



Drinking Water Library: nuevo recurso para identificar cepas bacterianas en aguas de consumo

De acuerdo con el RD 140/2003, el agua apta para el consumo humano no debe mostrar presencia de los indicadores bacterianos *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Enterococcus sp.* Pero, aunque no se detecten estos indicadores, el agua del grifo no es estéril y puede tener cierta cantidad de microorganismos que muchas veces puede generar colonias en las placas de cultivo. Lejos de representar un peligro para la salud humana, si se dispone de un método rápido, sencillo, robusto y fiable para la identificación de estas colonias, se puede avanzar mucho en el conocimiento de la microbiología del agua potable. El proyecto Drinking Water Library ha permitido desarrollar la primera base de datos para MALDI-TOF MS específica para bacterias presentes en aguas de consumo.

Palabras clave

Identificación bacteriana, MALDI-TOF MS, aguas de consumo, redes de distribución, embotelladas, manantiales, aguas de proceso.

DRINKING WATER LIBRARY: BACTERIAL IDENTIFICATION NEW RESOURCE IN DRINKING WATER

Spanish regulation RD 140/2003 notes that drinking water should not show the presence of the bacterial indicators Escherichia coli, Clostridium perfringens and Enterococcus sp. But, even if these indicators are not detected, the tap water is not sterile and can have a certain number of microorganisms which generate colonies in the solid culture media. Although these microorganisms don't present a danger to human health, with a quick, simple, robust and reliable method for the bacterial identification, it's possible to advance in the knowledge of the microbiology of drinking water. The Drinking Water Library project allows the development of the first database for MALDI-TOF MS specific for bacteria present in drinking water.

Keywords

Bacterial identification, MALDI-TOF MS, drinking water, supply networks, bottled water, spring water, process water.

Belén Galofre; Carles Vilaró

Aigües de Barcelona, Empresa Metropolitana de Gestió del Cicle Integral de l'Aigua

Sonia Fernández; David Baquero;

Susana González

Cetaqua, Centro Tecnológico del Agua

Anicet R. Blanch; Francisco Lucena;

Cristina García-Aljaro; Laura Sala-Comorera;

Daniel Toribio

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona

Maria A. Ruvira; Lidia Rodrigo-Torres;

M. Carmen Macián; David R. Arahall;

Maria J. Pujalte; Rosa Aznar

Departamento de Microbiología y Ecología, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia



1. INTRODUCCIÓN

Aunque existe un control microbiológico de las aguas destinadas a consumo humano tal y como queda recogido en la legislación vigente (RD 140/2018) sobre la calidad del agua de consumo humano, ni el agua de los sistemas de abastecimiento ni el agua embotellada son aguas estériles, sino que contienen microorganismos ambientales, representantes de la microbiota habitual del ecosistema del que proceden. Conocer la composición microbiológica de toda esta microbiota es importante para la mejora en los sistemas de tratamiento de aguas destinadas a consumo, así como en los sistemas de distribución.

Actualmente, los laboratorios de microbiología utilizan principalmente tres métodos de identificación bacteriana: cultivos en placa, métodos moleculares y métodos basados en proteómica. Los cultivos requieren de un tiempo de respuesta más elevado que las técnicas moleculares. En cambio, estas últimas tienen un coste económico más elevado. En el caso de métodos moleculares se precisa, además, de personal especializado para realizar la identificación.

Dentro de los métodos basados en proteómica, se encuentra la espectrometría de masas MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) (**Figura 1**). Esta es una técnica rápida, sencilla de aplicar y robusta en cuanto a fiabilidad de resultados, pero está muy acotada al ámbito clínico y no se había desarrollado hasta ahora para el sector ambiental. La identificación mediante MALDI-TOF MS requiere de cultivos en placa, por lo que la identificación no es inmediata. Pero una vez las bacterias han crecido en

placas de cultivo, la identificación es muy rápida, de unos pocos minutos.

Es por ello que se pensó que disponer de una base de datos de bacterias acuáticas validada para MALDI-TOF MS redundaría en beneficio del control microbiológico rutinario que se realiza en las operadoras de tratamiento y distribución de agua, ya sea potabilizada o embotellada.

Por esta razón se llevó a cabo el proyecto Drinking Water Library (DWL) para el desarrollo de una base de datos de perfiles MALDI-TOF para identificar cepas bacterianas presentes en aguas de consumo (aguas de proceso, red de distribución, manantiales y embotelladas). El proyecto DWL se desarrolló entre octubre 2015 y diciembre 2018, a través de la colaboración entre Aigües de Barcelona y los centros de investigación públicos Fundació Bosch i Gimpera-Universidad de Barcelona (FBG-UB) y la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)-Universidad de Valencia, junto con la participación de Bruker, y con el apoyo técnico del Centro Tecnológico del Agua (Cetaqua).

Gracias al proyecto DWL se ha logrado obtener la primera base de datos para MALDI-TOF MS específica para bacterias presentes en aguas de consumo. Esta colección, formada por 320 cepas diferentes, supone un beneficio para el control microbiológico rutinario que se realiza en las operadoras de tratamiento y distribución de agua, ya sea potabilizada o embotellada, dado que ayuda a caracterizar microbiológicamente el agua de suministro.

Este proyecto ha sido cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y el Ministerio de Economía y Competitividad, en el marco del programa Retos - Colaboración 2015 (RTC-2015-4496).

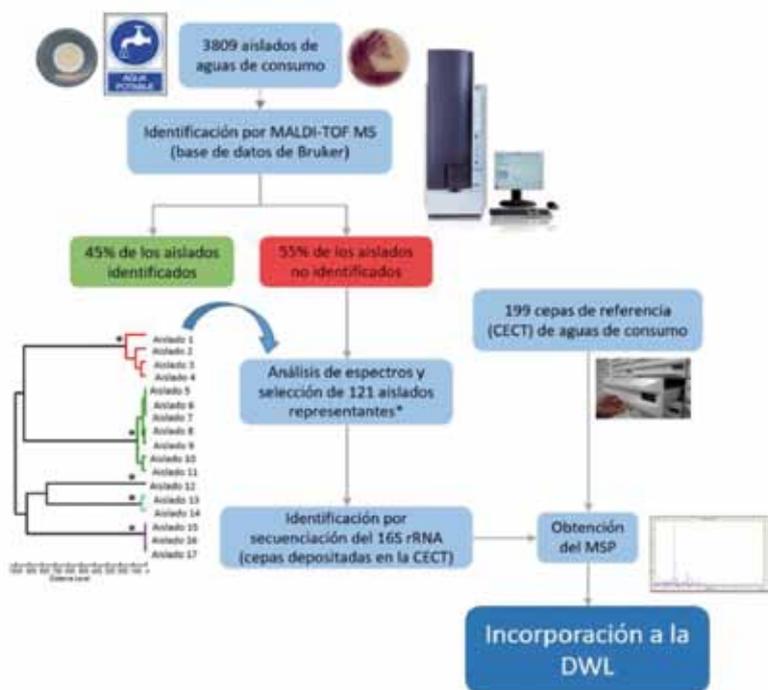
2. MATERIALES Y MÉTODOS

Como se muestra en el diagrama del proyecto (**Figura 2**), para la creación de la base de datos DWL, por una parte se seleccionaron aislados ambientales de aguas de consumo y, por otra parte, se seleccionaron cepas acuáticas de referencia de la CECT.

FIGURA 1. Equipo MALDI-TOF MS.



FIGURA 2. Diagrama del proyecto para la creación de la base de datos DWL.



En primer lugar, del total de 3.846 bacterias del catálogo de la CECT correspondiente a depósitos públicos se realizó una búsqueda de las cepas asociadas a aguas de consumo humano y ambientales considerando la fuente de aislamiento (agua de consumo humano), medio de cultivo (R2A), temperatura de crecimiento (20-30 °C) y que fueran cepas pertenecientes a géneros o especies asociadas al agua de consumo humano. El número de cepas que cumplía estos criterios fue de 199. De las cepas de referencia, se crearon sus respectivos perfiles, *Main Spectrum Profile* (MSP), realizando el protocolo de extracción de proteínas recomendado por Bruker Daltonics, en el cual se adquieren y se agrupan 20-24 espectros para cada una de las cepas. A su vez, se realizó una determinación de los perfiles de ácidos grasos mediante *Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters* (GC-FAME), como método de autenticación de cepas.

Paralelamente, se seleccionaron y establecieron los puntos de muestreo de los cuatro grupos de matrices objeto de estudio: procesos de potabilización (aguas de proceso), red de distribución, manantiales y aguas embotelladas. En la **Tabla 1** se muestra el número total de matrices, muestras y colonias analizadas para los cuatro diferentes orígenes de los aislados bacterianos. Durante la totalidad del proyecto, se analizaron 77 matrices diferentes, 209 muestras y se recuperaron un total de 3.809 colonias.

Las cepas bacterianas aisladas de muestras ambientales de agua se analizaron utilizando la base de datos de Bruker Daltonics, permitiendo identificar a nivel de especie y género 1.725 cepas de las 3.809 aisladas durante el proyecto, es decir, un 45% de las cepas bacterianas aisladas. Esta ratio de identificación es normal en muestras ambientales, las cuales tienen una biodiversidad superior a las obtenidas en ámbito clínico, que consisten en una serie de patógenos actualmente muy estudiada y acotada.

Los restantes aislados ambientales no identificados, 2.084 en total (55% de las cepas bacterianas aisladas), fueron agrupados en clústeres según su perfil MALDI-TOF MS, con el objetivo de evitar redundancias. Para cada clúster obtenido, se seleccionó una cepa representante que, junto con los aislados que quedaron sin agrupar, se enviaron a la CECT con la finalidad de establecer su identificación taxonómica mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA y para su caracterización mediante GC FAME. De los 134 aislados identificados en la CECT, 121 fueron depositados y sus MSP fueron incorporados a la DWL.

Para determinar la calidad de la base de datos final, se realizó una validación interna de aproximadamente un 10% de las cepas que

TABLA 1
ANÁLISIS DE LOS AISLADOS ANALIZADOS DURANTE EL PROYECTO.

Aislados	Matrices	Muestras	Colonias analizadas
Manantial	2	2	356
Embotellada	12	30	1.926
Red de distribución	50 (42 municipios)	109	1.085
Agua de proceso	13	68	442
Total DWL	77	209	3.809



FIGURA 3. Contenido de la base de datos DWL y origen de los aislados depositados.



componen la base de datos DWL con el espectrómetro de masas Microflex (Bruker Daltonics) de Aigües de Barcelona. Adicionalmente, se realizó una validación externa en distintos centros y universidades a nivel nacional que disponen del sistema de identificación MALDI Biotyper.

3. RESULTADOS

Durante los tres años de proyecto se desarrolló una base de datos de perfiles MALDI-TOF MS para la identificación de cepas bacterianas presentes en aguas de consumo. La base de datos DWL, como se muestra en la **Figura 3**, quedó compuesta por 320 MSP, de los cuales 199 MSP pertenecen a cepas de referencia iniciales de la CECT y 121 MSP corresponden a los aislados generados durante el proyecto. La distribución de aislados según el origen es la siguiente: 45 aislados procedentes de red de distribución, 29 aislados de aguas de procesos de potabilización, 35 aislados procedentes de aguas embotelladas y 12 procedentes de manantial.

La base de datos DWL está compuesta por 98 géneros bacterianos diferentes, de los cuales 45 no están representados en la base de datos comercial de Bruker, ampliando así la capacidad de identificación de la téc-

nica. Además, uno de los aislados no se llegó a identificar con las técnicas de referencia y se considera un posible nuevo género. En la **Figura 4**, se muestran los géneros más abundantes en la DWL, siendo *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas* y *Methylobacterium* los géneros que incluyen más cepas dentro de la DWL.

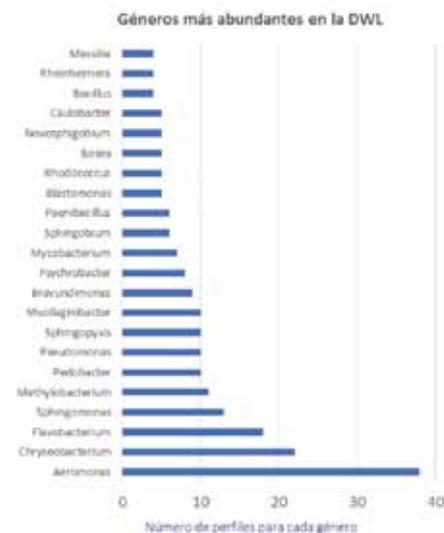
A nivel de especie, la DWL aporta 189 especies no representadas en la base de datos comercial de Bruker, de las cuales 69 son posibles nuevos taxones.

» La nueva base de datos de bacterias de aguas de consumo incrementa el potencial de identificación de aislados acuáticos

4. CONCLUSIONES

La nueva base de datos de bacterias de aguas de consumo, DWL, amplía la base de datos comercial de Bruker en 320 perfiles, siendo muchos de ellos correspondientes a nuevas especies bacterianas, incrementando así el potencial de identificación de aislados acuáticos.

FIGURA 4. Géneros más abundantes en la DWL.



Esta base de datos puede ser una herramienta de gran utilidad para laboratorios de aguas, empresas suministradoras de agua, universidades, centros de investigación y usuarios de MALDI-TOF MS, dado que ayudan a la identificación rápida y robusta de bacterias asociadas a aguas, especialmente en las de consumo humano.

En el marco de este trabajo colaborativo con la Universidad de Barcelona y la Colección Española de Cultivos Tipo, el laboratorio de Microbiología de Aigües de Barcelona se ha dotado de la capacidad y experiencia en la identificación de bacterias de aguas de consumo humano con su equipo propio MALDI-TOF MS a través de la base de datos comercial de Bruker y de la nueva DWL.

5. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto está cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), enmarcado en el Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad, del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016.