, con una conductividad eléctrica por arriba de 495 $\mu\text{S/cm}$ (Pureza = 100%).
- **Percentil 25 (Buena calidad).** Agrupa observaciones con una concentración máxima de oxígeno disuelto de 6.8 mg/L, temperaturas por arriba de 29.9°C y de hasta 32°C, y un valor de pH entre 6.92 y 8.23 en el 76% de los casos.
- **Percentil 10 (Muy Buena calidad).** Título de enterococos fecales menor a 4.92 unidades logarítmicas. Las observaciones de buena calidad de agua

muestran conductividad eléctrica con un límite inferior de 484 y un límite superior de 2,260 $\mu\text{S}/\text{cm}$, temperatura máxima de 29 °C y una concentración mínima de oxígeno disuelto de 6.8 mg/L, para una pureza del grupo de entre 89 y 91%.

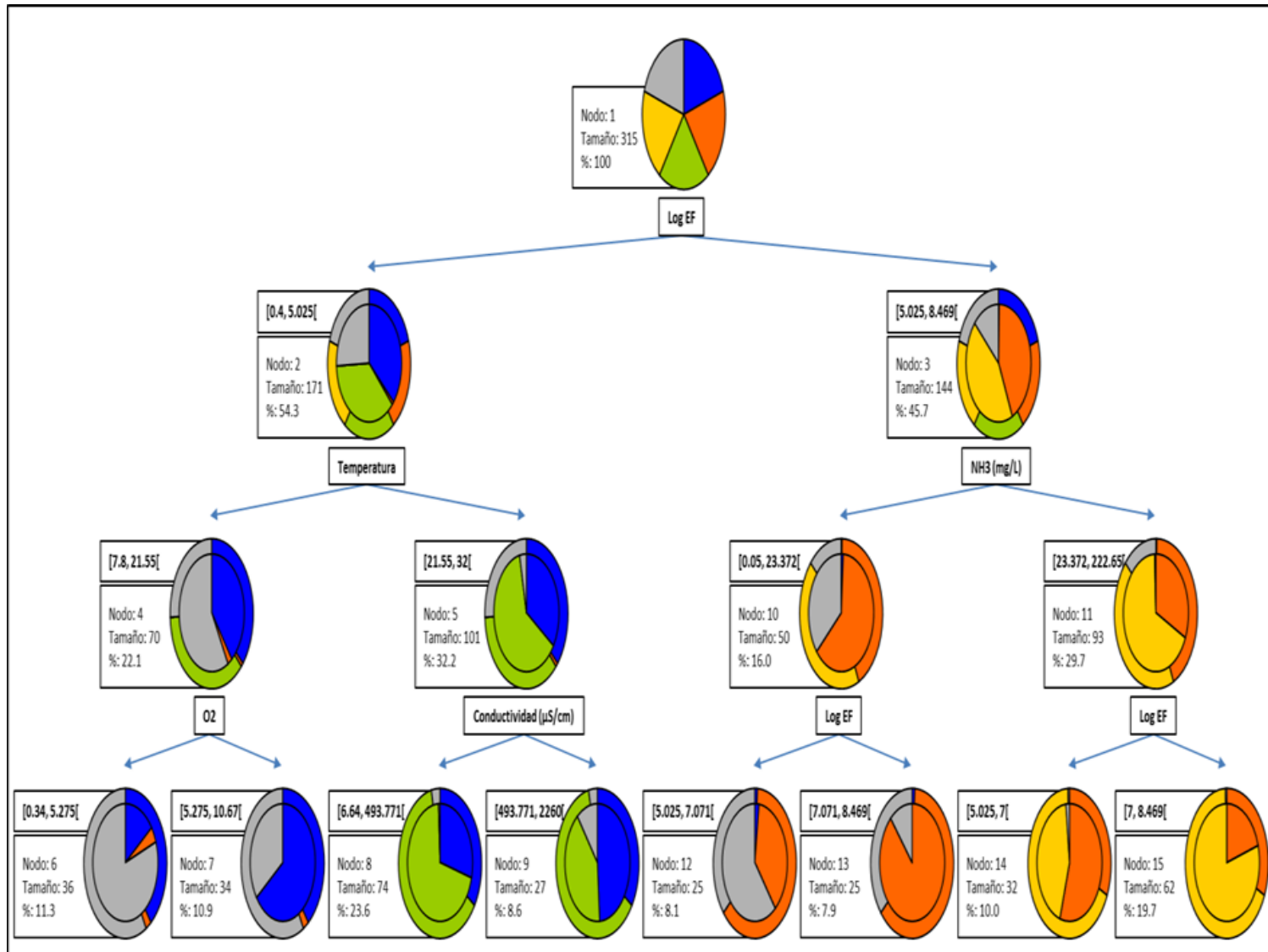


Figura 10. Arbol de decisión-regresión. Se observa la clasificación por percentiles del numero de enterococos y el intervalo en que cada variable se asocia a esta clasificación.

4.5 Cuantificación de enterococos fecales e indicadores virales en agua

Los bacteriófagos FRNA genotipos I (GI), genotipo II (GII) y genotipo III (GIII) fueron detectados y cuantificados por RT-qPCR a lo largo del intervalo de enterococos fecales. El GI y el III mostró un comportamiento similar, excepto que, el GIII fue predominante sobre de el genotipo I en la mayoría de los percentiles de concentración de enterococos fecales, especialmente por arriba del percentil 50. Las proporciones no fueron constantes para todas las muestras. El GIII no fue detectado en ninguna muestra del Río Cuixmala; Sin embargo, en general, el número de bacteriófagos fue el más bajo en los puntos de muestreo de este río. Al comparar el número de genomas de bacteriófagos FRNA de entre los percentiles y 25°, el número de genomas fue mayor en el percentil 10° debido al origen de la muestra (agua residual filtrada a través del suelo y emergiendo en el manantial de Cerro Colorado) en el Valle del Mezquital.

El número de genomas del genotipo GII de bacteriófago FRNA consistentemente sobrepasó el número de genomas de los genotipos GI y GIII, casi duplicando el número de genomas de GI. El menor título de enterococos en muestras positivas para adenovirus fue 3.76, con (HADV=1.82 log genomas/100 mL) y adenovirus genotipo 41 (ADV41= 2.73 log genomas/100 mL). La tasa de ADV41/HADV varió en un intervalo de entre 0.76 en el área agrícola semi-urbana y hasta 0.66 en la proximidad de una fuente puntual de agua residual tratada en el humedal tropical de altura en Xochimilco tropical y de 0.54 en el área urbana del Río Magdalena, lo que indica que ADV41 representó por lo menos la mitad del total de HADV. Esto no es sorprendente debido a que adenovirus 40 and 41 son reportados frecuentemente como los genotipos predominantes en agua residual.

Como era de esperarse, los valores más altos de todos los indicadores se registraron en el agua residual en la zona agrícola del Valle del Mezquital, donde también se

determinan un número de genomas similar de los genotipos I y III del bacteriófago FRNA. Proporcionalmente el número de enterococos es mayor que el de los

Indicadores microbiológicos

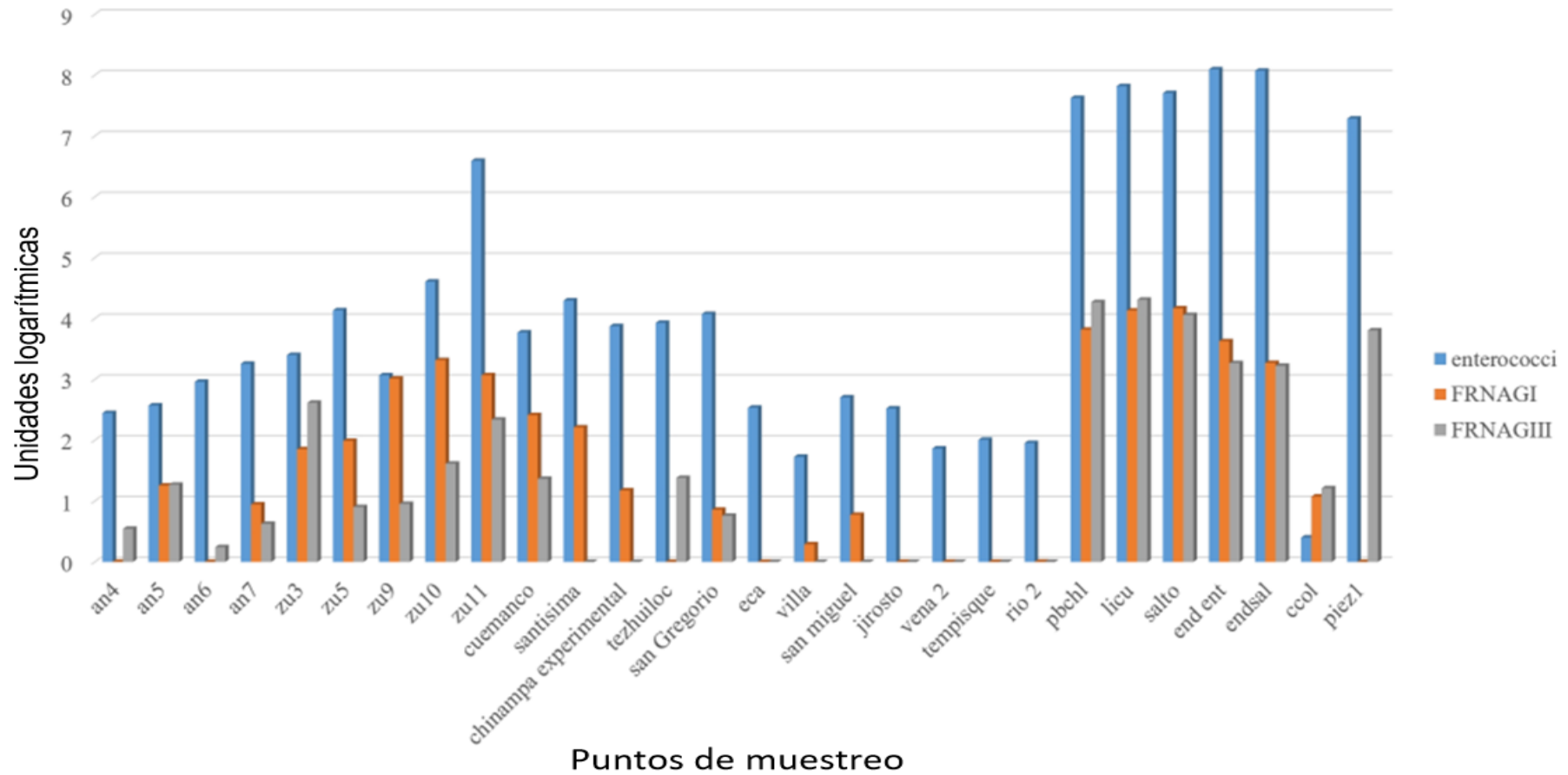


Figura 11. Se observa en escala logarítmica el número de enterococos fecales por cultivo y el de genomas de los bacteriófagos FRNA Gi y III en muestras de agua de diferente calidad en México

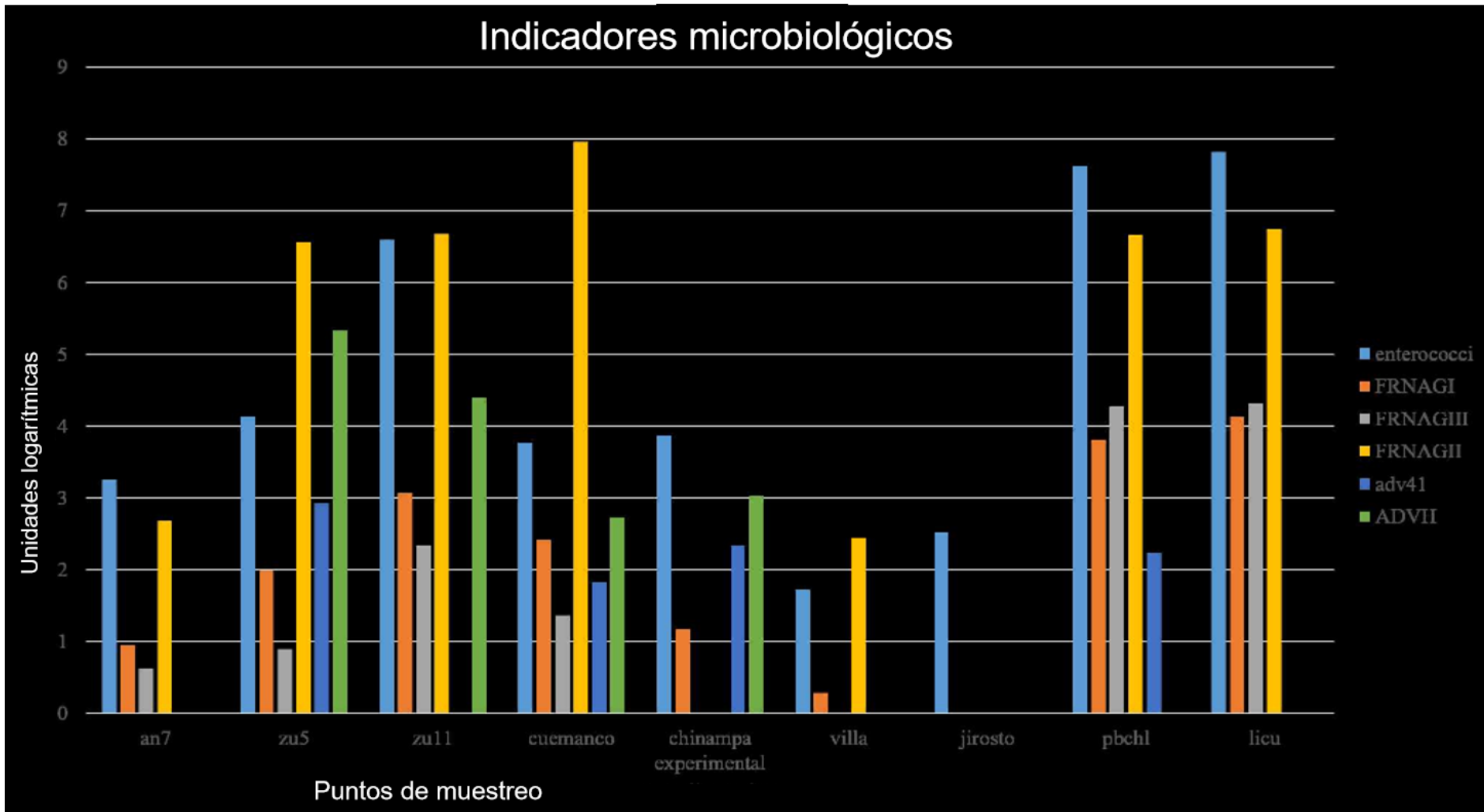


Figura 12. Comparación del título entre indicadores asociados a virus entéricos en una subpoblación de muestras de agua en México.

bacteriófagos FRNA, con la excepción del sitio “Cerro Colorado”, un manantial que se alimenta de agua residual. En un subconjunto de sitios, en los que se analizaron además de los genotipos I y III, el número de genomas de bacteriófagos FRNA del genotipo II, se determinó una fuerte asociación entre el genotipo II y adenovirus humano numéricamente más abundante.

Artículo publicado: FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems

Esta hoja fue dejada en
blanco de forma intencional

Capítulo 5

Discusión y Conclusiones

A pesar de la expansión del número de sistemas de distribución de agua, que viene aparejado de la tasa de urbanización, la exposición a agua contaminada sigue siendo un riesgo significativo y existe un gran espacio para mejorar la calidad del agua (J. Wolf *et al.*, 2014). En los países de ingresos medios y bajos, se pierden cada año alrededor de 842,000 vidas por falta de saneamiento, higiene de manos inadecuada y por el consumo de agua que bajo las condiciones actuales de tratamiento, no garantiza inocuidad (Prüss-Ustün *et al.*, 2014).

Entre los primeros 5 patógenos causantes de diarrea durante los primeros 24 meses de vida, se destaca que 3 de ellos son agentes virales; Norovirus GII, Rotavirus y Astrovirus (Platts-Mills *et al.*, 2015). Otros protocolos de casos y controles han encontrado que al aumentar la sensibilidad diagnóstica y casi duplicar el porcentaje de atribución, el número de casos de diarrea ocasionados por Adenovirus 40/41 se incrementa hasta cinco veces, ocupando el tercer sitio como agente causal de diarrea solo después de *Shigella* y Rotavirus (Liu *et al.*, 2016).

Sin embargo, el mayor problema que se desprende del estudio de las causas de diarrea comunitaria, es la gran variabilidad temporal y geográfica entre las poblaciones, razón por la cual, de no ser la vacuna contra Rotavirus, las intervenciones dirigidas a un solo patógeno están destinadas a tener un efecto inapreciable sobre la incidencia de diarreas, 80% ligadas al agua (Platts-Mills *et al.*, 2015).

En tanto que nunca se ha puesto en duda el paradigma del indicador, como aquel marcador químico o microbiológico presente siempre que existen patógenos en el agua, que se ha tenido que actualizar en virtud del nuevo conocimiento sobre la

persistencia de los patógenos vs los indicadores, y los riesgos que la contaminación puede acarrear dependiendo de su origen humano o animal y nivel de exposición.

Los enterococos fecales, y *Escherichia coli*, son anaerobios facultativos, y entre los indicadores de contaminación fecal más usados e incorporados en la legislación de numerosos países para advertir riesgos a la salud en actividades recreativas que involucran sumergirse en cuerpos de agua naturales (Ambient Water Quality Criteria, (USEPA, 2017)., 2006/7/EC).

En la comparación del riesgo de padecer síntomas gastrointestinales entre; nadadores en Brasil, expuestos a aguas receptoras de agua residual cruda vs controles, se registró un 11% más de probabilidad de padecer diarrea, vómito, y fiebre por cada unidad logarítmica de aumento en el título de enterococos fecales (Lamparelli *et al.*, 2015). En cambio, tras la exposición a agua sujeta a contaminación difusa (ej., fuentes no puntuales), los reportes en la literatura suelen ser contradictorios. Unos encontrando diferencias tan solo en el riesgo de conjuntivitis y correlación entre bacteriófagos FRNA y enfermedad, pero no con enterococos fecales (Colford *et al.*, 2007). Y en otros estudios, se aprecian los mismos riesgos, que cuando la fuente es puntual (Fleisher *et al.*, 2010).

Especulativamente, las diferencias en estos patrones de riesgo, pueden ser debidas a: i) La contaminación de origen animal comporta diferentes patógenos de la contaminación fecal humana,- especialmente cierto para la mayoría de virus entéricos-, ii) Habitación de indicadores bacterianos, como por ejemplo, enterococos que forman parte de la comunidad bacteriana en suelo (Cui, Yang, Pagaling, & Yan, 2013) y/o en agua, asociado a comunidades planctónicas.

En México, siendo un país ubicado entre los paralelos 14°32'27" y el paralelo 32°43'06", tiene la mayor parte del territorio en el trópico de Cáncer, y una parte significativa de su población en el centro del país, debido la expansión urbana a escala regional (Aguilar, 1999). Con solo un 57% de los efluentes tratados, aproximadamente la mitad a nivel secundario en todo el país (CONAGUA, 2016), se

requiere definir el intervalo dentro del cual, el título de los enterococos fecales se asocia con la presencia o con el título de virus entéricos en agua.

Conocer el intervalo en que las variables fisicoquímicas definen procesos en el agua, que pueden alterar la correlación, entre los indicadores y patógenos, ya sea en sentido positivo o negativo. No debemos olvidarnos por último que el uso de indicadores tiene consecuencias prácticas, y probar la funcionalidad de indicadores alternativos es también una prioridad.

A nuestro entender, este es uno de los primeros estudios que investiga la relación numérica de indicadores alternativos de virus entéricos y de contaminación fecal en cuerpos de agua ubicados en cuencas con diferente uso de suelo, en una región tropical.

De las variables fisicoquímicas y su relación con el título de enterococos fecales.

Las únicas dos variables del conjunto de parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos explorado (pH, conductividad, oxígeno disuelto, NH_3 , título de enterococos fecales), - aparte del título de enterococos que se empleó para definir los percentiles- y que mostraron un valor del coeficiente de determinación muy significativo, (Regresiones lineal y logarítmica de 315 observaciones) fueron; la concentración de oxígeno disuelto promedio de cada percentil. Muestra una tendencia negativa, disminuyendo en forma lineal con aumentos progresivos de percentil.

Al igual que lo reportado por Kanenl *et al* (2007), la amplitud de la desviación estándar, limita importantemente el uso de la concentración de oxígeno como indicador único de contaminación fecal (Kannel, Lee, Lee, Kanel, & Khan, 2007). El segundo parámetro, fue la concentración de NH_3 , que muestra un aumento exponencial por arriba del percentil 50º del título de enterococos fecales. A partir de este percentil (límite inferior= 3.77 unidades logarítmicas de enterococos fecales/10mL), se sugiere fuertemente por la presencia de bacteriófagos FRNA y adenovirus, que existe un

impacto por contaminación fecal, a partir de ya sea, a fuentes puntuales o difusas como fosas sépticas y drenajes clandestinos.

La concentración de NH_3 es uno de los parámetros empleados en el mundo, y el indicador más importante en China para establecer los límites máximos que pueden ser descargados por plantas de tratamiento, a cuerpos de agua (Li, Sheng, Zeng, Liu, & Yu, 2012). Interesantemente, Line, (2013) determinó en 7 cuencas en Carolina del Norte, que el NH_3 , es la única variable que se correlaciona de forma significativa con el área impermeable en la cuenca. Es decir, el origen del amonio y el área cubierta por la mancha urbana tienen un mismo origen.

Caso especial, está representado por el agua superficial proveniente de manantiales de acuíferos que son alimentados con agua residual, una estrategia para el manejo de agua que está siendo cada vez más empleada. Con una concentración de NH_3 , fue 75 veces mayor a la media del percentil de enterococos fecales, la cuantificación de bacteriófagos FRNA de genotipos asociados al humano en agua del manantial Cerro Colorado en el Valle del Mezquital, Hidalgo, que es usado como fuente de agua para producción de agua potable, da cuenta de la necesidad de utilizar indicadores de contaminación fecal alternativos, especialmente aquellos asociados a virus entéricos.

Sucede que el NH_3 , puede estar anti-correlacionado con la concentración de oxígeno disuelto, por el consumo de este último en la descomposición de la materia orgánica. Este efecto fue notorio en observaciones del percentil 50 en adelante. El NH_3 así mismo, puede acceder a los cuerpos de agua por un exceso de fertilizantes aplicados en forma de sal al suelo de cultivo y el subsecuente lavado por la lluvia.

En tanto que las observaciones de los percentiles bajos (10-25) coincidentemente muestran correlación positiva entre la concentración de NH_3 y la conductividad, para algunas observaciones, en el Río Cuixmala, la correlación puede ser espuria, no pudiéndose descartar que la conductividad sea debida a la influencia marina.

A pesar de ello, se ha descrito que la entrada de indicadores bacterianos de contaminación fecal, y bacteriófagos FRNA, predominantemente del genotipo I, tiene lugar en cuencas de uso mixto, pero fundamentalmente agropecuario, en zonas tropicales proviene del suelo (Luther & Fujioka, 2004). Por lo que de ser cierta la correlación, apoyaría la hipótesis de que entre más intensivo es el uso de suelo y la erosión, mayor es el título de bacteriófagos FRNA (Franke *et al.*, 2009).

En la confrontación las correlaciones con los datos de amplificación molecular de bacteriófagos FRNA GI y en menor grado GIII, con la variable pH y el título de enterococos fecales, en observaciones de muestras de Xochimilco y Cuixmala, podría hipotéticamente, explicarse por la adsorción de los indicadores a materia particulada suspendida. Un comportamiento que es reconocido en virus entéricos, -que es debido la carga neta de la cápside, a un pH dado- y que ha sido reportado también para *Escherichia coli*.

Dadas las diferencias en uso de suelo, es significativo que no se detectasen bacteriófagos FRNA del genotipo GIII, que están asociados a la contaminación fecal humana en muestras del Río Cuixmala, y se puede especular, que esto es resultado de la mucho menor densidad poblacional, sumado la menor resistencia de los bacteriófagos FRNA GIII a la temperatura y luz solar. Son también aguas más alcalinas.

A partir del percentil 50°, la correlación entre el número de genomas del bacteriófago FRNA GI y la conductividad eléctrica, podría ser señal de la simple acumulación de iones en el sentido del flujo del agua, -seguramente, debido a influentes no puntuales de aguas residuales domiciliarias- (Aguilar & Santos, 2011), hasta alcanzar un punto máximo, poco antes que Río Magdalena se pierda en el drenaje. En observaciones en Xochimilco, la correlación también se dio con la temperatura.

En los últimos percentiles de título de enterococos fecales, casi exclusivamente observaciones de agua residual en el Valle del Mezquital, que recibe toda el agua residual de la Ciudad de México, que luego es re utilizada con fines de riego, se

correlacionaron formando el título de enterococos fecales y la concentración de NH_3 , dando lugar al primer factor explicativo de la varianza (F1) en este tipo de agua.

Debido a que, en todas las observaciones contempladas en el presente estudio, se detectaron y cuantificaron enterococos, cabía preguntarse; si es posible definir un límite inferior en el título de enterococos fecales, a partir del cual aumentase la probabilidad de detección de indicadores virales y virus entéricos. Más aun, deseábamos saber si se conserva la relación descrita en la literatura entre los genotipos de bacteriófago FRNA GII y GIII con virus entéricos, y así definir la fuente de la contaminación fecal de origen humano.

De un total de muestras 30 muestras, con datos de enterococos fecales y cuantificación de genomas de bacteriófago FRNA genotipo GI y GIII, se seleccionó la tercera parte cuidando que cada percentil de enterococos fecales estuviese representado. En dichas muestras se cuantificó una secuencia específica del genoma del bacteriófago FRNA GII por RT-qPCR, secuencias específicas de Adenovirus humano (comprende 51 genotipos) y adenovirus 41 mediante amplificación por qPCR, como se detalla en la sección de material y métodos.

El uso de la cuantificación molecular de indicadores virales para alertar en tiempo de que está ocurriendo una ruptura en la seguridad del agua, es una de las aplicaciones de tecnología ambiental más necesarias en las áreas pobladas de los países tropicales.

En vista de que la precipitación extrema es una condicionante aleatoria de incorporación de las emisiones de virus al flujo de agua. Evitar las mezclas inadvertidas de agua para uso recreativo, o de fuentes de agua para producción de agua potable, con sobre flujos combinados con el drenaje (CSO), efluente del drenaje o efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales que contienen virus posibilite llevar acciones correctivas.

El indicador idealmente debería servir para clasificar el tipo de agua, informar de la proximidad en tiempo o espacio, ser suficientemente sensible para advertir de las últimas trazas de agua residual y rápido de cuantificar, a fin de poder actuar en tiempo si ocurre una falla en el servicio, tal que se contenga el riesgo a un nivel aceptable de infecciones debidas a virus entéricos.

En este sentido, los bacteriófagos FRNA fueron detectados y cuantificados en muestras de todos los sistemas/uso examinados.

El oxígeno disuelto fue una variable única por cuanto mostró una correlación inversa con los otros parámetros, particularmente con los indicadores moleculares de virus entéricos.

Más aun, el incremento en el número de genomas de los bacteriófagos FRNA genotipo II incremento claramente muestra degradación de la calidad del agua dentro del percentil cincuenta de enterococos fecales y muestras en percentiles subsecuentes. Este indicador se asocia de forma cercana a con el número de genomas de adenovirus humano y de adenovirus genotipo 41.

Se destaca el potencial de los indicadores estudiados para representar el destino de virus entéricos en el centro de México para alertar de una falla en la calidad del agua, como se demostró al detectar genomas de bacteriófagos FRNA en el manantial “Cerro Colorado” que es usado como Fuente de agua para producción de agua potable en el área del Valle del Mezquital. Sin embargo, la limitante de este estudio radica en el pequeño número de muestras de agua consideradas en las primeras categorías, debido a la distribución predicha para virus en agua por la naturaleza transitoria de las emisiones.

Conclusiones

- El árbol de clasificación generado en este trabajo funciona como un algoritmo para calificar a priori la calidad microbiológica de cuerpos naturales de agua en el centro de México.
- El árbol de clasificación puede apoyar la selección de sitios de monitoreo equivalentes, donde ocurren procesos similares.
- Las únicas variables fisicoquímicas que mantuvieron una correlación con el logaritmo de enterococos fecales a lo largo del gradiente de contaminación fueron la concentración de NH_3 y el oxígeno disuelto.
- La detección de molecular de bacteriófagos FRNA tiene utilidad para determinar trazas de contaminación fecal en fuentes de agua en países tropicales.
- Se determinó una relación significativa entre el genotipo II de los bacteriófagos FRNA y adenovirus humano.
- Los bacteriófagos FRNA genotipos I y III están más asociados al logaritmo de enterococos fecales que a virus entéricos y por tanto no representan ventaja con respecto a este último indicador.

Bibliografía

- Aguilar, A. G. (1999). Mexico City Growth and Regional Dispersal : the Expansion of Largest Cities and New Spatial Forms, 23(3).
- Aguilar, A. G., & Santos, C. (2011). Land Use Policy Informal settlements ' needs and environmental conservation in Mexico City : An unsolved challenge for land-use policy □, 28, 649–662. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2010.11.002>
- Anda, J. De, & Shear, H. (2008). Challenges Facing Municipal Wastewater Treatment in Mexico. *Public Works Management & Policy*, 590–598.
- Apha, A. (2005). *WEF (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation.
- Arribas, M., Kubota, K., Cabanillas, L., & Lázaro, E. (2014). Adaptation to fluctuating temperatures in an RNA virus is driven by the most stringent selective pressure. *PloS One*, 9(6), e100940.
- Aslan, a., Xagorarakis, I., Simmons, F. J., Rose, J. B., & Dorevitch, S. (2011). Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1250–1261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05130.x>
- Bae, H.-K., Olson, B. H., Hsu, K.-L., & Sorooshian, S. (2010). Classification and regression tree (CART) analysis for indicator bacterial concentration prediction for a Californian coastal area. *Water Science and Technology*, 61(2), 545–553.
- Bollback, J. P., & Huelsenbeck, J. P. (2001). Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). *Journal of Molecular Evolution*, 52(2), 117–128. <https://doi.org/10.1007/s002390010140>
- Bonifait, L., Charlebois, R., Vimont, A., Turgeon, N., Veillette, M., Longtin, Y., ... Duchaine, C. (2015). Detection and quantification of airborne norovirus during outbreaks in healthcare facilities. *Clinical Infectious Diseases*, 61(3), 299–304.

- Boschi-Pinto, C., Velebit, L., & Shibuya, K. (2008). Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(9), 710–717. <https://doi.org/10.2471/BLT.07.050054>
- Brion, G. M., Meschke, J. S., & Sobsey, M. D. (2002). F-specific RNA coliphages: Occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Research*, 36(9), 2419–2425. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00547-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00547-4)
- Calle, M. L., & Sánchez-espigares, J. A. (2007). Árboles de clasificación y regresión en la investigación biomédica, 129(18), 702–706.
- Camargo, J. A., & Alonso, Ivaró. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- Carey, R. O., & Migliaccio, K. W. (2009). Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems. *Environmental Management*, 44(2), 205–217. <https://doi.org/10.1007/s00267-009-9309-5>
- Chaidez, C., Soto, M., Martínez, C., & Keswick, B. (2008). Drinking water microbiological survey of the Northwestern State of Sinaloa, Mexico. *J Water Health*, 6(1), 125–9.
- Colford, J. M., Wade, T. J., Schiff, K. C., Wright, C. C., Griffith, J. F., Sandhu, S. K., ... Weisberg, S. B. (2007). Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 18(1), 27–35. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000249425.32990.b9>
- Comisión Nacional del Agua. (2012). *Atlas del agua en México 2012*. <https://doi.org/ISBN:978-607-8246-29-8>
- CONAGUA. (2016). *Estadísticas del agua en México*. México. Retrieved from http://201.116.60.25/publicaciones/EAM_2016.pdf
- Cui, H., Yang, K., Pagaling, E., & Yan, T. (2013). Spatial and Temporal Variation in Enterococcal Abundance and Its Relationship to the Microbial Community in Hawaii Beach Sand and Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3601–3609. <https://doi.org/10.1128/AEM.00135-13>
- Curriero, F. C., Patz, J. a., Rose, J. B., & Lele, S. (2001). The association between

- extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *American Journal of Public Health*, 91(8), 1194–1199.
<https://doi.org/10.2105/AJPH.91.8.1194>
- Durán, a. E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., & Jofre, J. (2002). Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 338–347. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x>
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., & Arias, C. F. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, 42(10), 2618–2628.
- Fleisher, J. M., Fleming, L. E., Solo-Gabriele, H. M., Kish, J. K., Sinigalliano, C. D., Plano, L., ... Backer, L. C. (2010). The BEACHES study: Health effects and exposures from non-point source microbial contaminants in subtropical recreational marine waters. *International Journal of Epidemiology*, 39(5), 1291–1298. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq084>
- Franke, C., Rechenburg, A., Baumanns, S., Willkomm, M., Christoffels, E., Exner, M., & Kistemann, T. (2009). The emission potential of different land use patterns for the occurrence of coliphages in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(3), 338–345.
- Friedman, S. D., Genthner, F. J., Gentry, J., Sobsey, M. D., & Vinje, J. (2009). Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae). *Journal of Virology*, 83(21), 11233–11243. <https://doi.org/10.1128/JVI.01308-09>
- Friedman, S. D., Snellgrove, W. C., Genthner, F. J., Division, G. E., & Breeze, G. (2012). Genomic Sequences of two Novel Levivirus Single-Stranded, 1548–1568. <https://doi.org/10.3390/v4091548>
- Gerba, C. P., Rose, J. B., Haas, C. N., & K, C. (1996). Waterborne rotavirus: A risk assessment. *Water Research*.
- Hassine-Zaafraane, M., Kaplon, J., Ben Salem, I., Sdiri-Loulizi, K., Sakly, N., Pothier, P., ... Ambert-Balay, K. (2015). Detection and genotyping of group A rotaviruses isolated from sewage samples in Monastir, Tunisia between April 2007 and April

2010. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5), 1443–1453.
- Havelaar, a. H., Van Olphen, M., & Drost, Y. C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 2956–2962.
- He, J., & Jiang, S. (2005). Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR, 71(5), 2250–2255.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2250>
- Hewitt, J., Leonard, M., Greening, G. E., & Lewis, G. D. (2011). Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Research*, 45(18), 6267–6276.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.029>
- Hill, V. R., Polaczyk, A. L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T. L., Roberts, J. M., & Amburgey, J. E. (2005). Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6878–6884. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6878-6884.2005>
- Hofstra, N., & Vermeulen, L. C. (2016). Impacts of population growth , urbanisation and sanitation changes on global human Cryptosporidium emissions to surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(7), 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.06.005>
- Hsu, A., Alexandre, N., Cohen, S., Jao, P., Khusainova, E., Mosteller, D., & others. (2016). Environmental Performance Index. New Haven, CT: Yale University.
- Hsu, F. C., Shieh, Y. S. C., Van Duin, J., Beekwilder, M. J., & Sobsey, M. D. (1995). Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 3960–3966.
- Hu, W., Mengersen, K., & Tong, S. (2010). Risk factor analysis and spatiotemporal CART model of cryptosporidiosis in Queensland, Australia. *BMC Infectious Diseases*, 10, 311. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-311>
- INEGi, X. I. I. (2010). Censo General de poblacion y Vivienda 2010. *P{á}gina Web: Http://www. Inegi. Gob. Mx/est/default. Asp.*
- Jimenez, B., & Chávez, a. (2004). Quality assessment of an aquifer recharged with wastewater for its potential use as drinking source: “El Mezquital Valley” case.

Water Science and Technology, 50, 269–276.

Jiménez, B., Drechsel, P., Koné, D., Bahri, A., Raschid-Sally, L., & Qadir, M. (2010). *Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: an overview*.

astewater Irrigation.

Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Vincent, R., Lu, X., Sobsey, M. D., Erdman, D. D., & Hill, V. R. (2005). Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41 Quantitative Real-Time PCR Assays for Detection of Human Adenoviruses and Identification of Serotypes 40 and 41. *Appl Environ Microbiol.*, 6(71), 3131–6.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3131>

Jujnovsky, J., Almeida-Leñero, L., Bojorge-García, M., Monges, Y. L., Cantoral-Uriza, E., & Mazari-Hiriar, M. (2017). Hydrologic ecosystem services: water quality and quantity in the Magdalena River, Mexico City. *Hidrobiológica*, 20(2), 113–126.

Jujnovsky, J., González-Martínez, T. M., Cantoral-Uriza, E. A., & Almeida-Leñero, L. (2012). Assessment of Water Supply as an Ecosystem Service in a Rural-Urban Watershed in Southwestern Mexico City. *Environmental Management*, 49(3), 690–702. <https://doi.org/10.1007/s00267-011-9804-3>

Kannel, P. R., Lee, S., Lee, Y.-S., Kanel, S. R., & Khan, S. P. (2007). Application of water quality indices and dissolved oxygen as indicators for river water classification and urban impact assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 132(1–3), 93–110. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9505-1>

Kannoly, S., Shao, Y., & Wang, N. (2012). Rethinking the evolution of single-stranded RNA (ssRNA) bacteriophages based on genomic sequences and characterizations of two R-plasmid-dependent ssRNA phages, C-1 and Hgal1. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 5073–5079.

Kashiwagi, A., Sugawara, R., Tsushima, F. S., Kumagai, T., & Yomo, T. (2014). Contribution of silent mutations to thermal adaptation of RNA bacteriophage Q β . *Journal of Virology*, 88(19), 11459–11468.

Kirs, M., & Smith, D. C. (2007). Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F + -specific RNA coliphages: A method for use in microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 808–814.

- <https://doi.org/10.1128/AEM.00399-06>
- Kiulia, N. M., Hofstra, N., Vermeulen, L. C., Obara, M. a, Medema, G., & Rose, J. B. (2015). Global occurrence and emission of rotaviruses to surface waters. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *4*(2), 229–55.
<https://doi.org/10.3390/pathogens4020229>
- Krishnamurthy, S. R., Janowski, A. B., Zhao, G., & Barouch, D. (2016). Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity, 1–17.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002409>
- Kroeze, C., Gabbert, S., Hofstra, N., Ludwig, F., Koelmans, A. A., Li, A., ... Wijnen, J. Van. (2016). Global modelling of surface water quality : a multi-pollutant approach. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2016.11.014>
- Lamparelli, C. C., Pogreba-Brown, K., Verhougstraete, M., Sato, M. I. Z., de Castro Bruni, A., Wade, T. J., & Eisenberg, J. N. S. (2015). Are fecal indicator bacteria appropriate measures of recreational water risks in the tropics: A cohort study of beach goers in Brazil? *Water Research*, *87*, 59–68.
- Lee, E., & Schwab, K. (2005). Deficiencies in drinking water distribution systems in developing countries. *J Water Health*, *3*(2), 109–27.
- Lesser-Carrillo, L. E., Lesser-Illades, J. M., Arellano-Islas, S., & González-Posadas, D. (2011). Balance hídrico y calidad del agua subterránea en el acuífero del Valle del Mezquital, México central. *Revista Mexicana de Ciencias Geol{ó}gicas*, *28*(3), 323–336.
- Li, W. W., Sheng, G. P., Zeng, R. J., Liu, X. W., & Yu, H. Q. (2012). China's wastewater discharge standards in urbanization: Evolution, challenges and implications: Evolution, challenges and implications. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(5), 1422–1431. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0572-7>
- Line, D. E. (2013). Effect of development on water quality for seven streams in North Carolina. *Environmental Monitoring and Assessment*, *185*(8), 6277–6289.
<https://doi.org/10.1007/s10661-012-3024-z>
- Liu, J., Platts-Mills, J. A., Juma, J., Kabir, F., Nkeze, J., Okoi, C., ... others. (2016). Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. *The Lancet*,

388(10051), 1291–1301.

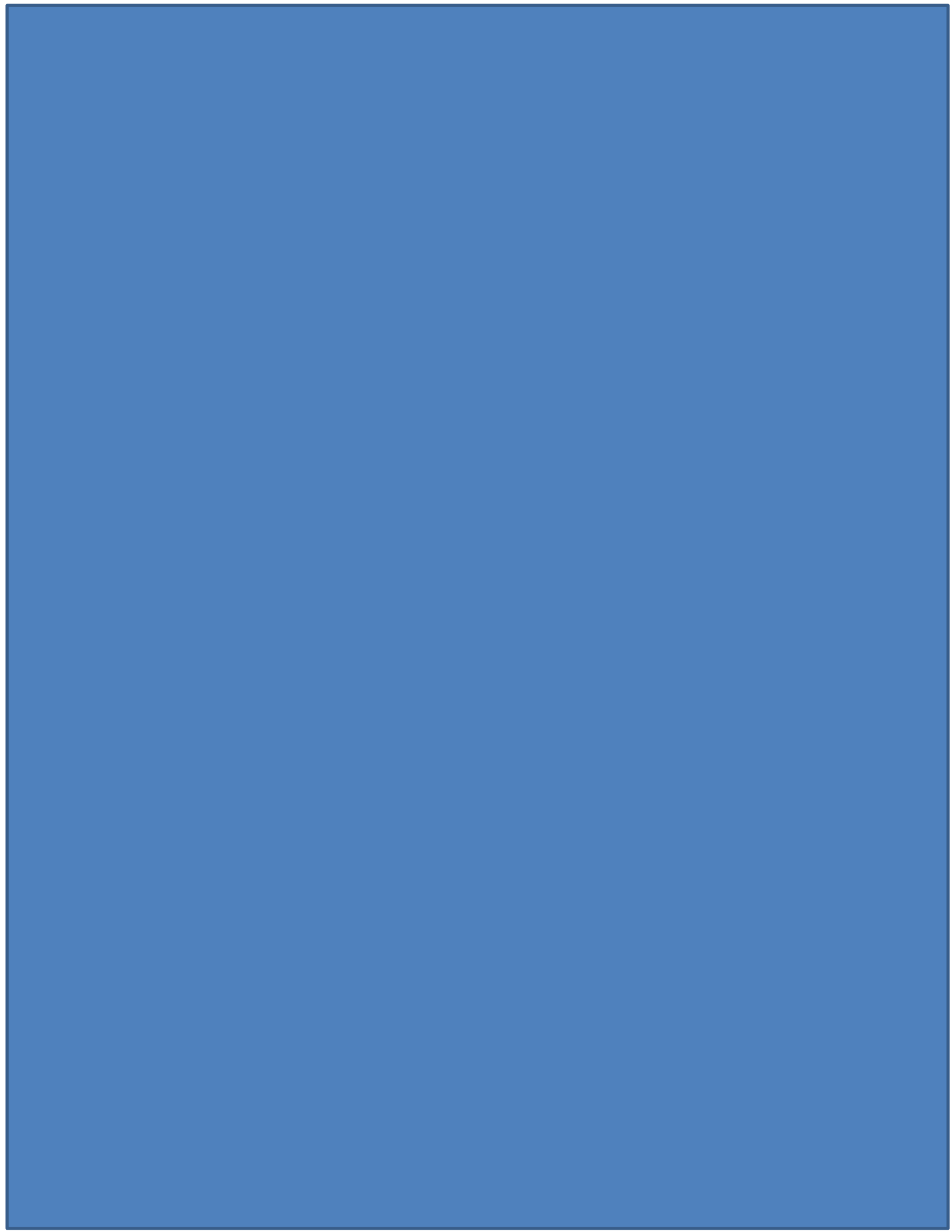
- Luther, K., & Fujioka, R. (2004). Usefulness of monitoring tropical streams for male-specific RNA coliphages. *Journal of Water and Health*, 2(3), 171–181.
- Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., ... others. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, 331(3), 161–167.
- Martine, G., & Alex Marshall. (2007). *State of world population 2007: unleashing the potential of urban growth*.
- Mazari-Hiriart, M., Perez-Ortiz, G., Orta-Ledesma, M. T., Armas-Vargas, F., Tapia, M. a., Solano-Ortiz, R., ... D??az-??valos, C. (2014). Final opportunity to rehabilitate an urban river as a water source for Mexico City. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102081>
- Mazari-Hiriart, M., Ponce-de-León, S., López-Vidal, Y., Islas-Macías, P., Amieva-Fernández, R. I., & Quiñones-Falconi, F. (2008). Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico City. *PloS One*, 3(5), e2305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002305>
- Naidoo, S., & Olaniran, A. O. (2014). Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), 249–70. <https://doi.org/10.3390/ijerph110100249>
- Nandini, S., & Garcia, P. R. (2015). Water quality in Lake Xochimilco, Mexico: zooplankton indicators and *Vibrio cholerae*. *Journal of Limnology*, 75(1).
- Ogorzaly, L., & Gantzer, C. (2006). Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods*, 138(1–2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004>
- Ogorzaly, L., & Gantzer, C. (2007). Erratum to: Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods*, 143(1), 122. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004>
- Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A., & Gantzer, C. (2009). Relationship

- between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Research*, 43(5), 1257–1264.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.011>
- Okoh, A. I., Sibanda, T., & Gusha, S. S. (2010). Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(6), 2620–2637.
<https://doi.org/10.3390/ijerph7062620>
- Olsen, R. L., Chappell, R. W., & Loftis, J. C. (2012). Water quality sample collection, data treatment and results presentation for principal components analysis - literature review and Illinois River watershed case study. *Water Research*, 46(9), 3110–3122. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.028>
- Parashar, U. D., Burton, A., Lanata, C., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Steele, D., ... Glass, R. I. (2009). Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *The Journal of Infectious Diseases*, 200 Suppl(5), S9–S15.
<https://doi.org/10.1086/605025>
- Passerat, J., Ouattara, N. K., Mouchel, J. M., Vincent Rocher, & Servais, P. (2011). Impact of an intense combined sewer overflow event on the microbiological water quality of the Seine River. *Water Research*, 45(2), 893–903.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.024>
- Piarroux, M., Piarroux, R., Knapp, J., Bardonnnet, K., Dumortier, J., Watelet, J., ... others. (2013). Populations at risk for alveolar echinococcosis, France. *Emerging Infectious Diseases*, 19(5), 721–728.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., & Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: Human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3376–3382.
- Platts-Mills, J. A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., ... others. (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health*, 3(9), e564--e575.
- Prüss-Ustün, A., Bartram, J., Clasen, T., Colford, J. M., Cumming, O., Curtis, V., ... Cairncross, S. (2014). Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene in low- and middle-income settings: a retrospective analysis of data

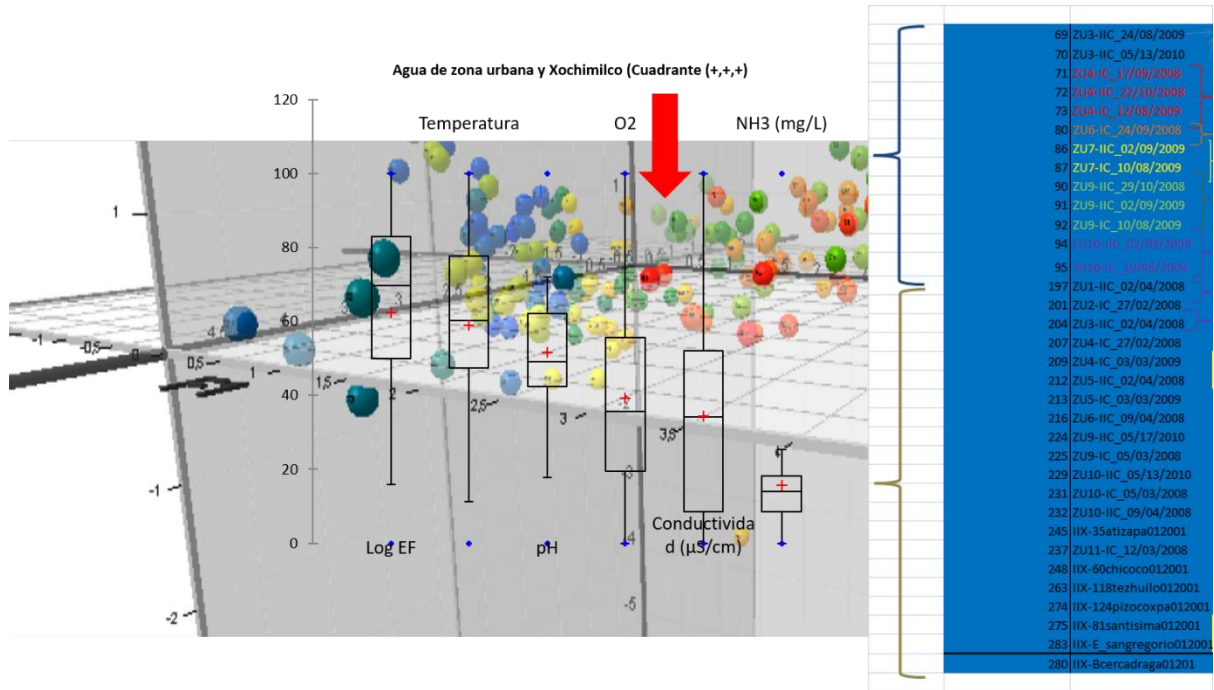
- from 145 countries. *Tropical Medicine & International Health*, 19(8), 894–905.
<https://doi.org/10.1111/tmi.12329>
- Ramani, S., & Kang, G. (2009). Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22, 477–482.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328330662f>
- Reynolds, K. a., Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2008). Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 192, 117–158. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1_4
- Rodríguez, R. a., Thie, L., Gibbons, C. D., & Sobsey, M. D. (2012). Reducing the effects of environmental inhibition in quantitative real-time PCR detection of adenovirus and norovirus in recreational seawaters. *Journal of Virological Methods*, 181(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.01.009>
- Rose, J. B., Zhou, X., Griffin, D. W., & Paul, J. H. (1997). Comparison of PCR and plaque assay for detection and enumeration of coliphage in polluted marine waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4564–6. Retrieved from
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1389293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sambrook, J., & Russell David, W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor, NY: Cold spring harbor laboratory press.
- Sánchez-Azofeifa, G. A., Quesada, M., Cuevas-Reyes, P., Castillo, A., & Sánchez-Montoya, G. (2009). Land cover and conservation in the area of influence of the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, Mexico. *Forest Ecology and Management*, 258(6), 907–912. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.10.030>
- Sánchez-Pérez, H., Vargas-Morales, M., & Méndez-Sánchez, J. (2000). Bacteriological quality of human drinking water in high-margination zones in Chiapas No Title. *Salud Publica Mex.*, 42(5), 397–406.
- Sibanda, T., & Okoh, A. I. (2012). Assessment of the incidence of enteric adenovirus species and serotypes in surface waters in the eastern cape province of South Africa: Tyume River as a case study. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 949216. <https://doi.org/10.1100/2012/949216>
- Simmons, F. J., & Xagorarakis, I. (2011). Release of infectious human enteric viruses

- by full-scale wastewater utilities. *Water Research*, 45(12), 3590–3598.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.001>
- Sinclair, R. G., Jones, E. L., & Gerba, C. P. (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1769–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x>
- Staat, M. A., Payne, D. C., Donauer, S., Weinberg, G. A., Edwards, K. M., Szilagyi, P. G., ... Parashar, U. D. (2011). Effectiveness of Pentavalent Rotavirus Vaccine Against Severe Disease. *Pediatrics*, 128(2), e267–e275.
<https://doi.org/10.1542/peds.2010-3722>
- Staley, C., Kaiser, T., Gidley, M. L., Enochs, I. C., Jones, P. R., Goodwin, K. D., ... Chun, C. L. (2017). Differential Impacts of Land-Based Sources of Pollution on the Microbiota of Southeast Florida Coral Reefs. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(10), e03378--16.
- Stevens, G., Dias, R. H., Thomas, K. J. a, Rivera, J. a., Carvalho, N., Barquera, S., ... Ezzati, M. (2008). Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Medicine*, 5(6), 0900–0910. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050125>
- Stewart, J. R., Vinje, J., Oudejans, S. J. G., Scott, G. I., Sobsey, M. D., & Vinjé, J. (2006). Sequence Variation among Group III F-Specific RNA Coliphages from Water Samples and Swine Lagoons Sequence Variation among Group III F-Specific RNA Coliphages from Water Samples and Swine Lagoons. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1226–1230.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1226>
- Subirats, J., Sánchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Balcázar, J. L., & Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(2), 163–167.
- USEPA. (2017). Water Quality Criteria. Retrieved from <https://www.epa.gov/wqc>
- Verhougstraete, M. P., Martin, S. L., Kendall, A. D., Hyndman, D. W., & Rose, J. B. (2015). Linking fecal bacteria in rivers to landscape, geochemical, and hydrologic factors and sources at the basin scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10419–10424.

- Wei, H., Kamat, A. M., Aldousari, S., Ye, Y., Huang, M., Dinney, C. P., & Wu, X. (2012). Genetic variations in the transforming growth factor beta pathway as predictors of bladder cancer risk. *PloS One*, *7*(12), e51758.
- Westreich, D., Lessler, J., & Funk, M. J. (2010). Propensity score estimation: machine learning and classification methods as alternatives to logistic regression. *Journal of Clinical Epidemiology*, *63*(8), 826–833.
<https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2009.11.020>.Propensity
- Wetzel, R. (2001). *Limnology: lake and river ecosystems*. Gulf professional publishing.
- Wilkes, G., Ruecker, N. J., Neumann, N. F., Gannon, V. P. J., Jokinen, C., Sunohara, M., ... Lapen, D. R. (2013). Spatiotemporal analysis of *Cryptosporidium* species/genotypes and relationships with other zoonotic pathogens in surface water from mixed-use watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(2), 434–448.
- Wolf, J., Pr??ss-Ust??n, A., Cumming, O., Bartram, J., Bonjour, S., Cairncross, S., ... Higgins, J. P. T. (2014). Systematic review: Assessing the impact of drinking water and sanitation on diarrhoeal disease in low- and middle-income settings: Systematic review and meta-regression. *Tropical Medicine and International Health*, *19*(8), 928–942. <https://doi.org/10.1111/tmi.12331>
- Wolf, S., Hewitt, J., & Greening, G. E. (2010). Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(5), 1388–1394.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02249-09>
- Xagorarakis, I., Kuo, D. H.-W., Wong, K., Wong, M., & Rose, J. B. (2007). Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(24), 7874–81.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01239-07>
- Yates, M. V. (2007). Classical indicators in the 21st century--far and beyond the coliform. *Water Environ Res.*, *93*(3), 279–86.



Anexos



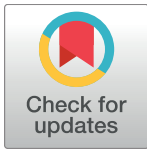
RESEARCH ARTICLE

FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems

Luis Jose Rene Arredondo-Hernandez^{1*}, Carlos Diaz-Avalos², Yolanda Lopez-Vidal³, Gonzalo Castillo-Rojas³, Marisa Mazari-Hiriart¹

1 Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **2** Departamento de Probabilidad y Estadística, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, **3** Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

* ljrene@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Arredondo-Hernandez LJR, Diaz-Avalos C, Lopez-Vidal Y, Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M (2017) FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems. PLoS ONE 12(1): e0170399. doi:10.1371/journal.pone.0170399

Editor: Andrew C Singer, Natural Environment Research Council, UNITED KINGDOM

Received: July 26, 2016

Accepted: January 4, 2017

Published: January 23, 2017

Copyright: © 2017 Arredondo-Hernandez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by the CONACYT and DGAPA, through projects: IO110/193/10 CONACYT–DFG and CB83441 to MMH, C0009-2014-02-239182 to YLV, SALUD2009-C01-112588 to GCR, DGAPA/PAPIIT IN215910 and DGAPA/PAPIIT IG-200213 to MMH. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

A particular challenge to water safety in populous intertropical regions is the lack of reliable faecal indicators to detect microbiological contamination of water, while the numerical relationships of specific viral indicators remain largely unexplored. The aim of this study was to investigate the numerical relationships of FRNA-bacteriophage genotypes, adenovirus 41, and human adenoviruses (HADV) in Mexican surface water systems to assess sewage contamination. We studied the presence of HADV, HADV41 and FRNA bacteriophage genotypes in water samples and quantified by qPCR and RT-qPCR. Virus and water quality indicator variances, as analyzed by principal component analysis and partial least squared regression, followed along the major percentiles of water faecal enterococci. FRNA bacteriophages adequately deciphered viral and point source water contamination. The strongest correlation for HADV was with FRNA bacteriophage type II, in water samples higher than the 50th percentiles of faecal enterococci, thus indicating urban pollution. FRNA bacteriophage genotypes I and III virus indicator performances were assisted by their associations with electrical conductivity and faecal enterococci. In combination, our methods are useful for inferring water quality degradation caused by sewage contamination. The methods used have potential for determining source contamination in water and, specifically, the presence of enteric viruses where clean and contaminated water have mixed.

Introduction

Waterborne enteric viruses inflict a heavy disease burden on developing countries. Enteric viruses negatively impact the quality of life for people and reduce their productivity and the number of days spent working. Enteric virus emissions to water bodies and the low infectious doses required represent a major obstacle to further mortality reductions in children younger than five years of age. The incidence of enteric viruses in children can be very high, as revealed

analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

by the presence of one viral agent in 43% of the children living in developing countries where most diarrhea attributable deaths occur, being rotavirus the most common pathogen in children, followed by norovirus in all countries [1]. Indeed, a relationship was found between the number of hepatitis cases and monsoons in India [2], thus highlighting the prominence of the waterborne route for enteric viruses. In addition, a relationship was found between the number of gastroenteritis outbreaks, and heavy rainfall and runoff events in the USA [3] and across the world [4]. Nevertheless, at least 50% of the gastroenteritis cases in the USA have an unknown causal agent [5].

It is widely accepted that inadequately treated wastewater and sewer discharges are the primary means by which enteric viruses gain entry to the environment via combined sewer overflows and/or cross connections [6]. It appears that urban conglomerates emit the highest number of viral particles of enteric virus to water bodies, and this finding is related to the size of a population, the number of people connected to the sewerage system, and the sewage treatment level [7]. Consequently, virus transmission through contact with contaminated water sources [8], such as effluent impacted recreational ponds or beaches [9,10], or via irrigation water carrying wastewater [11], is still a major water safety concern in many countries.

Much effort has been made to develop consistently good molecular indicators of bacteria or viruses to assist water quality assessment with improved sensitivity. However, such methods have not been systematically evaluated for use in tropical countries with medium incomes [6]. In such settings, evaluation of the sensitivity and accuracy of the various molecular indicators is helpful for determining water quality and source [12,13,14]. Successful day-to-day water quality monitoring relies on rapid molecular identification of waterborne pathogens and determination of their spatial-temporal distributions. Molecular quantification of viruses or bacteriophages is likely to be the only reliable method that is sufficiently fast to act as an early warning system to enable corrective action to be applied in a timely manner in regions with tropical environmental waters [15]. Therefore, we sought to assess the usefulness of multivariate principal component analysis (PCA) and partial least squared (PLS) regression as a descriptor of virological water quality and an indicator of contamination or service failure in Mexico, respectively. We employed PCA and PLS regression to explore the relationship between faecal enterococci and the presence of two types of commonly used molecular indicators, FRNA bacteriophages (genotypes I to III) and human adenoviruses (HADV), in four Mexican surface water systems. FRNA bacteriophage genotypes I to III have been consistently shown to be associated with sewage contamination of surface water [16,17,18]. Their presence in water is frequently correlated with the presence of enteric viruses in a number of water sources [19], while it is ever present in the water used for drinking water production [20].

Robust molecular methods for HADV (causative agents of respiratory infections and sporadic conjunctivitis [21]) and HADV41 (which causes up to 20% of the diarrhea cases in children under five years of age) detection/quantification have been widely applied and, in contrast to enterovirus qPCR, their number and concentration are statistically associated with effluent dominated waters [22]. In contrast, various water quality indicators have been analyzed according to the relative frequencies of faecal enterococci in a number of water matrices. The aim of this study was to investigate the numerical relationships of FRNA-bacteriophage genotypes, adenovirus 41, and human adenoviruses (HADV), in Mexican surface water systems to assess sewage contamination. All microorganisms referred in the manuscript are faecal indicators, while FRNA bacteriophages and adenovirus are also virus indicators as a cell host is needed for replication.

Materials and Methods

Experimental design

Multivariate analysis compared the following indicators: faecal enterococci, viruses, and the physicochemical variables controlling the structure of the data, according to the major faecal enterococci percentiles, defined as each 10 and/or 25 percentile break from maximum CFU/100 mL at Central Mexico sampling point. The strategy, allowed us to perform comparison regardless the water system origin of each sample (S1 Table). The physicochemical and bacteria-specific properties for FRNA bacteriophage genome groups I and III were assessed for 28 samples. In one third of the samples, FRNA bacteriophage group II, HADV, and the genome variants of HADV41, were also quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analyses.

Water sources

Samples were collected from the following four Mexican surface water systems: the Magdalena River and the Cuitzmala River (natural systems), the Xochimilco altitude wetland (a semi-natural system mostly comprising a canal lentic system within Mexico City), and the Mezquital Valley (a man-made system). These four water systems, which represent the various types of water systems in Central Mexico and are located in the intertropical region of the country, have faecal contamination and conditions that facilitate the establishment of microbial niches. No specific permissions were required to enter these locations because they are natural bodies of water with open access. Field studies did not involve endangered or protected species. The Magdalena River, which is a peri-urban system located in the area surrounding Mexico City, flows through a forested area and is used as a source for drinking water production. Upon entering the urban area, the river receives municipal wastewater discharges [23]. In contrast, the Cuitzmala River water system flows through a tropical area with a small population and is located on the coast in Jalisco State in Western Mexico [24]. The Xochimilco wetland is reminiscent of the Mexico basin lacustrine system [25]; it is a managed aquatic system recharged with treated wastewater and receives storm water during rainy season. In a connected distant area, agriculture is practiced in a region known as the Mezquital Valley (Hidalgo State, Mexico); here, a significant proportion of the municipal wastewater from Mexico City is discharged without treatment [26].

Sample collection

According to the faecal enterococci colony counts determined previously, a total of either 1-L or 20-L water samples were collected in triplicate in autoclaved polypropylene bottles, and were then transported to the laboratory at 4°C for virus concentration (S2 Table). Next, the samples were processed following standard procedures within 6 h of collection as described by [27]. The 20-L water samples were concentrated by ultrafiltration with polycarbonate ultra-filters (Hemoflow F80A, Fresenius Medical Care, Waltham, MA, USA), using a perfusion rate of 1700 mL/min, as described by Hill et al. [28] while adenovirus detection required further concentration (10,000 X), using Amicon centrifugal units (30,000 MWCO; Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Then, the samples were concentrated to a 200-mL final volume, and stored in 40-mL aliquots. Afterwards, RNA was extracted from the 100X concentrated sample to evaluate the FRNA bacteriophage genotypic groups present using RT-qPCR. Subsamples were frozen and stored at -70°C [29], after which the DNA was extracted.

Water characterization

Physicochemical analyses. Physicochemical parameters such as dissolved oxygen, pH, electrical conductivity, and temperature, were determined for the four water systems, *in situ*. The following sensors were used: Rox optical dissolved oxygen (mg/L) sensor, pH 6561 sensor, temperature (°C), electrical conductivity (μS/cm), and total dissolved solids (mg/L) (YSI Inc., Yellow Spring, OH, USA). The sensors were calibrated according to the manufacturer's instructions. The parameters were measured *in situ* using a YSI6600V2 water quality sonde (YSI Inc.).

Faecal enterococcus counts. Faecal enterococci counts were determined by the membrane filtration method 9230C, according to the 21st edition of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Briefly: membrane filters (0.45 mm cellulose acetate, Millipore MF type HA) were placed on KF Streptococcus agar for streptococci/enterococci. Incubation was performed with a WTB Binder brand incubator at 35°C for 48 h according to APHA [27]. This is a quantitative method to determine the number of colony forming units (CFU) on a membrane, as described previously [27]. The bacterial counts were expressed as the base-10 logarithm of the number of CFU per 100 mL.

Viral quantification

Extraction of viral DNA and RNA. Following the manufacturer's instructions, viral nucleic acids were extracted from samples using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen) for viral RNA and DNA, respectively. In addition to spin protocol in kit and the regular washing steps, glycogen co-precipitation was employed to remove any environmental inhibitors present in the samples while PCR inhibition was assessed by dilution series [29,30]. Finally all extracts were stored at -70°C until use.

Reverse transcription of FRNA bacteriophages. To obtain first strand in a two-step RT-qPCR, Superscript III first strand synthesis system was used according to manufacturer instructions, with minor modifications. After 5 min at 65°C and secondary structure elimination in a 5 μL solution containing 2 μL RNA, and 1 μL specific reverse oligonucleotides (2 μM)—to match 3' end of specific FRNA genotype template sequence as described by Ogorzaly *et al.* (2006, 2007)—SuperScript III reverse transcriptase (Life technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added, plus 1.5 μL MgCl₂, (25mM), 1.5 μL DTT0.1M, and 1 μL 10x RT-buffer [31,32]. Next, cDNA-reverse transcriptase product was synthesized at 50°C for 1 h in a thermocycler (GeneAmp PCR system 9700, Life technologies, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Finally, the enzyme was heat inactivated at 95°C for 5 min.

Quantification of HADV, HADV41 and FRNA bacteriophage genotypes I to III by qPCR and RT-qPCR

Standards, RT-qPCR and qPCR curves for the viral indicators. Bacteriophage MS2 (ATCC 15597-B1), FRNA genotype I (GI), and Qβ (ATCC 23631-B1) FRNA genotype III (GIII), were cultured from stock vials purchased from American Type Culture Collection (ATCC, <http://www.lgcstandards-atcc.org/>). Propagation took place using *Escherichia coli* host (ATCC 23631) culture during log phase, as in ISO method 10705-1. FRNA genotypes GI, GII, and GIII RNA fragments, were RT-PCR amplified, sequenced, and subjected to GenBank database Basic Local Alignment Search Tool analysis after plasmid construction to ensure high sequence identity homology to FRNA bacteriophage and enteric virus specific sequence [33]. RNA, extracted and converted into cDNA was cloned into a pCR2.1 TOPO vector (TOPO TA

Cloning Kit, Invitrogen Life Science Technologies), following manufacturer instructions. HADV and HADV41 DNAs were purchased from ATCC VR-930D. Specific endpoint PCR DNA amplicons were subsequently cloned into a plasmid vector (pCR2.1-TOPO) using the one-shot chemical transformation method described by the manufacturer (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing). The plasmid construct was column-purified and adjusted to 2×10^8 copies per μL for use as a standard stock solution for qPCRs. Standards were diluted to 10^1 – 10^5 copies per qPCR reaction of standard curve to calibrate the concentrations of the target gene detected in the FRNA genotype. The primers and minor groove binding probes originally designed by Ogorzaly [31,32] were synthesized by Applied Biosystems; 500 nmol of each primer and 250 nmol of each hydrolysis probe were used for the monoplex assays. Amplification curves for HADV and HADV41 were constructed for genome quantification as previously described [34,35,36] (Table 1).

For each HADV, a qPCR was performed in a 20- μL volume with 10 μL TaqMan Master Mix, 1 μL each of 10 μM forward and reverse primers, 0.6 μL 10 μM hydrolysis probe, and 5 μL of a DNA sample or standard. The thermal profile consisted of one cycle at 95°C for 15 min, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s, 55°C for 33 s, and 72°C for 33 s. The qPCR program for HADV41 consisted of 15 min at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 33 s, and 72°C for 33 s. The FRNA genotypes were amplified using the following program: 15 min at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. All the samples were amplified using a 7500 Real-Time PCR System (Life technologies Applied Biosystems). Each sample (i.e., viral DNA extracts or cDNA reverse transcripts) and standard controls were run in triplicate. All bacteriophage and virus quantitation by qPCR included a negative control reaction mixture (PCR-grade H₂O without template).

Table 1. Primers and probes used for RT-qPCR and qPCR genome quantification of the virus indicators used in this study.

Viral indicators	Primers and probes	Sequence	Author	Reference
FRNA bacteriophage genotype				
Group I	GI forward	5' -TCGATGGTCCATACCTTAGATGC-3'	Ogorzaly <i>et al.</i>	[31, 32]
	GI reverse	5' -ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT-3'		
	Probe for GI	FAM-CTCGTCGACAATGG-MGBNFQ		
Group II	GII forward	5' -TGCAAACCTAACTCGGAATGG-3'		
	GII reverse	5' -AGGAGAGAACGCAGGCCTCTA-3'		
	Probe for GII	FAM-TCCCTCTATTTCCCTC-MGBNFQ		
Group III	GIII forward	5' -CCGCGTGGGGTAAATCC-3'		
	GIII reverse	5' -TTCTTACGATGCGAGAAGGCT-3'		
	Probe for GIII	FAM-AAGCGGTGCAGTT-MGBNFQ		
Human Adenovirus				
HADV	JTVXF	5' -GGACGCCTCGGAGTACCTGAG-3'	Jothikumar <i>et al.</i>	[34]
	JTVXR	5' -ACIGTGGGGTTTCTGAACCTGTT-3'		
	JTVXP probe	FAM-CTGGTGCAGTTCGCCCGTGCCA-BHQ		
Genotype 41	HAdV-F4041-hex157f	5' -ACCCACGATGTAACCACAGAC-3' CACTTTGTAAGAATAAGCGGTGTC	Jiang <i>et al.</i> , modified by Xagorarakis <i>et al.</i>	[35] [36]
	HAdV-F41-hex246r	5' -CACTTTGTAAGAATAAGCGGTGTC-3'		
	probe HAdV-F4041-hex214rprobe	FAM-CGACKGGCACGAACKGCAGCGT-BHQ-1		

FAM = 6-Carboxyfluorescein. MGB-NFQ = Minor Groove Binder moiety-Nonfluorescent quencher. BHQ = Black Hole Quencher. I = Inosine. K = G + T.

doi:10.1371/journal.pone.0170399.t001

Statistical analysis

The concentrations of the microorganisms were log₁₀-transformed and linearity was assessed using Excel 2010 software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Multivariate statistical analyses were performed using XLSTAT software version 13.4.03 (Addinsoft, France). Sample data were ordered into major percentiles according to the faecal enterococci water quality logarithm. Parallels in the enteric virus indicators along the faecal enterococci percentiles were examined by PCA and factor analysis to explore the variable physicochemical relationships between the pollution hypothesis and molecular indexes (FRNA groups I, II, and III, HADV and HADV41) for the sampling points. Finally, the most important variables identified by PLS regression—recommended regression method when collinearity is expected—included samples around each faecal enterococci major percentile and uphold PCA when low sample number [37,38].

Results

Viral index: FRNA bacteriophages, HADV and genotype 41

FRNA genotype I, II, and III bacteriophages were detected and quantified by RT-qPCR (Fig 1). FRNA genotypes I and III had similar values, unlike FRNA genotype III (FRNAGIII), which was predominant over FRNA genotype I in most of the water quality faecal enterococci log percentile groups, especially those higher than the 50th percentile. The proportions were not constant in all of the water samples. FRNAGIII was not detected in any samples from the Cuitzmala River; however, there were fewer bacteriophages present in the sampling points from this river, compared with samples from the same faecal enterococci percentile. The genome numbers were higher for FRNA bacteriophages within the 10th faecal enterococci percentile samples because of the sample origin: wastewater filtered through soil that emerged at the Cerro Colorado Spring, in the Mezquital Valley.

FRNA bacteriophage genotype II genome counts consistently outnumbered those of FRNA genotypes I and III and were nearly twice the FRNA genotype I log genome count. The minimum number of positive enterococci samples for HADV (HADV = 1.82 log genomes/100 mL) and HADV41 (ADV41 = 2.73 log genomes/100 mL) was 3.76 logFE. The ADV41/HADV ratio ranged from 0.76 in the semi-urban agricultural area to 0.66 near the treated wastewater point source in the Xochimilco tropical high-altitude wetland. The ratio of 0.54 in the Magdalena River urban area indicates that ADV41 represented at least half of the total number of HADVs. No samples showed PCR amplification inhibition.

PCA of 28 samples covering the whole spectra of water quality that we assessed resulted in 65% of the variance explication by the first two components. They showed major loadings of conductivity and dissolved oxygen variables, followed by FRNA genotype I and III loadings to PCA. Faecal enterococci constituted the less explanatory variable. PCA arranged the eight variables studied herein into two clusters (Fig 2). FRNA bacteriophage genotype I, genotype III, and faecal enterococci variables formed a cluster while conductivity and total dissolved solids separated from the rest of the variables. All the variables seemed to be anti-correlated to the dissolved oxygen variable coordinate loadings. The temperature variable vector on the coordinate plane was perpendicular to that of dissolved oxygen.

PLS regression models for FRNA bacteriophage genotype I and III genome counts showed that dissolved oxygen and temperature are the most important variables explaining genotype I. However, dissolved oxygen concentration is also a significant variable for the FRNA genotype III genome count in PLS regression, conductivity, and faecal enterococci variables. It also adjusts the model of complete composite of samples (S1 and S2 Figs). Factor analysis and PLS

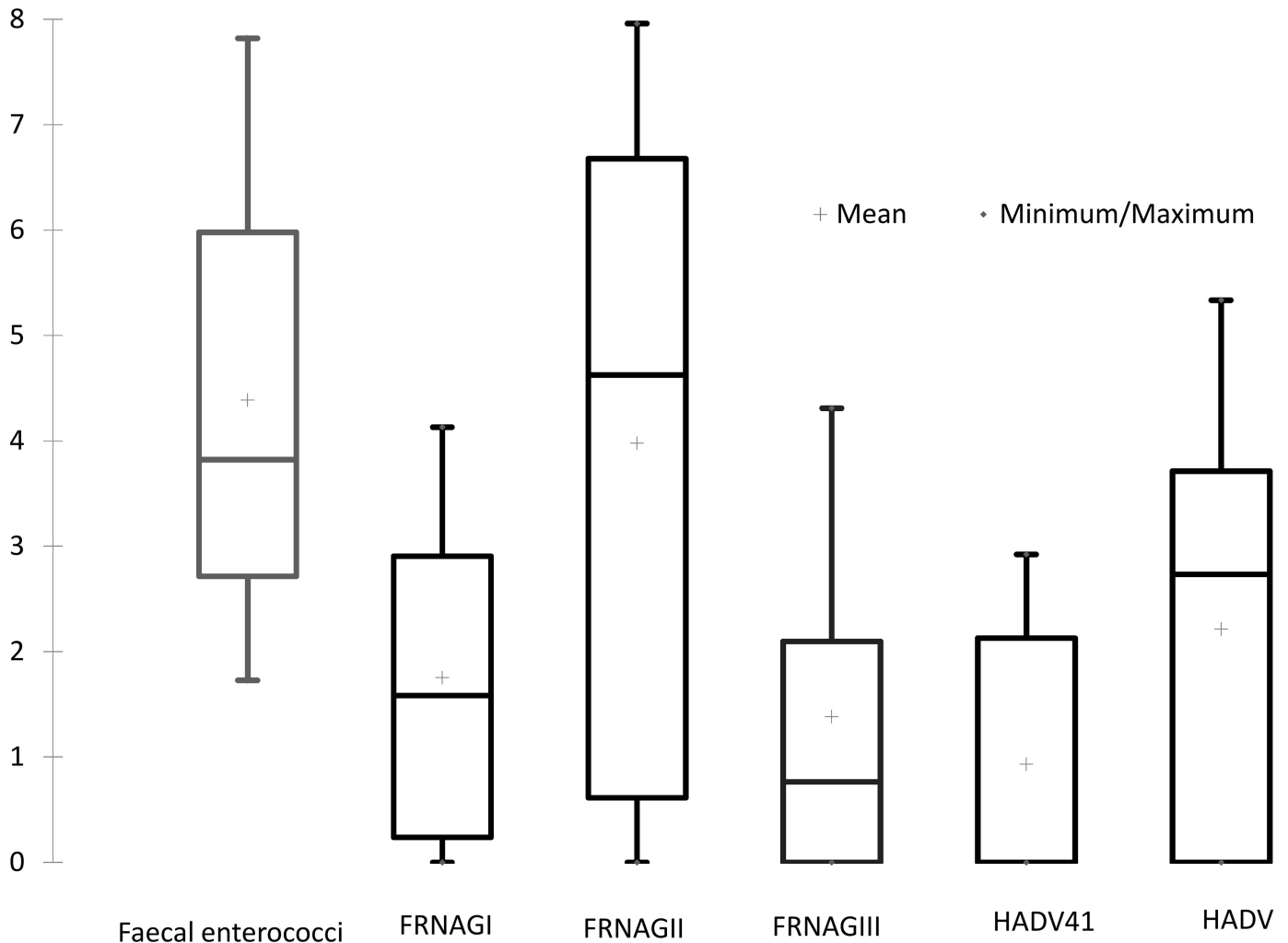


Fig 1. Log number of the distribution of faecal indicators from tropical water samples.

doi:10.1371/journal.pone.0170399.g001

regression for each of the major faecal enterococci deciles across the different sample origins showed that at least 76% of the variance was explainable and the percentage was higher if the samples belonged to the same aquatic system. The first decile, the most oxygenated one, showed FRNA bacteriophage genotype I and conductivity variable vectors parallel to each other. It also showed that GIII was the closest to faecal *enterococcus*. However, the proximity of FRNA bacteriophage genotype I and/or III to faecal enterococci varied along the major percentile sample clusters included in this analysis. The PLS regression showed that the FRNA genotype III was mostly associated with those surface water samples taken downstream of a waste water treatment plant or sewerage input; however, the segregation of the data was not absolute. Therefore, a subset composed of a third of the samples representing the water quality spectra of the whole set was assessed to include HADV, HADV41, and FRNA genotype II viral indicators. We repeated the multivariate analysis for the complete subset (Fig 3) and for the faecal enterococci cluster samples at the 50th percentile (Fig 4). Either 76% or 93% of the variance was explained by the first two factors of the analysis, from which FRNAGI, conductivity, and total dissolved solids had the highest nominal contributions followed by FRNAGII and

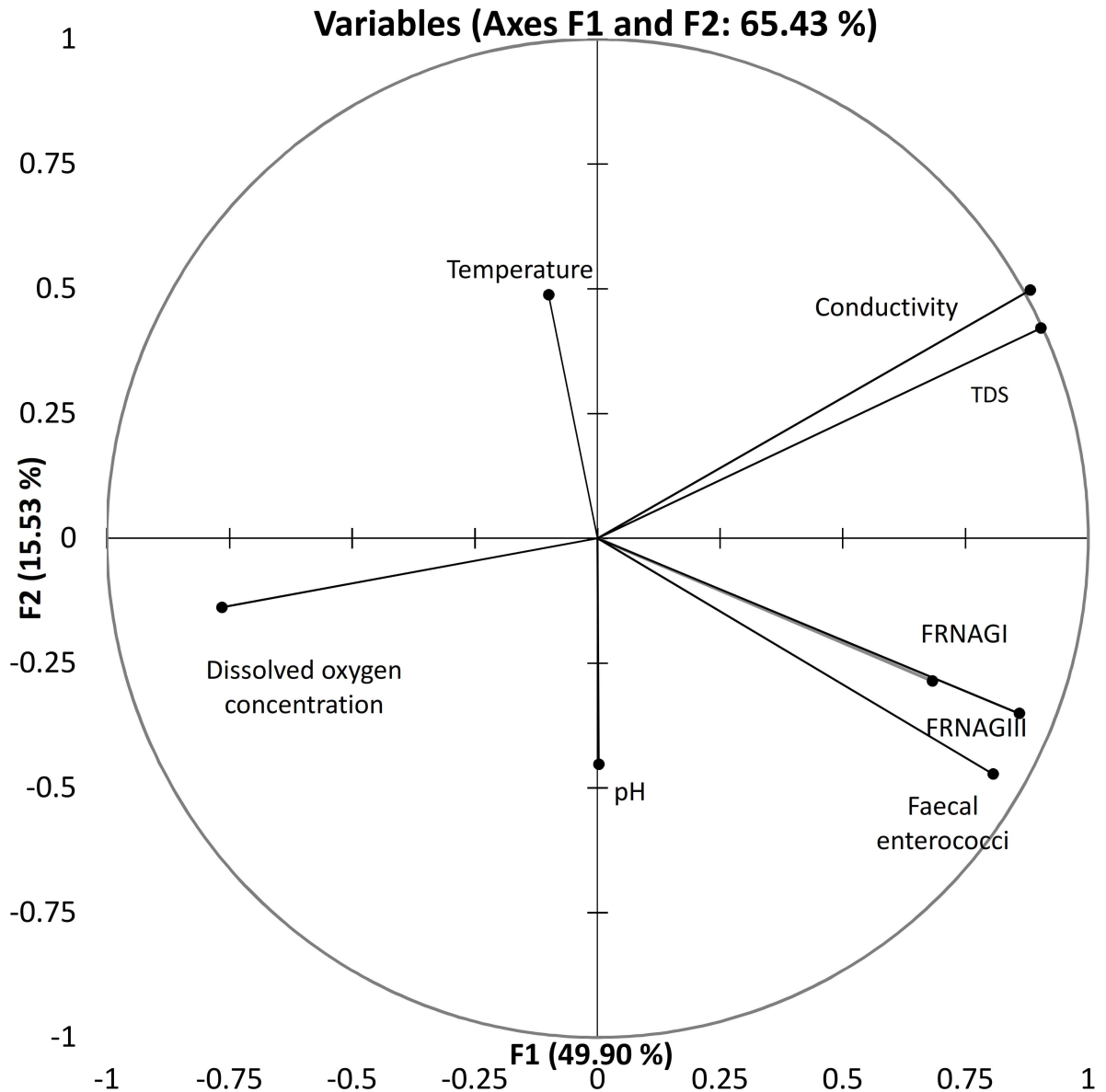


Fig 2. Principal component analysis bi-plot showing dispersion of vector physicochemical parameters, faecal enterococci, and FRNA bacteriophages I and III among tropical water samples.

doi:10.1371/journal.pone.0170399.g002

FRNAGIII. Regardless of the number of samples included, dissolved oxygen was anti-correlated to the rest of the variables. FRNA bacteriophage genotype II seems to best characterize decay in the dissolved oxygen concentration variable, because both follow almost the same continuous line in the plot (Fig 3). Variable vectors describe a fan shape through the second and the third Cartesian plane quadrants, giving a mirrored image with pH, virus indicators and FRNA bacteriophage genotype II in the (positive, negative) quadrant. The temperature variable vector ran parallel to the Y axis (F1), while the counts for the FRNA bacteriophage genotype III genome variable and the faecal enterococci variable had the highest values on both axes and were located next to each other on the plane. FRNA bacteriophage genotype I

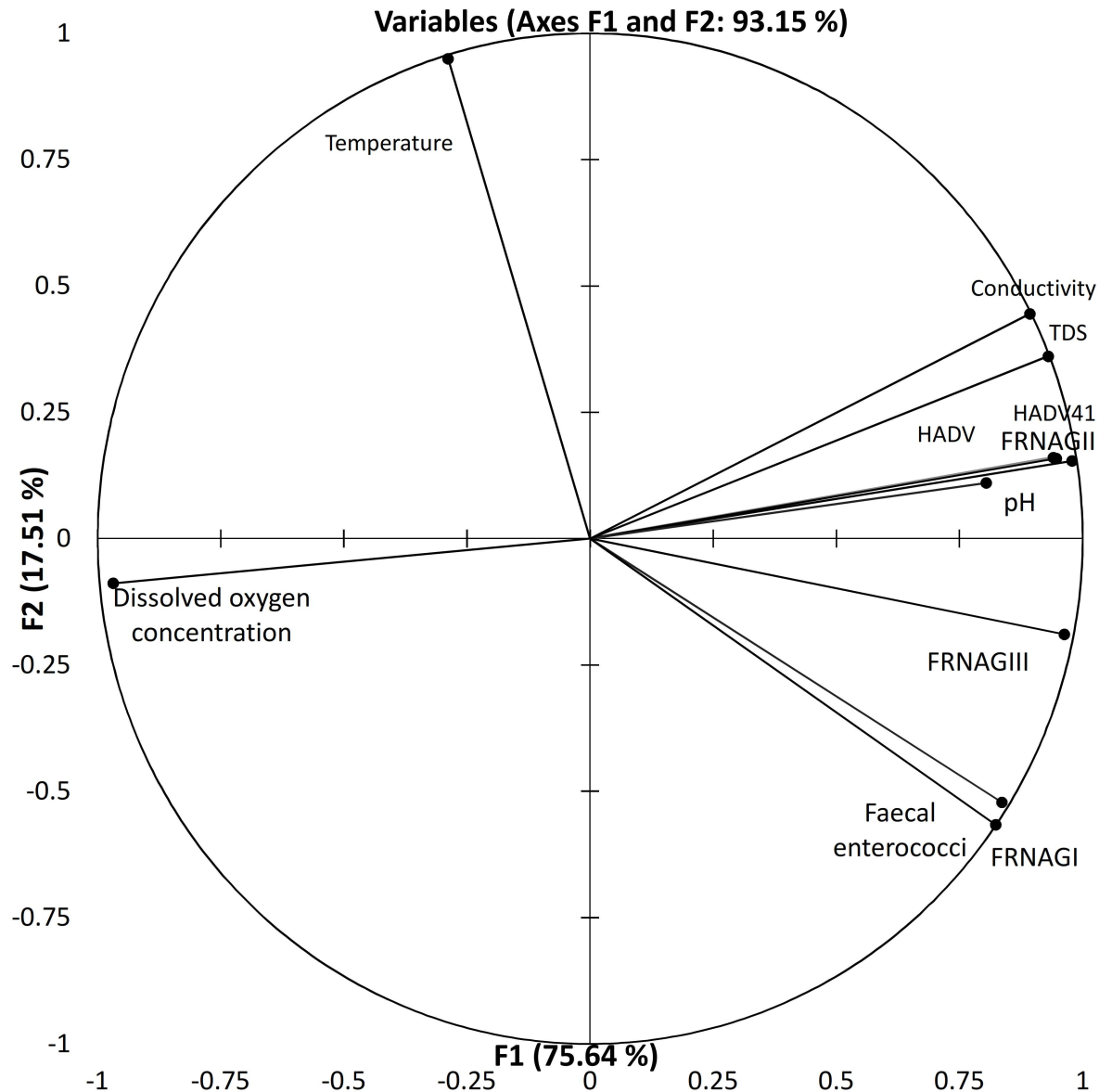


Fig 3. Principal component analysis bi-plot showing the vector proximity for the physicochemical, faecal enterococci, FRNA bacteriophages genotype II, human adenovirus, and adenovirus 41 among selected tropical water samples.

doi:10.1371/journal.pone.0170399.g003

was more closely associated with conductivity as determined from the proximity of these items on the plot, and in the representative subset it was only associated with faecal enterococci in the higher than 50th percentile area of the plot. Multivariate analysis of the higher than 50th percentile samples rendered similar results. However, the anti-correlation for the dissolved oxygen variable to FRNA bacteriophage genotype II and the correlation between HADV, HADV41 and FRNA bacteriophage genotype II genome number variables were strengthened. Respective loadings of FRNA bacteriophage genotypes I and III graphically locate the genotype I vector besides the faecal enterococci vector, while genotype III is located halfway between faecal enterococci and the human-specific HADV and HADV41 viral indicators.

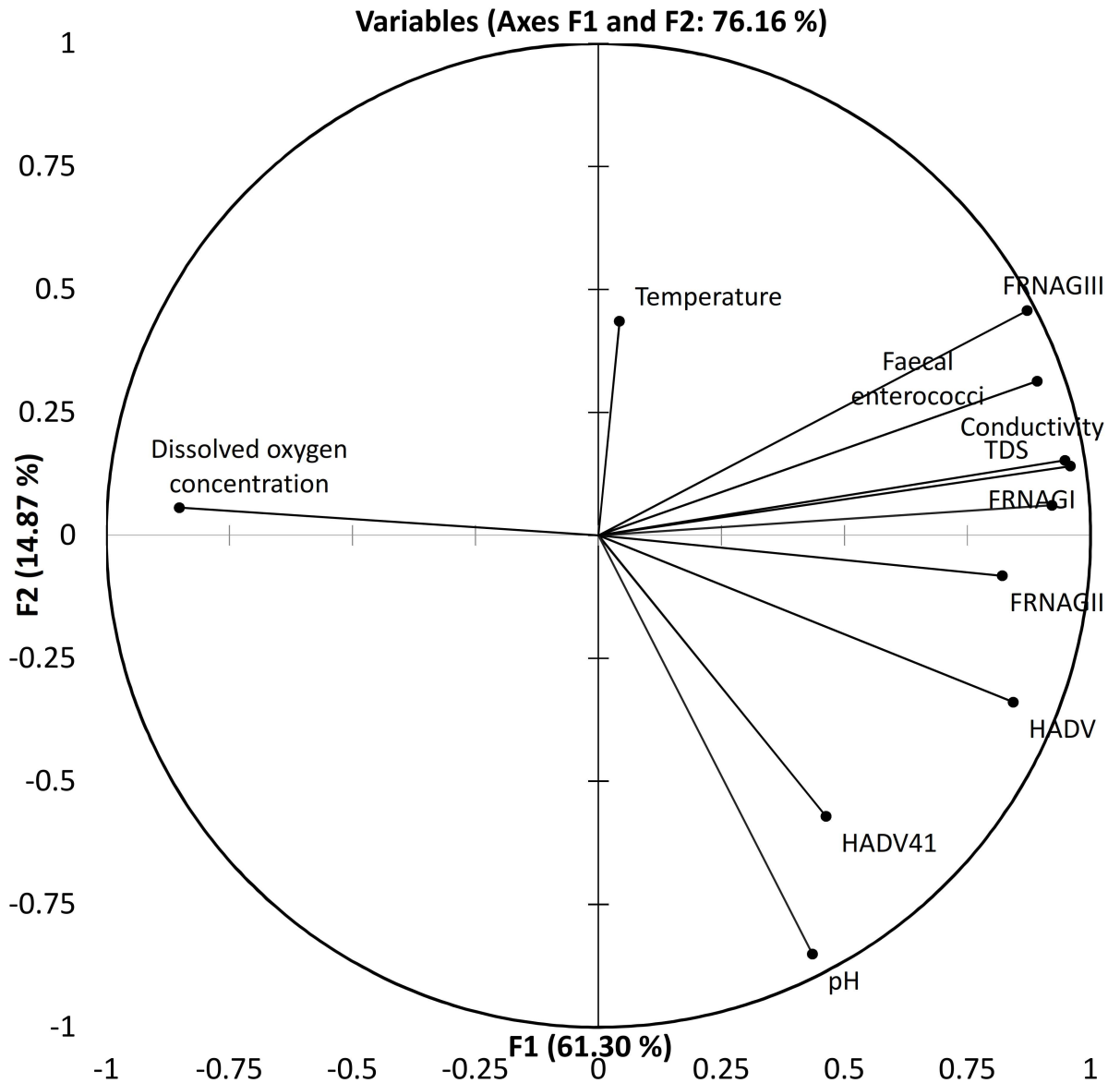


Fig 4. Principal component analysis bi-plot showing the vector proximity for the FRNA bacteriophages genotypes, along with the reduced variance for human adenovirus and human adenovirus 41 in higher than 50th percentile faecal enterococci percentiles in the tropical water samples.

doi:10.1371/journal.pone.0170399.g004

Discussion

Molecular tools for accurate quantification of the biological indicators of contamination with waterborne enteric viruses are urgently needed for timely alerts of water safety breaches in populated areas of tropical countries [37]. Incidental transmission of enteric viruses via recreational bathing water and contaminated drinking water poses a real threat to public health because of the large number of enteric viruses emitted, wastewater usage in agriculture, inadequate wastewater treatment, infrastructure maintenance, and operational deficiencies [38,39,40]. Consistently, urban rivers are receiving higher loads of faecal contamination [41,42], becoming part of sewer system. In wastewater, a highly variable amount of bacterial indicators has been reported [43]; as for suspended particle size, concentrations reaching as

high as $10^8/100$ mL have been reported at Mezquital Valley [44]. Differentiating non-point contamination to which enteric viruses don't correlate at all has been a major challenge [45,46]. Incoming from animal sources, and indicator habituation to water environment may exert a different risk than CSO effluent discharge. Similarly, unpredictable heavy rainfall can also increase virus emissions into water sources, but only up to 20% of bacterial indicators are from wastewater [47]. Therefore, where practicable, corrective measures should be employed to avoid the unintentional mixing of recreational water and source water used for potable water supply with virus-contaminated sewer overflows, sewage, or effluent from wastewater treatment plants. However, ensuring that these waters remain separate requires indicator monitoring systems that overcome the specific limitations of monitoring bacteria, particularly in tropical middle-income and developing countries. Accurate and reliable identification of point and diffuse contamination in a water system requires an indicator that can provide information on the contamination point in time and space, be sensitive enough to identify trace amounts of wastewater, and be fast enough to quantify the bacterial indicator to avoid a service safety failure, thereby limiting the risk of enteric virus spread to the population to an acceptable threshold.

In the present study, FRNA bacteriophages absolute genomes were detected by RT- qPCR amplification of conserved sequences using primer sets previously probed in water environment assessments. Quantifiable amounts of specific product were detected in samples from the four Mexican water systems (the Magdalena and Cuitzmala natural river systems, the semi-natural Xochimilco altitude wetland system, and the man-made Mezquital Valley system) that were examined (S5–S12 Figs). Multivariate analysis was used to compare the data obtained for the faecal enterococci and indicator viruses and the physicochemical variables controlling the structure of the data. Follow-up of the molecular indicator variance through the gradient on the graph showed a wide area where the viral indicators were concentrated (Figs 3 and 4), which narrowed as the faecal percentile increased. Above the 50th percentile mark, mainly including the sewerage input sampling points, we found that HADV, gastroenteritis-related genotype 41, and FRNA genotype II, behaved in a similar fashion. However, as with other studies that have attempted to find a single indicator that can precisely explain the presence of enteric virus, it is clear that as the system becomes more complicated and contains a lower than 50th percentile value, pollution hypothesis should be interpreted cautiously in a site by site analyses. Although, the vector representing FRNA bacteriophage genotype II is closer to HADV vector than any other, the long distance between them reflects the fact that detection in the same samples is not as common, neither is it for ADV41. We conclude that detection of complete set of molecular indicators could be used as a precautionary measure for accurate discrimination between wastewater and wastewater mixtures [33,48].

Previous studies [12,18] measuring the absolute number of genomes for various molecular indicators have reported similar results to our own (S3 and S4 Figs). However, the diversity of water origin within a wide water quality spectrum allows a number of conclusions to be drawn from the relationships of the water quality variables and the molecular virus indicators.

As well as quantifying the levels of various viral indicators, we also conducted *in situ* measurements of various physicochemical parameters such as dissolved oxygen, pH, electrical conductivity, and temperature, in the four water systems. Dissolved oxygen was unique in showing an inverse correlation with the other parameters we measured, particularly the molecular indicators of viruses. This behavior might be partly explained by the role of oxygen in virus inactivation [41,49]; otherwise it just shows the inverse relation between oxygen concentration and consuming organic matter, which is mostly in particulate form and aggregate virus particles [50]. Nevertheless, the FRNA bacteriophage genotype II genome number increment clearly showed water quality degradation within the 50th percentile for faecal enterococci and

subsequent samples of examined set, and was also associated closely with HADV and HADV41 genome counts. Such a relationship between viral indicators has been reported previously [12] for river water that receives wastewater. However, the extent to which the relationship is maintained has now been determined. When the water samples under the 50th percentile were included in the PCA analysis, the samples containing HADV were potentially identified by a combination of pH, conductivity, and FRNA genotype II interval values, all of them known indicators of wastewater abrupt water quality change.

In our analyses, the position of the FRNA bacteriophage genotype I values over the 50th percentile is nearest to the faecal enterococci genome number; hence, there is no advantage in using this genotype to indicate the presence of virus in comparison with genotypes II and III. In the lower percentiles, FRNA bacteriophage genotype I and conductivity coordinates approached each other, probably reflecting a slow sustained increment of ions caused by weathering and non-point sources [42]. In consequence, there was a conductivity increase, concurrent with the extended persistence of FRNA bacteriophages genotype I in contact with their host in old [43] rather than fresh wastewater input. Even so, it seems that with the FRNA bacteriophage genotype III, which is less resistant than FRNA genotypes I and II, there is a loss of ability to indicate the presence of HADV, as it is probably removed from the highest percentiles being the most distant in the lowest percentiles. Nonetheless, this genotype is associated with faecal enterococci in mixed non-point sources. Like in Vergara, et al., (2015), the media of FRNA GIII number of genomes was quite below that of genotypes I and II [18]; however, media of genotype II outnumbered that of genotype I, probably due to urban wastewater predominance at most of the sampling points. Detailed analysis of FRNA bacteriophage genotype III genomic variation has shown its specific association with wastewater or animal sources [44]; however, this distinction was beyond the scope of this study.

A limitation of this study was the small number of water samples in the first deciles that capture the transitory nature of the emissions [45]; this resulted in an incomplete description of the virus distribution. Secondly, since samples were obtained from various aquatic systems, the results should not be extrapolated a priori, but advantages of each molecular indicator, should be addressed locally to suit specified water quality use. However, use of biological indicators as proxy measures for the presence of enteric viruses and water quality breaches in Central Mexico is supported by FRNA bacteriophage genomes being detected in spring water used as a source for the production of potable water in the Mezquital Valley area. In conclusion, Molecular indicator quantitation combined with multivariate statistical analyses showed functionality at inferring water quality degradation caused by sewage contamination. FRNA bacteriophage genotypes II and III, as well as HADV, can be used as indicators as long as the faecal enterococci numbers are above the 50th percentile in mixed waters contaminated with sewage. These indicators may provide a useful early warning system for the contamination arising from sewage sources in water systems, or for recent contamination via virus emission, particularly in tropical water environments that are affected by enteric pathogens. Looking ahead, implementation of molecular indicators for proxy measurement of virus pollution in fresh wastewater to bring about reductions in the transmission of waterborne enteric bacteria and viruses in middle-income countries is technically feasible.

Supporting Information

S1 Table. Sampling points geographic coordinates.
(DOCX)

S2 Table. Amplification profile of qPCR of FRNA bacteriophages and adenovirus from environment water bodies.

(DOCX)

S1 Fig. Dendrogram showing similarities in the higher than 50th percentile values for the faecal enterococci percentiles in tropical water samples.

(TIF)

S2 Fig. Cumulative distribution of faecal enterococci among representative samples.

(TIF)

S3 Fig. Fecal indicator concentrations at sampling points in Central Mexico.

(PNG)

S4 Fig. Fecal indicator concentrations at selected sampling points in Central Mexico.

(PNG)

S5 Fig. Amplification profile of RT-qPCR for FRNA bacteriophages GI from RNA extracted from waste water. Amplification plot.

(TIF)

S6 Fig. Amplification profile of RT-qPCR for FRNA bacteriophages GI from RNA extracted from waste water. Standard curve.

(TIF)

S7 Fig. Amplification profile of RT-qPCR for FRNA bacteriophages GII from RNA extracted from waste water. Amplification plot.

(TIF)

S8 Fig. Amplification profile of RT-qPCR for FRNA bacteriophages GII from RNA extracted from waste water. Standard curve.

(TIF)

S9 Fig. Amplification profile of RT-qPCR for FRNA bacteriophages GIII from RNA extracted from waste water. Amplification plot.

(TIF)

S10 Fig. Amplification profile of RT-qPCR for FRNA bacteriophages GIII from RNA extracted from waste water. Standard curve.

(TIF)

S11 Fig. Amplification profile of qPCR for human adenovirus DNA extracted from waste water. Amplification plot.

(TIF)

S12 Fig. Amplification profile of qPCR for adenovirus genotype 41 DNA extracted from waste water. Amplification plot.

(TIF)

Acknowledgments

Luis José René Arredondo-Hernández is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship number 34380 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Our special thanks go to Dr. Patricia Orduña and Ruben Cantú who provided expertise in fragment cloning and qPCR standardization.

Author Contributions

Conceptualization: LJRAH MMH.

Formal analysis: LJRAH MMH CDA.

Funding acquisition: MMH GCR YLV.

Investigation: LJRAH MMH GCR YLV.

Methodology: CDA MMH LJRAH.

Project administration: MMH GCR YLV.

Resources: MMH YLV.

Supervision: LJRAH MMH CDA YLV.

Validation: LJRAH YLV.

Visualization: LJRAH CDA MMH.

Writing – original draft: LJRAH MMH YLV.

Writing – review & editing: LJRAH YLV GCR MMH.

References

- Ramani S, Kang G (2009) Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Curr Opin Infect Dis* 22: 477–482. PMID: [19633550](#)
- Kumar T, Shrivastava A, Kumar A, Laserson KF, Narain JP, Venkatesh S, et al. (2015) Viral Hepatitis Surveillance—India, 2011–2013. *Morb Mortal Wkly Rep (MMWR)* 64: 758–762.
- Curriero FC, Patz JA, Rose JB, Lele S (2001) The association between extreme precipitation and water-borne disease outbreaks in the United States, 1948–1994. *Am J Public Health* 91: 1194–1199. PMID: [11499103](#)
- Guzman Herrador BR, de Blasio BF, MacDonald E, Nichols G, Sudre B, Vold L, et al. (2015) Analytical studies assessing the association between extreme precipitation or temperature and drinking water-related waterborne infections: a review. *Environmental Health* 14: 29. doi: [10.1186/s12940-015-0014-y](#) PMID: [25885050](#)
- Reynolds KA, Mena KD, Gerba CP (2008) Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 192: 117–158. PMID: [18020305](#)
- Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS (2010) Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health* 7: 2620–2637. doi: [10.3390/ijerph7062620](#) PMID: [20644692](#)
- Kiulia NM, Hofstra N, Vermeulen LC, Obara MA, Medema G, Rose JB (2015) Global occurrence and emission of rotaviruses to surface waters. *Pathogens* 4: 229–255. doi: [10.3390/pathogens4020229](#) PMID: [25984911](#)
- Ye XY, Ming X, Zhang YL, Xiao WQ, Huang XN, Cao YG, et al. (2012) Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. *Curr Microbiol* 65: 244–253. doi: [10.1007/s00284-012-0152-1](#) PMID: [22645016](#)
- Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP (2009) Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol* 107: 1769–1780. doi: [10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x](#) PMID: [19486213](#)
- Maurer CP, Simonetti AB, Staggemeier R, Rigotto C, Heinzelmann LS, Spilki FR (2015) Adenovirus, enterovirus and thermotolerant coliforms in recreational waters from Lake Guaíba beaches, Porto Alegre, Brazil. *J Water Health* 13: 1123–1129. doi: [10.2166/wh.2015.277](#) PMID: [26608773](#)
- Ferrer A, Nguyen-Viet H, Zinsstag J (2012) Quantification of diarrhea risk related to wastewater contact in Thailand. *Ecohealth* 9: 49–59. doi: [10.1007/s10393-012-0746-x](#) PMID: [22311100](#)
- Ogorzaly L, Tissier A, Bertrand I, Maul A, Gantzer C (2009) Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Res* 43: 1257–1264. doi: [10.1016/j.watres.2008.12.011](#) PMID: [19121532](#)

13. Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M (2012) Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int* 45: 151–164. doi: [10.1016/j.envint.2012.02.009](https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.009) PMID: [22537583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22537583/)
14. Levy K, Nelson KL, Hubbard A, Eisenberg JN (2012) Rethinking indicators of microbial drinking water quality for health studies in tropical developing countries: case study in northern coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 86: 499–507. doi: [10.4269/ajtmh.2012.11-0263](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0263) PMID: [22403326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22403326/)
15. Jang J, Di DY, Han D, Unno T, Lee JH, Sadowsky MJ, et al. (2015) Dynamic changes in the population structure of *Escherichia coli* in the Yeongsan River basin of South Korea. *FEMS Microbiol Ecol* 91.
16. Havelaar AH, van Olphen M, Drost YC (1993) F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 59: 2956–2962. PMID: [8215367](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8215367/)
17. Cole D, Long SC, Sobsey MD (2003) Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl Environ Microbiol* 69: 6507–6514. doi: [10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003) PMID: [14602607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14602607/)
18. Vergara GG, Goh SG, Rezaeinejad S, Chang SY, Sobsey MD, Gin KY (2015) Evaluation of FRNA coliphages as indicators of human enteric viruses in a tropical urban freshwater catchment. *Water Res* 79: 39–47. doi: [10.1016/j.watres.2015.04.022](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.022) PMID: [25965886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25965886/)
19. Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Dore W (2013) Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. *Water Res* 47: 5222–5231. doi: [10.1016/j.watres.2013.06.008](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.008) PMID: [23850211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23850211/)
20. Lodder WJ, van den Berg HH, Rutjes SA, de Roda Husman AM (2010) Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 76: 5965–5971. doi: [10.1128/AEM.00245-10](https://doi.org/10.1128/AEM.00245-10) PMID: [20622124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20622124/)
21. Mena KD, Gerba CP (2009) Waterborne adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol* 198: 133–167. doi: [10.1007/978-0-387-09647-6_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6_4) PMID: [19253037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19253037/)
22. Aslan A, Xagorarakis I, Simmons FJ, Rose JB, Dorevitch S (2011) Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *J Appl Microbiol* 111: 1250–1261. doi: [10.1111/j.1365-2672.2011.05130.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05130.x) PMID: [21854513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21854513/)
23. Mazari-Hiriart M, Perez-Ortiz G, Orta-Ledesma MT, Armas-Vargas F, Tapia MA, Solano-Ortiz R, et al. (2014) Final opportunity to rehabilitate an urban river as a water source for Mexico City. *PLoS One* 9: e102081. doi: [10.1371/journal.pone.0102081](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102081) PMID: [25054805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25054805/)
24. Sanchez-Azofeifa GA, Quesada M, Cuevas-Reyes P, Castillo A, Sanchez-Montoya G (2009) Land cover and conservation in the area of influence of the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, Mexico. *Forest Ecology and Management* 258: 907–912.
25. Mazari-Hiriart M, Ponce-de-Leon S, Lopez-Vidal Y, Islas-Macias P, Amieva-Fernandez RI, Quinones-Falconi F (2008) Microbiological implications of periurban agriculture and water reuse in Mexico City. *PLoS One* 3: e2305. doi: [10.1371/journal.pone.0002305](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002305) PMID: [18509453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18509453/)
26. de Anda J, Shear H (2008) Challenges Facing Municipal Wastewater Treatment in Mexico. *Public Works Management & Policy* 12: 590–598.
27. Eaton AD, Clesceri LS, Rice EW, Greenberg AB (2005) Standard Methods for the Examination of Water: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation.
28. Hill VR, Polaczyk AL, Hahn D, Narayanan J, Cromeans TL, Roberts JM, et al. (2005) Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. *Appl Environ Microbiol* 71: 6878–6884. doi: [10.1128/AEM.71.11.6878-6884.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6878-6884.2005) PMID: [16269722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16269722/)
29. King C, Debruyne R, Kuch M, Schwarz C, Poinar H (2009) A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *Biotechniques* 47: 941–949. doi: [10.2144/000113244](https://doi.org/10.2144/000113244) PMID: [20041847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20041847/)
30. Rodriguez RA, Thie L, Gibbons CD, Sobsey MD (2012) Reducing the effects of environmental inhibition in quantitative real-time PCR detection of adenovirus and norovirus in recreational seawaters. *J Virol Methods* 181: 43–50. doi: [10.1016/j.jviromet.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.01.009) PMID: [22326277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22326277/)
31. Ogorzaly L, Gantzer C (2006) Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *J Virol Methods* 138: 131–139. doi: [10.1016/j.jviromet.2006.08.004](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004) PMID: [16997389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16997389/)
32. Ogorzaly L, Gantzer C (2007) Erratum to Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *J Virol Methods* 143: 122.

33. Wolf S, Hewitt J, Greening GE (2010) Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol* 76: 1388–1394. doi: [10.1128/AEM.02249-09](https://doi.org/10.1128/AEM.02249-09) PMID: [20061455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20061455/)
34. Jothikumar N, Cromeans TL, Hill VR, Lu X, Sobsey MD, Erdman DD (2005) Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41. *Appl Environ Microbiol* 71: 3131–3136. doi: [10.1128/AEM.71.6.3131-3136.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3131-3136.2005) PMID: [15933012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15933012/)
35. Jiang S, Dezfulian H, Chu W (2005) Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters. *Can J Microbiol* 51: 393–398. doi: [10.1139/w05-016](https://doi.org/10.1139/w05-016) PMID: [16088334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16088334/)
36. Xagorarakis I, Kuo DH, Wong K, Wong M, Rose JB (2007) Occurrence of human adenoviruses at two recreational beaches of the great lakes. *Appl Environ Microbiol* 73: 7874–7881. doi: [10.1128/AEM.01239-07](https://doi.org/10.1128/AEM.01239-07) PMID: [17933924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17933924/)
37. Wallace J, Champagne P, Hall G (2016) Multivariate statistical analysis of water chemistry conditions in three wastewater stabilization ponds with algae blooms and pH fluctuations. *Water Res* 96: 155–165. doi: [10.1016/j.watres.2016.03.046](https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.046) PMID: [27038585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27038585/)
38. Fons-Castells J, Tent-Petrus J, Llauro M (2016) Simultaneous determination of specific alpha and beta emitters by LSC-PLS in water samples. *J Environ Radioact*.
39. Pruss-Ustun A, Bartram J, Clasen T, Colford JM Jr., Cumming O, Curtis V, et al. (2014) Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene in low- and middle-income settings: a retrospective analysis of data from 145 countries. *Trop Med Int Health* 19: 894–905. doi: [10.1111/tmi.12329](https://doi.org/10.1111/tmi.12329) PMID: [24779548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24779548/)
40. Simmons FJ, Xagorarakis I (2011) Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Res* 45: 3590–3598. doi: [10.1016/j.watres.2011.04.001](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.001) PMID: [21570703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21570703/)
41. Line DE (2013) Effect of development on water quality for seven streams in North Carolina. *Environ Monit Assess* 185: 6277–6289. doi: [10.1007/s10661-012-3024-z](https://doi.org/10.1007/s10661-012-3024-z) PMID: [23307048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23307048/)
42. Lata P, Ram S, Agrawal M, Shanker R (2009) Enterococci in river Ganga surface waters: propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BMC Microbiol* 9: 140. doi: [10.1186/1471-2180-9-140](https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-140) PMID: [19615089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19615089/)
43. Lucas FS, Thieriault C, Goncalves A, Servais P, Rocher V, Mouchel JM (2014) Variation of raw wastewater microbiological quality in dry and wet weather conditions. *Environ Sci Pollut Res Int* 21: 5318–5328. doi: [10.1007/s11356-013-2361-y](https://doi.org/10.1007/s11356-013-2361-y) PMID: [24271734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24271734/)
44. Chavez A, Jimenez B, Maya C (2004) Particle size distribution as a useful tool for microbial detection. *Water Sci Technol* 50: 179–186.
45. Colford JM Jr., Wade TJ, Schiff KC, Wright CC, Griffith JF, Sandhu SK, et al. (2007) Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. *Epidemiology* 18: 27–35. PMID: [17149140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17149140/)
46. Fleisher JM, Fleming LE, Solo-Gabriele HM, Kish JK, Sinigalliano CD, Plano L, et al. (2010) The BEACHES Study: health effects and exposures from non-point source microbial contaminants in subtropical recreational marine waters. *Int J Epidemiol* 39: 1291–1298. doi: [10.1093/ije/dyq084](https://doi.org/10.1093/ije/dyq084) PMID: [20522483](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20522483/)
47. Passerat J, Ouattara NK, Mouchel JM, Rocher V, Servais P (2011) Impact of an intense combined sewer overflow event on the microbiological water quality of the Seine River. *Water Res* 45: 893–903. doi: [10.1016/j.watres.2010.09.024](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.024) PMID: [20934197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20934197/)
48. Dorevitch S, Pratap P, Wroblewski M, Hryhorczuk DO, Li H, Liu LC, et al. (2012) Health risks of limited-contact water recreation. *Environ Health Perspect* 120: 192–197. doi: [10.1289/ehp.1103934](https://doi.org/10.1289/ehp.1103934) PMID: [22030231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22030231/)
49. Hanjra MA, Blackwell J, Carr G, Zhang F, Jackson TM (2012) Wastewater irrigation and environmental health: implications for water governance and public policy. *Int J Hyg Environ Health* 215: 255–269. doi: [10.1016/j.ijheh.2011.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.10.003) PMID: [22093903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22093903/)
50. Hejkal TW, Wellings FM, Lewis AL, LaRock PA (1981) Distribution of viruses associated with particles in waste water. *Appl Environ Microbiol* 41: 628–634. PMID: [7224627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7224627/)