



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Bacteriòfags de bacterias entéricas en aguas de baño

Núria Contreras Coll

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

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

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



**Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona**

***BACTERIÓFAGOS DE BACTERIAS ENTÉRICAS
EN AGUAS DE BAÑO***

**Núria Contreras Coll
Tesis doctoral, 2000**



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

043 x
UB
CON
bac

***BACTERIÓFAGOS DE BACTERIAS ENTÉRICAS
EN AGUAS DE BAÑO***

Núria Contreras Coll
BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA
Tràctat de microbiologia, 2000



0700538694

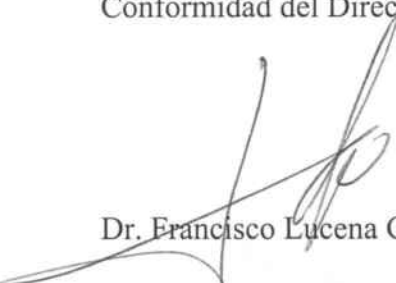


**Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona**

***BACTERIÓFAGOS DE BACTERIAS ENTÉRICAS
EN AGUAS DE BAÑO***

Memoria presentada por *Núria Contreras Coll*
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Conformidad del Director de la tesis


Dr. Francisco Lucena Gutiérrez

Programa de doctorado:
Microbiología Ambiental y Biotecnología (1995-1997)
Tutor de estudios de doctorado: Dr. Antonio Juárez Giménez

Barcelona, Diciembre de 2000.

*Voy andando. A veces, la vida va por delante,
llevándome y arrastrándome, alegre,
dolorosa, inconsciente. Otras, abro yo el
camino muy seguro de mí, y elijo mis sendas, y
miro, corro, descanso, descubro, y me exalto
ante todo lo que hay delante de mí.*

Julio Villar (1974)

*A Salvador,
a mis padres,
a mi hermana
y a todos aquellos que
siempre confiaron en mí.*

En el camino de la vida, distintas circunstancias nos invitan a seguir por uno u otro sendero. El destino, la casualidad, o por qué no nuestra propia libertad, nos decantan hacia una aventura particular. En este viaje a través del mundo de los bacteriófagos, me han acompañado numerosas personas que han hecho posible este sueño y a las cuales quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En este escenario particular, el director ha sido F.L., positivo y vital, siempre dispuesto a ayudar (laboratorio, diseño experimental, recogida de muestras, concentración, memoria doctoral, etc.) y a comprender las situaciones particulares. Sin su dedicación, transmisión de energía y motivación esta obra seguro que no existiría. A él le debo el mérito de este trabajo. En este contexto, también quiero agradecer la confianza y ayuda prestada por J.J. y R.A, y la amabilidad de A.B. y R.G.

A J.M. y J.D., dos de los mejores marineros de a bordo, que me consintieron y mimaron incluso en los momentos difíciles de marea en alta mar, son una muestra ineludible de compañerismo. No acabaría de enumerar nunca las tareas en las que XM me ha ofrecido su ayuda incondicional. También mi compañera de escena, I.M, con la que he compartido momentos de "incerteza científica".

No quiero dejar de nombrar a M.T., que en numerosas ocasiones me ha transmitido la fortaleza y coraje que me faltaban, L.M. cordial y vivaz me ha hecho participe de sus alegrías y N.Q., despierta y amable en toda ocasión. También a Y.N. que gracias a los comentarios a la hora del café, me empujó a tomar una de las decisiones más importantes de mi vida; M.S. amigable me animó en todo momento a seguir adelante, A.E.D. que aún en los momentos difíciles siempre encuentra un motivo para reír, O.R. paciente y comprensiva, S.P., que en su momento me ofreció amistad, S.B., que con su vitalidad contagia (en el buen sentido de la palabra) a su alrededor, y por supuesto a R. por su valiosa ayuda técnica. A todas vosotras, gracias por haberme hecho la vida más feliz.

A los chicos del agua, J., J.R. y X.V., que me abastecieron con ella siempre que fue necesario.

Al resto de compañeros de grupo, por ser tan simpaticotas/es.

No puedo olvidar a M.C. que siempre he podido contar con ella para cualquier cuestión técnica, A.P. y M.P. mis entusiastas profesoras de fagos de Bacteroides, J.F. por los ratos que me ha hecho reír, X.A. por el "buen rollo", J.L. cuya obra he referido en numerosas ocasiones en esta memoria y a S.M. que me introdujo en el mundo del navegante.

Al resto de marineros y grumetes de este navío, agradecerles la tolerancia y buen humor en las circunstancias de poco espacio del velero.

La comunicación con tierra ha sido un punto de apoyo importante en esta travesía: N.M., comprensiva y firme, siempre ha estado ahí cuando la he necesitado; también S.P', M.P', S.C., O.A., L.C., y como no, mi hermana L.C'.

A l'E.E. que, aunque todavía no es muy consciente de ello, me ha transmitido sentimientos bondadosos y positivos.

A mis padres, por haber comprendido mis decisiones y apoyarme en todo cuanto han podido, les debo mi formación personal y profesional.

Esta aventura ha llegado a su final, no sin la ayuda insustituible de mi compañero sentimental, que con su sincero amor, nobleza e ingenio ha luchado siempre a mi lado. Ja saps que sense el teu suport no ho hauria aconseguit mai. Sempre t'estimaré.

Diciembre 2000

Ayudas financieras:

Beca FPI del Ministerio de Educación y Ciencia (convocatoria 95)

Beca de colaboración para estudiantes de tercer ciclo de la Universidad de Barcelona (convocatoria 00-2)

Ayudas técnicas:

Ramon (Serveis Científico-tècnics de la UB), Francisco, Javi, Jordi, Maite, Núria Q., Rosario, Laura, Yolanda, Olga, Sonia, Anna, Montse, Toni N., Míriam, Rosa, Salvador, Oriol.

ÍNDICE

□	ÍNDICE DE CONTENIDOS	ii
□	<i>Capítulo I:</i> INTRODUCCIÓN GENERAL	1
□	<i>Capítulo II:</i> MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	47
□	<i>Capítulo III:</i> NECESIDAD DE UN MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE BACTERIÓFAGOS VÁLIDO PARA AGUAS DE BAÑO Y DE FÁCIL APLICACIÓN EN LABORATORIOS DE RUTINA	65
□	<i>Capítulo IV:</i> CONCENTRACIÓN E INTRODUCCIÓN A LA ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS	170
□	<i>Capítulo V:</i> PERSISTENCIA DE BACTERIÓFAGOS EN EL AMBIENTE ACUÁTICO	235
□	ABREVIATURAS	295
□	REFERENCIAS	299
□	ANEXOS	319

Capítulo I: Introducción general

1.1 INDUSTRIA TURÍSTICA Y AGUAS DE BAÑO	1
1.1.1 CICLO DE CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS COSTERAS Y ÁREAS RECREATIVAS FLUVIALES	2
1.1.2 PELIGROS EN AGUAS RECREATIVAS	4
1.1.2.1 SALUD PÚBLICA CON RELACIÓN A LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA RECREATIVA	5
1.1.3 VALORACIÓN DE PELIGRO Y RIESGO ("Risk assessment")	9
1.1.3.1 LA EPIDEMIOLOGÍA EN LA VALORACIÓN DE RIESGOS	10
1.1.3.1.1 Revisión de estudios epidemiológicos en aguas de baño	12
1.1.3.2 VIRUS ENTÉRICOS Y VALORACIÓN DE RIESGOS	16
1.2 CONCEPTO DE ORGANISMO MODELO EN LA HIGIENE DEL AGUA	18
1.2.1 ESTABLECIMIENTO DE ESTÁNDARES MICROBIOLÓGICOS	19
1.2.2 CRITERIOS DE CALIDAD Y ESTÁNDARES	22
1.2.2.1 CRITERIOS DE LA EPA PARA AGUAS DE BAÑO	23
1.2.2.2 VALORES GUÍA PROPUESTOS POR LA OMS	27
1.2.2.3 LIMITACIONES Y CONTRADICCIONES DE LA DIRECTIVA 76/160/CEE	28
1.2.2.4 PROBLEMAS CON EL ESTÁNDAR PARA ENTEROVIRUS	30
1.3 LOS BACTERIÓFAGOS EN LOS ESTUDIOS DE CALIDAD DEL AGUA	33
1.3.1 CONSIDERACIONES GENERALES	33
1.3.2 FUNCIÓN INDICADORA DE LOS BACTERIÓFAGOS	34
1.3.3 BACTERIÓFAGOS ENTÉRICOS: COLIFAGOS SOMÁTICOS, FAGOS F-ESPECÍFICOS DE RNA Y FAGOS QUE INFECTAN A <i>Bact. fragilis</i>	35
1.3.4 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN AGUAS	39
1.3.4.1 NECESIDAD DE MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN PARA FAGOS	40
1.3.5 BACTERIÓFAGOS DE BACTERIAS ENTÉRICAS EN AGUAS DE BAÑO	42
1.4 OBJETIVOS GENERALES DEL PRESENTE TRABAJO	45

Capítulo II: Materiales y métodos generales

2.1 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS	47
2.1.1 PROCEDIMIENTO	48
2.1.2 CONTROL DE LOS MATERIALES DE TRABAJO	53
2.2 PREPARACIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA Y CARTAS DE CONTROL PARA BACTERIÓFAGOS	60
2.3 DETERMINACIONES BACTERIOLÓGICAS	61
2.3.1 COLIFORMES TOTALES	61
2.3.2 COLIFORMES FECALES	61
2.3.3 <u>Escherichia coli</u>	61
2.3.4 ESTREPTOCOCOS FECALES Y ENTEROCOCOS	61
2.3.5 CONTROL DE CALIDAD DE LA ENUMERACIÓN DE <u>E. coli</u> Y ENTEROCOCOS	62
2.3.6 ESPORAS DE CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES	62
2.4 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	62
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	63

Capítulo III: Necesidad de un método de concentración de bacteriófagos válido para aguas de baño y de fácil aplicación en laboratorios de rutina

3.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	65
3.1.1 ANTECEDENTES. NECESIDAD DE CONCENTRAR	65
3.1.1.1 PRESENCIA DE BACTERIÓFAGOS FECALES EN AGUAS RECREATIVAS.	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
3.1.1.2 DATOS PRELIMINARES: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DIRECTO DE	
FAGOS EN MUESTRAS AMBIENTALES	70
3.1.1.2.1 Origen de la contaminación y fenómenos de dilución	75
3.1.2 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE VIRUS DEL MEDIO HÍDRICO	77
3.1.2.1 MÉTODOS NO BASADOS EN FENÓMENOS DE ADSORCIÓN-ELUCIÓN	79
3.1.2.2 TÉCNICAS BASADAS EN FENÓMENOS DE ADSORCIÓN	81
3.1.2.3 DETECCIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN VOLUMENES DE 100 ml	
Y SUPERIORES	84
3.1.2.4 ANÁLISIS DE LOS MÉTODOS PARA LA RECUPERACIÓN Y ENSAYO	
DE COLIFAGOS	90
3.1.3 OBJETIVOS	92
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	94
3.2.1 PLANTEAMIENTO GENERAL SEGUIDO EN EL ESTUDIO DE	
MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN	94
3.2.1.1 BACTERIÓFAGOS MODELO UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE	
CONCENTRACIÓN	94
3.2.1.2 DOPAJE DE LA MUESTRA CON STOCKS DE BACTERIÓFAGOS DE	
LABORATORIO	94
3.2.1.3 CÁLCULO DE LOS PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DE UN	
MÉTODO DE CONCENTRACIÓN	95
3.2.1.4 PLANTEAMIENTO GENERAL	96
3.2.2 MÉTODOS DE FILTRACIÓN	97
3.2.2.1 FILTROS INORGÁNICOS DE ÓXIDO DE ALUMINIO	97
3.2.2.2 FILTROS DE CELULOSA MODIFICADOS POR PRECIPITACIÓN	
"IN SITU" DE HIDRÓXIDOS FÉRRICO Y ALUMÍNICO	100
3.2.2.3 FILTROS ELECTROPOSITIVOS	101
3.2.2.4 FILTROS DE ACETATO/NITRATO DE CELULOSA	102
3.2.2.5 FILTROS DE NITRATO DE CELULOSA	104
3.2.2.6 UTILIZACIÓN DE PREFILTROS	105
3.2.2.7 OBSERVACIÓN DE MEMBRANAS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO	
DE BARRIDO	106
3.2.3 MÉTODOS DE FLOCULACIÓN	106

3.2.3.1 FLOCULACIÓN ORGÁNICA CON EXTRACTO DE CARNE	106
3.2.3.2 PRECIPITACIÓN DE EXTRACTO DE CARNE CON SULFATO AMÓNICO	107
3.2.3.3 FLOCULACIÓN POR HIDRÓXIDO DE MAGNESIO	108
3.3 RESULTADOS	111
3.3.1 MÉTODOS DE FILTRACIÓN	111
3.3.1.1 FILTROS INORGÁNICOS ANODISC™	111
3.3.1.2 FILTROS DE CELULOSA MODIFICADOS POR PRECIPITACIÓN “IN SITU” DE HIDRÓXIDOS FÉRRICO Y ALUMÍNICO	115
3.3.1.3 FILTROS ELECTROPOSITIVOS	116
3.3.1.4 FILTROS DE ACETATO/NITRATO DE CELULOSA	117
3.3.1.5 FILTROS DE NITRATO DE CELULOSA	123
3.3.1.6 UTILIZACIÓN DE PREFILTROS	124
3.3.1.7 OBSERVACIÓN DE MEMBRANAS AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO	130
3.3.2 MÉTODOS DE FLOCULACIÓN	133
3.3.2.1 FLOCULACIÓN ORGÁNICA CON EXTRACTO DE CARNE	133
3.3.2.2 PRECIPITACIÓN DE EXTRACTO DE CARNE CON SULFATO AMÓNICO	134
3.3.2.3 FLOCULACIÓN POR HIDRÓXIDO DE MAGNESIO	135
3.4 DISCUSIÓN	147
3.4.1 MÉTODOS DE FILTRACIÓN	147
3.4.1.1 FILTROS CON BAJA ACTIVIDAD DE UNIÓN A PROTEÍNAS	147
3.4.1.1.1 Filtros inorgánicos ANODISC™	147
3.4.1.1.2 Filtros de policarbonato y de PVDF	149
3.4.1.2 FILTROS DE CELULOSA MODIFICADOS POR PRECIPITACIÓN “IN SITU” DE HIDRÓXIDOS FÉRRICO Y ALUMÍNICO	150
3.4.1.3 FILTROS ELECTROPOSITIVOS	152
3.4.1.4 FILTROS DE ACETATO/NITRATO DE CELULOSA	153
3.4.1.5 FILTROS DE NITRATO DE CELULOSA	156
3.4.1.6 UTILIZACIÓN DE PREFILTROS	158
3.4.2 MÉTODOS DE FLOCULACIÓN	160
3.4.2.1 FLOCULACIÓN ORGÁNICA CON EXTRACTO DE CARNE	160
3.4.2.2 PRECIPITACIÓN DE EXTRACTO DE CARNE CON SULFATO AMÓNICO	161
3.4.2.3 FLOCULACIÓN POR HIDRÓXIDO DE MAGNESIO	162
3.5 CONCLUSIONES	166

Capítulo IV: Concentración e introducción a la ecología de bacteriófagos.

4.1 OBJETIVOS CAMPAÑA 1997	170
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS 97	172
4.3 RESULTADOS 97	175
4.3.1 CONTROL DE LOS MATERIALES DE TRABAJO UTILIZADOS DURANTE LOS ANÁLISIS DE 1997	175
4.3.1.1 PREPARACIÓN Y CONTROL DE ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS	175
4.3.1.2 CONTROL DE CALIDAD DE LAS CEPAS HUÉSPED	175
4.3.1.3 VIABILIDAD DE LOS CULTIVOS DE TRABAJO	175
4.3.1.4 ENUMERACIÓN Y CARTAS DE CONTROL DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA UTILIZADOS	175
4.3.2 MUESTRAS ANALIZADAS EN LA CAMPAÑA 1997	176
4.3.3 METODOLOGÍA DE CONCENTRACIÓN	177
4.3.3.1 VALORACIÓN DE LA EFICIENCIA DE LOS MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN	177
4.3.3.2 EL MÉTODO EN ESTUDIO, ¿FUNCIONA PARA LOS TRES GRUPOS DE FAGOS?	180
4.3.3.3 ¿HAY DIFERENCIAS DE RECUPERACIÓN ENTRE LAS MUESTRAS DE MAR Y RÍO?	181
4.3.3.4 LA EFICIENCIA DEL MÉTODO, ¿SE VE AFECTADA POR LA CONCENTRACIÓN DEL FAGO DIANA EN LA MUESTRA INICIAL?	181
4.3.3.5 ¿LA EFICIENCIA DEL MÉTODO ESTÁ INFLUENCIADA POR LA CALIDAD DEL AGUA?	186
4.3.3.6 ¿HAY DIFERENCIAS DE RECUPERACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DE FILTRACIÓN Y FLOCULACIÓN?	188
4.3.4 PRIMERA APROXIMACIÓN A LA ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS	191
4.3.4.1 IMPORTANCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIÓFAGOS	191
4.3.4.2 CORRELACIONES BIVARIADAS	192
4.3.4.3 DIAGRAMAS DE CAJAS	193
4.3.4.4 CURVAS COR	195
4.4 DISCUSIÓN CAMPAÑA 97	197
4.4.1 METODOLOGÍA DE CONCENTRACIÓN	197
4.4.1.1 TRANSFERENCIA DEL MÉTODO A LABORATORIOS EUROPEOS	200
4.4.2 INTRODUCCIÓN A LA ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS	200
4.4.3 VALORACIÓN	202
4.5 OBJETIVOS CAMPAÑA 1998-1999	203
4.6 MATERIALES Y MÉTODOS 98	205

4.7 RESULTADOS 98	208
4.7.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DENTRO DEL RANGO DE <u>E. coli</u> 100-500 cfp/100 ml	208
4.7.2 CONTROL INTERNO DE LOS MEDIOS, REACTIVOS Y BACTERIAS HUÉSPED	208
4.7.3. CONTROL DE CALIDAD INTERLABORATORIOS	209
4.74 CONTROL DEL MÉTODO DE CONCENTRACIÓN. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN PARA LOS COLIFAGOS SOMÁTICOS	213
4.7.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LAS AGUAS DE BAÑO MONITORIZADAS EN EL PERÍODO 98-99	215
4.8 DISCUSIÓN 98-99	228
4.8.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DENTRO DEL RANGO 100-500 <u>E. coli</u> /100 ml	228
4.8.2 MATERIALES DE REFERENCIA Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS	228
4.8.3 ANÁLISIS DE FAGOS DE <u>Bact. fragilis</u> RYC2056	229
4.8.4 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE CONCENTRACIÓN	229
4.8.5 RESULTADOS DE LA MONITORIZACIÓN DE AGUAS MARINAS APTAS PARA EL BAÑO	230
4.8.6 VALORACIÓN DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	231
4.8.7 RESULTADOS OBTENIDOS EN OTROS LABORATORIOS EUROPEOS	232
4.9 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	233

Capítulo V: Persistencia de bacteriófagos en el ambiente acuático.

5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	235
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	237
5.2.1 AGUA RESIDUAL	237
5.2.2 SUPERVIVENCIA DE BACTERIÓFAGOS EN EL AMBIENTE MARINO. EXPERIMENTOS “IN SITU”	237
5.2.3 SEDIMENTOS MARINOS	239
5.2.4 ENTEROVIRUS EN AGUA DE MAR	240
5.2.4.1 CONCENTRACIÓN DE ENTEROVIRUS POR EL MÉTODO DE POLVO DE VIDRIO	241
5.2.4.2 METODOLOGÍA UTILIZADA EN EL ANÁLISIS DE PARÁMETROS BACTERIOLÓGICOS, BACTERIÓFAGOS INDICADORES Y ENTEROVIRUS DE MUESTRAS MARINAS	241
5.3 RESULTADOS	243
5.3.1 AGUA RESIDUAL	243
5.3.2 SUPERVIVENCIA DE FAGOS EN EL AMBIENTE MARINO. EXPERIMENTOS “IN SITU”	248
5.3.3 SEDIMENTOS MARINOS	256
5.3.4 ENTEROVIRUS EN AGUA DE MAR	260
5.3.5 ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS. VALORACIÓN GLOBAL	265
5.4 DISCUSIÓN	273
5.4.1 INTRODUCCIÓN-RESUMEN	273
5.4.2 MICROBIOLOGÍA DEL AGUA RESIDUAL	275
5.4.3 SUPERVIVENCIA DE BACTERIÓFAGOS EN EL MEDIO MARINO	278
5.4.4 BACTERIAS INDICADORAS Y BACTERIÓFAGOS EN SEDIMENTOS MARINOS	283
5.4.5 ENTEROVIRUS EN MUESTRAS MARINAS	286
5.4.5.1 METODOLOGÍA	286
5.4.5.2 NIVELES DE ENTEROVIRUS EN EL AMBIENTE MARINO. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	289
5.5 CONCLUSIONES	293

ABREVIATURAS	295
REFERENCIAS	299
ANEXOS	319
<i>1 DIRECTIVA 76/160 CEE</i>	319
<i>2 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS</i>	327
<i>3 BACTERIOLOGÍA</i>	367
<i>4 CONTROL DE LOS MATERIALES DE TRABAJO</i>	391
<i>5 MEDIOS Y REACTIVOS</i>	403
<i>6 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN</i>	405
<i>7 DETECCIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS</i>	413

Capítulo I: INTRODUCCIÓN GENERAL

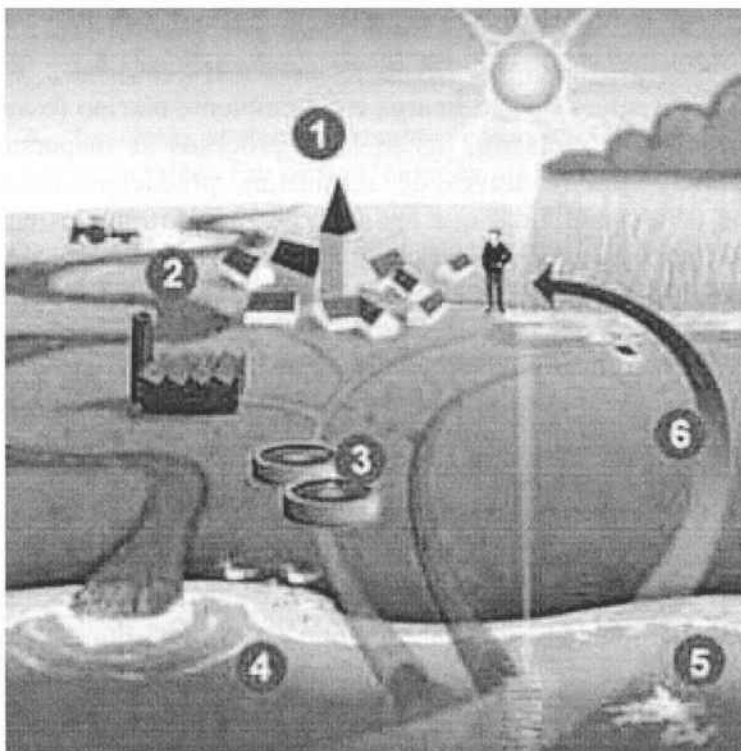
1.1 INDUSTRIA TURÍSTICA Y AGUAS DE BAÑO

En el contexto socioeconómico de la utilización del agua recreativa, la importancia del turismo es considerable en términos de su tamaño, impacto en esferas socioeconómicas y ambientales y la responsabilidad y recursos para intervenir que tiene a su disposición. Cada año, millones de turistas acuden en masa al mar y la costa, y el turismo es la tercera industria más grande del mundo y el principal sector económico en algunos estados y regiones, tales como España. Los ingresos por turismo han aumentado aproximadamente un 11 por ciento / año durante los pasados 10 años (WTO, 1995). Además, el comportamiento y costumbres han cambiado y el turismo es una industria versátil. Esto está creando un incremento de la competición por el uso de las aguas costeras y áreas de playa, haciendo más necesarios regulaciones y códigos de conducta más claros.

Es manifiesto que uno de los parámetros más importantes que ayuda a decidir el destino de los viajeros es el de seguridad. Por ejemplo, el turismo reacciona muy diferente ante los problemas de terrorismo y de seguridad según la percepción que tenga de si le pueden afectar o no (huracanes, inundaciones, terremotos, volcanes, enfermedades infecciosas, atentados, huelgas, etc.) y por ello parece no inmutarse ante los atentados de ETA en España y, en cambio, suspende sus viajes a otras zonas ante un solo incidente.

Así, para el sector turístico, tanto en la Unión Europea como en el resto del mundo, la disposición de agua superficial limpia y “segura” para el baño o recreo es un argumento importante para atraer a los visitantes. Igual de importante es la protección de la salud de la población autóctona en las aguas recreativas.

Figura 1.1. Contaminación microbiológica de las aguas de baño.

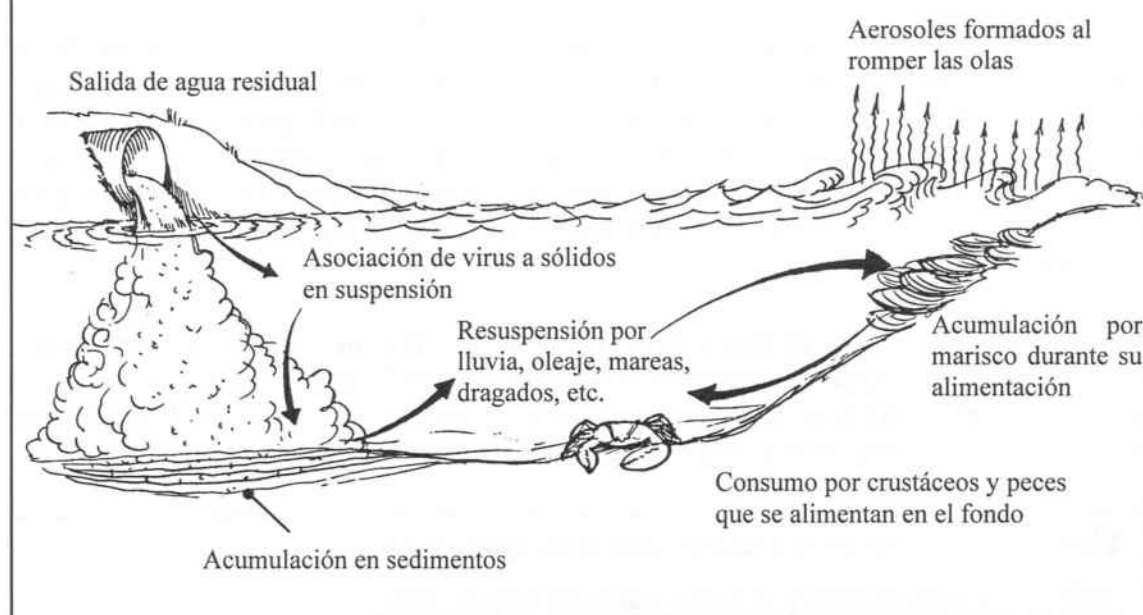


1. Núcleo urbano y actividad industrial.
2. Contaminación microbiológica resultado de la actividad humana.
3. Tratamiento de las aguas de deshecho.
4. Aguas tratadas y/o sin tratar vertidas al mar, río, lagos...
5. Contaminación de los bañistas.
6. Cierre del ciclo.

1.1.1 CICLO DE CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS COSTERAS Y ÁREAS RECREATIVAS FLUVIALES

En el origen de la contaminación encontramos principalmente las descargas de ríos, agua residual y colectores directamente en las áreas de costa, y emisarios que conducen el agua residual una distancia variable de la línea de costa. Estas descargas pueden transportar una carga importante de microorganismos de diversos orígenes incluyendo agua residual urbana (tratada o no, retenida durante un tiempo o no) y de granjas de animales.

Figura 1.2. Destino de los virus en ambientes costeros (adaptado de Melnick y Gerba, 1980)



Generalmente se asume que después de la descarga en el ambiente marino (o agua dulce) de agua residual a través de un emisario, tienen lugar procesos de dispersión, dilución, sedimentación e inactivación (a través de insolación, predación, muerte natural, etc.). Sin embargo, no debemos olvidar que los animales que filtran partículas en suspensión, a partir de la corriente de agua que pasa a través de la cavidad del manto, pueden concentrar microorganismos presentes en el agua en sus tejidos. De esta forma, tanto ostras, mejillones y almejas como cangrejos que estén bajo la influencia de aguas relativamente contaminadas pueden convertirse en transportadores pasivos de patógenos humanos incluidos virus entéricos (sobretudo si tenemos en cuenta que el marisco a menudo se consume crudo o poco cocinado).

Un alto porcentaje de virus está asociado a sólidos en los efluentes de agua residual. Los virus asociados a partículas de gran tamaño ($>6 \mu\text{m}$) pronto dejan la columna de agua y caen en los sedimentos mientras que los virus adsorbidos a sólidos finos incluyendo coloides ($>3 \mu\text{m}$) tienden a quedar flotando en el agua durante más tiempo. Los virus asociados con sólidos en suspensión inicialmente se acumulan en una capa suelta, esponjosa sobre los sedimentos del fondo más compactos. Los sedimentos en las aguas costeras actuarían como reservorios de virus entéricos humanos a partir de

los cuales, los virus pueden ser liberados a la columna de agua por tormentas, barcos, dragas, etc. Los virus de los sedimentos más sueltos pueden ser resuspendidos más fácilmente por turbulencias leves o movimientos de agua. Los virus resuspendidos de aguas contaminadas pueden ser transportados a áreas remotas no contaminadas utilizadas para la producción de marisco y baño, dependiendo de la velocidad de las corrientes, patrón de circulación del agua y vientos predominantes. Estos virus transportados a zonas de baño pueden representar un riesgo para la salud, principalmente cuando se nada (sobre todo si hay inmersión de la cabeza), pero la infección también es posible por pasear por el agua, piragüismo, windsurfing, surfing, rafting, etc.

En general, la calidad microbiológica del agua recreativa puede verse afectada por distintos motivos:

- Son importantes los factores que conducen a un rápido movimiento de la descarga de agua residual hacia las áreas recreativas. Por ejemplo, cuando el agua residual está relativamente caliente y presenta baja salinidad en comparación con el agua que la recibe, puede ser que se mezcle poco y forme una “masa flotante” (estas masas no se formarían en aquellos sitios donde hubiera difusores operativos adecuadamente diseñados en la salida del emisario). Estas “masas flotantes” son rápidamente influenciadas por el viento que sopla del mar hacia el interior y pueden contaminar las playas de forma severa.
- Las corrientes costeras, mar de fondo y mareas también darían lugar a problemas similares y de resuspensión de sedimentos marinos.
- El rompimiento de las olas puede conducir a la aerosolización de microorganismos que pueden ser inhalados por los playistas.
- Tras un episodio de lluvia, las cargas microbiológicas pueden aumentar significativamente debido al agua que corre superficialmente, inundaciones urbanas y resuspensión de los sedimentos.
- Las áreas costeras protegidas como bahías cerradas pueden presentar problemas especiales. En dichos cuerpos de agua a menudo encontramos un volumen pequeño, poca circulación y tasas bajas de intercambio de agua. Cuando dichas aguas son utilizadas intensamente para fines recreativos, la densidad microbiológica en el agua puede estar fuertemente influenciada por las lentas tasas de intercambio, “atrapando” así los efluentes de agua residual durante períodos de tiempo relativamente largos. Los mismos bañistas podrían influir directamente también sobre la calidad del agua. Por otro lado, las bahías cerradas y lagos poco profundos pueden estar sujetos a acumulación de sedimentos asociados con cargas microbiológicas altas y que podrían ser resuspendidos por los usuarios.

Las áreas recreativas fluviales están sujetas a influencias de descargas contaminantes y de lluvia similares a las de las aguas costeras. Además, cuando la corriente del río es manipulada, ya sea para recreo (p.e. retención del agua) o para otros propósitos, el hecho de la retención y liberación en sí mismo conduce a unos niveles microbiológicos más elevados a través de la resuspensión de sedimentos. En algunos países los ríos reciben efluentes de agua residual después de tratamientos secundarios o

biológicos. Los niveles de dilución de los efluentes suelen ser mucho más bajos en ambientes fluviales que en sus equivalentes en la costa y las relaciones entre patógenos y organismos indicadores pueden ser diferentes entre aguas salinas y no salinas.

1.1.2 PELIGROS EN AGUAS RECREATIVAS

La importancia de los peligros para la salud debería ser evaluada frente a los beneficios para la salud humana y el bienestar derivados de la utilización del agua para fines recreativos. Los riesgos para la salud humana existen incluso en ambientes no contaminados, tales como irritación de ojos; algunas infecciones de ojo adicionales ocurren en los bañistas, probablemente como resultado de la reducción en las defensas naturales del ojo por el contacto limitado con el agua y no relacionadas con la calidad del agua o contaminación *per se*.

La existencia de un diverso rango de peligros en las aguas recreativas indica la necesidad de un entendimiento de su importancia relativa para la salud y de los costes y recursos requeridos para su control. Los riesgos incluyen factores asociados con accidentes (incluyendo ahogamiento, casi ahogamiento y lesión espinal); contaminación microbiológica; contacto con medusas; exposición al calor, frío y radiación solar; exposición a productos algales tóxicos; y contaminación química ocasional.

El ahogamiento, casi ahogamiento y lesión espinal derivados de accidentes son consecuencias serias de gran preocupación para la salud pública. Otros accidentes, tales como cortes con vidrio y otros desechos, aunque menos severos, causan angustia y disminuyen los beneficios del bienestar derivado del recreo.

A pesar de lo mencionado anteriormente, en los últimos años la mayor parte de la atención se ha centrado en los riesgos microbiológicos. En particular, los riesgos para la salud asociados con la contaminación del agua por agua residual y excrementos y gastroenteritis asociadas, han sido los tópicos del interés de científicos y público en general. Debería señalarse que los riesgos que preocupan no se limitan a este grupo y potencialmente incluyen infecciones de piel, ojo y oído derivadas de la contaminación del agua por excrementos y bañistas; y otros agentes infecciosos con unas consecuencias más severas para la salud como leptospiras. En cualquier caso, en términos generales, parece que la contaminación de aguas de recreo con heces y agua residual es general y común, afecta gran número de usuarios de las aguas recreativas, la mayoría de los cuales resultan en síntomas de gastroenteritis leves.

Debido a que los riesgos pueden repercutir en la salud después de exposiciones cortas, es importante que estándares, controles e implantación permitan acciones preventivas y remediabiles en marcos de tiempo real. Por esta razón, la OMS (WHO, 1998) en la Guía para ambientes acuáticos recreativos seguros¹, hace hincapié en la identificación de las circunstancias y procesos que probablemente conducen a un ambiente continuamente seguro para el recreo. Esta aproximación enfatiza en el control tanto de las condiciones como las costumbres y en la utilización de valores umbral para los indicadores clave valorados a través de programas de control y evaluación.

¹WHO.EOS/DRAFT/98.14. Guidelines for safe recreational-water environments. World Health Organization. Genova, October 1998.

Tabla 1.1. Ejemplos de distintos tipos de peligro encontrados en aguas de recreo.

Tipo de riesgo	Ejemplos
Ahogamiento	• Ser alcanzado por corrientes. • Ser cercado por crecidas de mareas. • Caer al agua por la borda. • Verse atrapado por obstáculos sumergidos. • Quedarse dormido en hinchables e ir a la deriva hacia aguas profundas lejos de la costa.
Lesión	• Impacto contra superficies duras u objetos punzantes. El impacto puede ser conducido por el participante (zambullida, colisión, pisar sobre vidrio roto y metal dentado), o por la fuerza del viento y agua. • Ataque por animales acuáticos (tiburón, congrios y anguilas, pirañas, focas)
Fisiológico	• Enfriamiento, conduciendo al coma y muerte. • Choque térmico, conduciendo a calambres y paro cardíaco. • Exposición aguda al calor y radiación ultravioleta bajo el sol –agotamiento por calor, quemaduras, insolación. • Exposición al sol acumulativa –cánceres de piel (carcinoma, melanoma).
Infección	• Ingestión o inhalación de, o contacto con bacterias patógenas, virus, hongos y parásitos, que pueden estar presentes en el agua y arena como resultado de contaminación fecal, o transportados por los participantes o animales que utilizan el agua, o microorganismos presentes de forma natural. • Picaduras de mosquitos y otros insectos vectores de enfermedades parasitarias.
Envenenamiento e intoxicación	• Ingestión o inhalación de, o contacto con agua químicamente contaminada, incluyendo masas flotantes. • Picaduras de animales tóxicos y venenosos (medusas, pez tejedor o <i>Trachinus</i> spp., rayas). • Ingestión o inhalación de, o contacto con afloramientos de cianobacterias toxigénicas en agua dulce o de dinoflagelados en agua marina.
Estético	• Rechazo de contaminación visible, turbidez, espumas u olores.

1.1.2.1 Salud pública con relación a la calidad microbiológica del agua recreativa

Las aguas recreativas pueden contener una mezcla de microbios patógenos y no patógenos derivados de: vertidos de agua residual, la propia población que utiliza el agua (defecación y/o secreciones), procesos industriales, granjas, vida salvaje, además de cualquier microorganismo indígena. Esta mezcla puede representar un peligro para el bañista cuando una dosis infecciosa del patógeno coloniza un lugar de crecimiento

adecuado en el cuerpo y conduce a enfermedad. En el caso de enfermedades transmitidas por la ruta fecal-oral este sitio es el canal alimentario, pero podría incluir también otros lugares potenciales de infección tales como los oídos, ojos, cavidad nasal y tracto respiratorio superior.

Así, Cabelli (1983) incluye distintas enfermedades transmitidas por la ruta fecal-oral que pueden adquirirse por nadar en aguas contaminadas con agua residual: (i) enfermedades bacterianas tales como salmonelosis (incluyendo fiebres tifoidea y paratifoidea), shigelosis (disentería bacilar), cólera y gastroenteritis causadas por *E. coli* enteropatógena, *Yersinia enterocolitica*, etc.; (ii) enfermedades víricas tales como hepatitis infecciosas, enfermedades causadas por enterovirus (poliovirus, coxsackievirus A y B, echovirus, reovirus y adenovirus), y gastroenteritis causadas por rotavirus, Norwalk, astrovirus, calicivirus; y (iii) enfermedades causadas por una variedad de parásitos protozoos y metazoos, tales como disentería amebiana, giardiasis, ascariasis, etc.

Dado que la ingestión de agua durante el nado o baño es necesariamente limitada, con la excepción de patógenos con una dosis infectiva relativamente baja, las enfermedades mencionadas anteriormente pueden ser contraídas más fácilmente a través del consumo de pescado o marisco crudo o parcialmente cocinado. Otros patógenos reconocidos como causantes de infecciones humanas a través de esta ruta incluyen *Vibrio parahaemolyticus* y *Clostridium botulinum* (tipo E), para los que el hábitat natural es el mar (WHO, 1974; Saliba y Helmer, 1990). Hay una amplia evidencia de la extensión de enfermedades al hombre relacionadas con el consumo de marisco contaminado. Aunque han sido descritas un amplio rango de enfermedades, las más importantes son las fiebres tifoideas y paratifoideas, salmonelosis, infecciones por *Vibrio parahaemolyticus*, hepatitis vírica tipo A (hepatitis infecciosa), envenenamiento paralítico de marisco y cólera. Aunque la industria del marisco es grande y en continua expansión, el consumo de marisco crudo o ligeramente cocinado o conservado obtenido de áreas contaminadas (principalmente de la costa) o un almacenamiento o tratamiento incorrectos ha resultado en casos de enfermedad a una escala posiblemente mayor de lo que se esperaría considerando la cantidad total de marisco consumido.

Aparte de las enfermedades que afectan al tracto gastrointestinal, una serie de enfermedades y desordenes que afectan al ojo, oído, piel y tracto respiratorio superior han sido asociadas con el baño. Esta categoría particular de condiciones infectivas puede estar causada por microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium welchii* y *Candida albicans*, y pueden causar infección como resultado de ser forzados dentro de cortes o rasguños en la piel, o dentro de roturas en membranas delicadas en el oído o nariz como resultado de traumas asociados con el buceo dentro del agua. Se ha descrito que estos microorganismos están presentes a menudo en el hombre pero que dan lugar a enfermedad solo cuando, por una u otra razón, la resistencia del individuo que los alberga está disminuida (Saliba y Helmer, 1990). Aunque las cuatro especies mencionadas pueden ser encontradas también en agua contaminada, la sugerencia de que un individuo que padece infección la ha adquirido a partir de agua contaminada es una cuestión que hay que tratar con reservas, pues el bañista es muy probable que antes ya sea portador del organismo, y la enfermedad puede ser determinada en gran parte por la susceptibilidad del individuo más que por exposición al organismo en el ambiente.

A modo de resumen, en la Tabla 1.2 se listan agentes responsables de distintas enfermedades adquiridas por ingestión y por contacto con agua recreativa (Borrego y Figueras, 1997).

Tabla 1.2. Microorganismos patógenos asociados con los riesgos del agua para la salud adquiridos por ingestión y por contacto con agua recreativa.

Agente responsable	Enfermedad/síndrome	Fuente
BACTERIAS		
<i>Vibrio cholerae</i> O1	Cólera	Heces humanas
<i>V. cholerae</i> no-O1	Diarrea	Heces humanas
<i>V. vulnificus</i>	Gastroenteritis/infecciones de heridas	Agua marina
<i>V. parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis/infecciones de heridas	Agua marina
<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritis	Heces humanas y animales
<i>S. typhi</i>	Fiebre tifoidea	Heces humanas y orina
<i>Shigella dysenteriae</i>	Disentería bacilar	Heces humanas
<i>Yersinia enterocoliica</i>	Diarrea con sangre	Heces animales y orina
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Diarrea con sangre	Heces humanas y animales
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Disentería	Heces humanas
<i>E. coli</i> enteropatógena	Diarrea	Heces humanas
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Diarrea	Heces humanas
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritis aguda	Heces humanas y animales
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Diarrea/infecciones de heridas	Agua dulce
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Diarrea con sangre	Agua dulce, pescado
<i>Legionella</i> spp.	Enfermedad de los legionarios	Agua dulce, aerosoles
<i>Mycobacterium</i> spp.	Lesiones subcutáneas y de piel	Agua marina y agua dulce
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dermatitis/infecciones de oído y ojos	Heces, agua, humanos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Dermatitis/infecciones de oído y ojos	Humanos
<i>Leptospira icterohaemorrhagica</i>	Leptospirosis	Orina animal
Cianobacterias	Dermatitis/envenenamiento por toxinas	"Bloom" de cianobacterias
VIRUS		
Norwalk y relacionados	Gastroenteritis aguda	Heces humanas
Rotavirus (grupos A y B)	Gastroenteritis aguda	Heces humanas
Virus de la hepatitis A	Hepatitis	Heces humanas
Virus de la hepatitis E	Hepatitis	Heces humanas
Astrovirus	Gastroenteritis aguda	Heces humanas
Calicivirus	Gastroenteritis aguda	Heces humanas
Enterovirus (polio, echo, coxsackie)	Enfermedad respiratoria/encefalitis/parálisis/meningitis/diarrea	Heces humanas, marisco
Adenovirus (serotipos 1,3,4,7,14)	Conjuntivitis/faringitis	Humanos
PROTOZOOS		
<i>Naegleria</i> spp.	Meningoencefalitis	Agua dulce
<i>Balantidium coli</i>	Diarrea con sangre	Heces humanas y animales
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Diarrea/disentería	Heces humanas y animales
<i>Entamoeba histolytica</i>	Disentería	Heces humanas
<i>Giardia lamblia</i>	Giardiasis	Heces humanas y animales
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Conjuntivitis/lesiones de la piel	Agua

Borrego y Figueras, 1997.

Virus patógenos humanos en el agua.

Más de 100 tipos diferentes de virus patógenos humanos pueden encontrarse en aguas contaminadas fecalmente. Su ruta primaria de entrada al cuerpo humano es la boca e inicialmente infectan el tracto gastrointestinal. Estos virus a menudo se resumen bajo el término de "virus entéricos" y pertenecen a distintos grupos. En distintos artículos de revisión, libros de texto y memorias de tesis doctorales se dan detalles de su clasificación, potencial de enfermedad para el hombre y características epidemiológicas (Gerba *et al.*, 1985; Gironés, 1986; Rao y Melnick, 1986; Hurst, 1989; Melnick, 1991; Belshe, 1991; Sobsey y Jaykus, 1991; Díez, 1992; Abad, 1994; Lasobras, 1997). En la Tabla 1.3, adaptada de Havelaar (1993), aparece una relación de virus, enfermedades que producen en el hombre, significado en aguas recreativas y métodos de detección en muestras ambientales.

Tabla 1.3. Virus patógenos humanos en aguas recreativas.

Grupo de virus	Número de serotipos reconocidos	Enfermedades en el hombre ^a	Significado en aguas recreativas ^b	Detección en muestras ambientales ^c	
				CC	MM
Adenovirus	41	1-39 EM, R, O 40-41 GE	++ +	+ ±	± ±
Astrovirus	5	GE	++	(-)	±
Calicivirus	5	GE, H	+++	(-)	±
Coronavirus	1	GE, UR	+	(-)	-
Enterovirus					
poliovirus	3	EM, SNC	+	+	±
Coxsackievirus A	24	EM, R, P	+++	+	±
Coxsackievirus B	6	EM, C, R, SNC	+++	+	±
Echovirus	34	EM, SNC, R, O	+	+	±
Otros enterovirus	4	EM, SNC, R, O	+	+	±
Virus hepatitis A	1	H	+++	(-)	±
Parvovirus	1	GE	+	(-)	±
Reovirus	3	GE?, UR?	?	+	-
Rotavirus	4	GE	++	+	±
Virus redondeados pequeños	?	GE	+++	-	-

Adaptada de Havelaar, 1993.

^aEnfermedades en el hombre= EM: enfermedad menor; R: respiratoria; O: ojo; GE: gastroenteritis; H: hepatitis infecciosa; SNC: sistema nervioso central; P: piel; C: cardíaca; UR: tracto urinario.

^bSignificado en aguas recreativas= +++: brotes documentados en agua recreativa; ++: brotes documentados a través del agua de bebida o marisco; +: potencialmente sobre la base de datos de infectividad y supervivencia; ?: no establecido.

^cDetección en muestras ambientales= +: métodos disponibles en laboratorios especializados de control; ±: métodos solo disponibles en laboratorios de investigación; (-): solo algunas cepas de laboratorio adaptadas pueden ser cultivadas; -: no hay método disponible.

CC= Cultivo celular; MM= Métodos moleculares.

1.1.3 VALORACIÓN DE PELIGRO Y RIESGO

Popularmente, los términos peligro y riesgo ("*hazard and risk*") son utilizados indistintamente, aunque de forma correcta un *peligro* es una serie de circunstancias que pueden conducir a un daño, ya sea lesión, enfermedad o pérdida de la vida. Algunos ejemplos de peligros en aguas recreativas se dan en la Tabla 1.1. El *riesgo* de uno de estos acontecimientos se define (WHO, 1998), como la probabilidad de que ocurra el daño como resultado de la exposición a una cantidad definida de peligro. La *tasa de incidencia* ("*rate of incidence or attack rate*"), es el número esperado de sucesos que ocurrirán para esta cantidad definida de peligro.

Las valoraciones de peligro y riesgo, y no medidas aisladas de riesgo, son preliminares esenciales para el desarrollo de políticas para controlar y gestionar los riesgos para la salud y bienestar en el recreo del agua. Una consecuencia severa para la salud tal como el buceo en agua superficial con resultado de parálisis permanente o muerte puede afectar solo a un número pequeño de bañistas anualmente pero garantiza una alta prioridad de dirección. Irritaciones de piel menores encontradas en el otro extremo de la escala, pueden afectar un elevado número de bañistas por año pero no resulta en una incapacidad y dicho peligro requiere una prioridad de maniobra menor. Los datos de riesgo toman tres formas principales:

- Estadísticas nacionales y regionales de enfermedad y muertes.
- Vigilancia clínica de incidencia de enfermedad y brotes.
- Estudios epidemiológicos y encuestas.

Las estadísticas publicadas rara vez son suficientemente detalladas para la valoración de riesgos. La vigilancia es el proceso de valoración continua y vigilante del estado de salud pública y de seguridad y aceptabilidad. La OMS (WHO, 1976, 1997) ha recomendado procesos de vigilancia para el suministro de agua de bebida, e implica una responsabilidad dual de un regulador gubernamental nacional y del suministrador o proveedor del servicio. Los sistemas para la vigilancia de la salud pública operan en muchos países. Sirven para el amplio propósito de alertar ya sea al regulador o al proveedor de cambios en la incidencia de enfermedad y de la necesidad de iniciar investigación inmediata de las causas y acciones reparadoras. Tal investigación requerirá de la epidemiología, que es el estudio de los acontecimientos y causas de enfermedad en las poblaciones. La epidemiología puede también ser utilizada como una herramienta para investigar las hipótesis de causas de enfermedad.

Ensayo de riesgos o "*Risk assessment*"

A diferencia de las metodologías formalizadas y estandarizadas de valoración de riesgos para productos químicos tóxicos, la valoración cuantitativa de riesgo microbiológico es todavía un área nueva en el análisis de riesgo iniciada en la década de los noventa (Rose *et al.*, 1991; Regli *et al.*, 1993). Ha sido aplicada para estimar los riesgos de infección y enfermedad producidos por patógenos entéricos en el agua (Haas *et al.*, 1993) y marisco (Rose y Sobsey, 1993) y para valorar los riesgos asociados con rotavirus (Gerba *et al.*, 1996) y adenovirus (Crabtree *et al.*, 1997) de origen hídrico. La cuantificación de riesgo microbiológico se lleva a cabo de forma similar a la utilizada para otros agentes ambientales y consiste en:

- Identificación del peligro.
- Valoración dosis-respuesta.
- Valoración de la exposición.
- Caracterización del riesgo.

1.1.3.1 La epidemiología en la valoración de riesgos

En muchos estudios epidemiológicos sobre los efectos para la salud de nadar o bañarse, el objetivo básico ha sido el que originalmente fue definido por Stevenson en 1953: determinar qué diferencia en la incidencia de enfermedad puede ser esperada de nadar en aguas conteniendo distintos grados de contaminación bacteriana.

Existe un volumen considerable de información epidemiológica referente a los efectos de la contaminación fecal de las aguas de baño sobre la incidencia de gastroenteritis y otros desordenes (problemas de piel, infecciones de ojo, oído, nariz, garganta, enfermedades respiratorias) transmisibles a los bañistas y otros participantes en el recreo del agua. Los datos epidemiológicos referentes a otros tipos de peligros son notablemente menores y especialmente por lo que se refiere a ahogamiento y peligros de accidente.

Los informes de brotes han asociado casos de alteraciones diversas de la salud con la exposición a agua recreativa y en algunos casos se han identificado los agentes etiológicos específicos. Pero en general, estos estudios no han descrito suficientemente la calidad del agua o no han proporcionado información de una relación dosis-respuesta. Dicha información es necesaria para estimar los riesgos para la salud de la exposición a agua recreativa y para tomar medidas apropiadas de protección a la salud. Aquí haremos referencia a una revisión de estudios epidemiológicos efectuada por la OMS (WHO, 1998). En dicha revisión se han escogido aquellos estudios que permiten evaluar las siguientes relaciones:

- La relación dosis-respuesta entre alteración de la salud y calidad del agua de baño.
- La existencia de valores umbral de los recuentos de bacterias indicadoras para alteraciones de la salud.
- Una posible variación en la severidad de las alteraciones como función de la calidad microbiológica del agua.

Los estudios epidemiológicos pueden incluir: estudios de casos y controles, estudios de cohortes y pruebas controladas azarosas.

Estudios de casos y controles

En este diseño de estudio retrospectivo, se selecciona gente con la enfermedad de interés (grupo caso) y gente no afectada por la enfermedad (grupo control). Los casos y controles son equiparados respecto a un número pequeño de variables, por ej. edad y

sexo. La exposición al agua de baño se compara entre casos y controles. Los estudios de casos y controles pueden tener algunas limitaciones: sesgo en la selección y sesgo en encontrar controles apropiados; recordatorio diferencial de la exposición al agua de baño entre casos y controles; ausencia de información adecuada de la calidad del agua. Este tipo de estudio presenta dificultades en definir una relación dosis-respuesta precisa entre la enfermedad y la calidad del agua.

Estudios de cohortes

Poblaciones libres de enfermedad (esto es, cohortes) de bañistas y no bañistas se identifican y clasifican dentro de subgrupos de acuerdo con la exposición a la calidad del agua recreativa. En estudios prospectivos, se hace un seguimiento de la cohorte entera para ver como el desarrollo subsiguiente de casos nuevos de enfermedad difiere entre los grupos de exposiciones distintas. El seguimiento es un elemento crucial en la identificación de la alteración de la población estudiada. Esto, no obstante, puede ser difícil para algunas poblaciones tales como turistas. La variación de la composición en los distintos grupos de exposición puede también ser difícil de controlar.

En estudios retrospectivos, la exposición y enfermedad ya han tenido lugar cuando empieza el estudio. Los datos no son recogidos con el paso del tiempo como en los estudios prospectivos. Como en los estudios de casos y controles, la estimación retrospectiva de la exposición a la calidad del agua puede ser imprecisa. El sesgo potencial puede surgir a partir de las divergencias en los grupos de exposición diferente.

Pruebas controladas azarosas

Esta aproximación es esencialmente un experimento, lo que implica una asignación de la exposición al agua. Un diseño azaroso optimizaría la posibilidad de similitud entre los grupos de exposición, en particular respecto a la susceptibilidad a la enfermedad. También la calidad del agua podría ser valorada con más precisión en caso de exposición controlada. Se puede conseguir una asignación más precisa de exposición al agua. Con dicho tipo de estudios pueden estar asociados importantes problemas prácticos (por ej. costes, reclutamiento de un número suficiente de participantes) y problemas éticos (por ej. inclusión de niños, exposición de sujetos a agua de baja calidad).

Diferentes factores que pueden influir sobre la validez de las evaluaciones del impacto de la calidad del agua sobre la salud: control de factores que conducen a confusión, tamaño de la población de estudio, selección de la población, definición de enfermedad e informes, definición de exposición y valoración, análisis adecuado de los datos, análisis de congruencia, valoración del riesgo debido al contacto con agua independientemente de la calidad.

1.1.3.1.1 Revisión de estudios epidemiológicos en aguas de baño

Criterios aplicados en la selección de los estudios epidemiológicos realizada por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1998):

- Las alteraciones de la salud estaban claramente relacionadas con la calidad del agua.
- El estudio estaba suficientemente documentado para determinar las asociaciones de interés; en particular, el diseño del estudio y los datos encontrados tenían que permitir la comparación de las tasas de incidencia de nadadores en diferentes calidades de agua.
- El cálculo de la exposición o alteración no variaba significativamente entre los grupos de exposición o alteración. Un ejemplo de exposición al agua es hacer piragüismo en aguas blancas (rafting) que es similar a nadar en lo que se refiere a la entrada de agua por ingestión o inhalación de gotas.
- La población estudiada era suficientemente grande (cuatro o más enfermos por grupo de exposición).
- La tasa de respuesta era mayor al 50 por ciento y el agua no estaba clorada artificialmente.

En esta revisión se seleccionaron 22 de los 37 estudios identificados (Tabla 1.4). La mayor parte de los estudios fueron conducidos en regiones templadas y no contemplan enfermedades muy severas resultantes de la exposición a agua recreativa. Dos estudios identificados pero no seleccionados (El Sharkami y Hassan, 1979; Public Health Laboratory Service, 1959) investigaron poliomielitis, fiebre tifoidea y paratifoidea con relación a la calidad del agua de baño.

Dieciocho de los 22 estudios fueron estudios prospectivos de cohortes, dos fueron estudios retrospectivos de cohortes (Ferley *et al.*, 1989; Mujeriego *et al.*, 1982) y solo dos (Fleisher *et al.*, 1996; Kay *et al.*, 1994) fueron pruebas controladas azarosas. Todos los estudios valoraron la calidad del agua midiendo microorganismos indicadores, usualmente bacterias de origen fecal. Se utilizaron diferentes indicadores, siendo los más comunes los enterococos, *Escherichia coli* y coliformes fecales. Solo unos pocos estudios midieron también microorganismos patógenos.

En once de los estudios seleccionados, (Tabla 1.4, grupo 1), los datos de la calidad del agua fueron medidos diariamente (o incluso en el mismo momento de la exposición; Fleisher *et al.*, 1996; Kay *et al.*, 1994) y analizados según el día de exposición particular. En muchos de los otros estudios, solo las medias estacionales de la calidad del agua de las playas fueron analizadas para la asociación con enfermedades.

Doce estudios presentaron control para menos de tres factores de riesgo no relacionados con el agua (Tabla 1.4, grupo 2), cuatro estudios para tres o cuatro de dichos factores confundibles potenciales (Tabla 1.4, grupo 3) y seis estudios presentaron control para siete o más de ellos (Tabla 1.4, grupo 4). Los factores confundibles incluían ingesta de alimento y bebida, edad, sexo, historia de ciertas enfermedades, uso de drogas, contacto personal, baños adicionales, sol, factores socioeconómicos, etc.

Resultados del estudio

- La tasa de ciertos síntomas o grupo de síntomas fue relacionada significativamente con el recuento de bacterias indicadoras fecales o patógenos bacterianos. Un incremento en la tasa de enfermedad con el incremento del recuento del indicador, fue registrado por 19 de los 22 estudios seleccionados (Tabla 1.4, grupo 5). En un estudio (Mujeriego *et al.*, 1982) las infecciones de ojo y oído y micosis fueron inversamente relacionadas con el recuento de las bacterias indicadoras. En tres estudios, (van Dijk *et al.*, 1996; Corbett *et al.*, 1993; Ligtfoot, 1989) no se encontraron relaciones significativas con los indicadores fecales.
- Varios estudios registraron un porcentaje de síntomas más elevado en los grupos de edad menor (Tabla 1.4, grupo 6).
- Principalmente los síntomas gastrointestinales (incluyendo síntomas gastrointestinales “objetivos” o “altamente creíbles”) fueron asociados con indicadores bacterianos fecales tales como enterococos, estreptococos fecales, coliformes termotolerantes y *E. coli*.
- El conjunto de riesgos relativos de exposición en agua relativamente limpia fue comparado con los no nadadores para evaluar el riesgo de contacto con agua solamente. Para los síntomas gastroentéricos, estos riesgos relativos se encontraban entre 1.0 y 2.5 (Tabla 1.4, grupo 7), con solo un valor significativamente diferente de 1.0 (Cabelli *et al.*, 1982).
- El conjunto de riesgos relativos al nado en agua relativamente contaminada frente al nado en agua limpia varía entre 0.4 y 3.
- Muchos estudios sugirieron modelos de riesgo continuo con umbrales para varios organismos indicadores y desordenes de la salud. La mayoría de los valores umbrales sugeridos son bajos en comparación con las calidades del agua que se encuentran a menudo en las aguas costeras de uso recreativo (Tabla 1.4, grupo 8). Éstos van desde solo unos pocos recuentos del indicador en 100 ml hasta unos 30 recuentos en 100 ml, y fueron más elevados para Egipto y Hong Kong (entre 100 y 200 recuentos de indicador en 100 ml; Cabelli, 1983; Cheung *et al.*, 1990). Estos dos estudios también describieron tasas de casos más bajas para recuentos bacterianos similares.
- Los organismos indicadores que se correlacionan mejor con problemas de salud fueron los enterococos / estreptococos fecales tanto para agua marina y agua dulce, y *E. coli* para agua dulce. Otros indicadores que muestran correlación son los coliformes fecales y los estafilococos. Los últimos pueden estar correlacionados con la densidad de bañistas y se encontró que estaban significativamente asociados con ciertos síntomas, esto es aquellos que afectan al oído y piel y enfermedades respiratorias y entéricas (Cheung *et al.*, 1991; UNEP/WHO, 1988; Seyfried *et al.*, 1985). La variación en la densidad de estafilococos no podría ser explicada por fuentes de contaminación diferentes a los propios bañistas (El Sharkawi y Hassan, 1979) aunque serían necesarias más investigaciones para confirmar esta hipótesis. Un estudio encontró correlaciones significativas entre síntomas gastrointestinales y bacterias patógenas específicas (Kueh *et al.*, 1995). Los estudios controlados azarosos han registrado una

relación más fuerte entre exposición y síntomas gastroentéricos que la relación encontrada en otros estudios (Fleisher, 1997).

Tabla 1.4. Lista de estudios seleccionados en la revisión realizada por la OMS (1998).

Grupo*	Referencia	Año	País	Diseño del estudio	Agua	Comentarios
1,4,5	Fleisher <i>et al.</i> , 1996	1996	UK	prueba controlada azarosa	marina	d
1,4,5	Haile <i>et al.</i> , 1996	1996	US	cohorte prospectiva	marina	
4	Van Dijk <i>et al.</i> , 1996	1996	UK	cohorte prospectiva	marina	c
1,3,5	Bandaranayake <i>et al.</i> , 1995	1995	Nueva Zelanda	cohorte prospectiva	marina	d
1,2,5	Kueh <i>et al.</i> , 1995	1995	Hong Kong	cohorte prospectiva	marina	b
4,5	CSIR 1995	1995	Sudáfrica	cohorte prospectiva	marina	a,c
1,4,5,7,8	Kay <i>et al.</i> , 1994	1994	UK	prueba controlada azarosa	marina	d
2,5,6,7	Pike, 1994	1994	UK	cohorte prospectiva/cs	marina	a,b,c
3	Corbett <i>et al.</i> , 1993	1993	Australia	cohorte prospectiva	marina	a,d
1,3,5,7	Fewtrell <i>et al.</i> , 1992	1992	UK	cohorte prospectiva	dulce	d
1,2,5,6	UNEP/WHO n° 46, 1991	1991	Israel	cohorte prospectiva	marina	b,d
2,5	UNEP/WHO n° 53, 1991	1991	España	cohorte prospectiva	marina	a,b,d
2,5	Cheung <i>et al.</i> , 1990	1989	Hong Kong	cohorte prospectiva	marina	a,b
2,5,7,8	Ferley <i>et al.</i> , 1989	1989	Francia	cohorte retrospectiva	dulce	a,b,c
1,4	Lightfoot, 1989	1989	Canadá	cohorte prospectiva	dulce	
1,2,5,6	UNEP/WHO n° 20, Fattal <i>et al.</i> , 1987	1987	Israel	cohorte prospectiva	marina	b,d
1,3,5,8	Seyfried <i>et al.</i> , 1985	1985	Canadá	cohorte prospectiva	dulce	
2,5,7,8	Dufour, 1984	1984	US	cohorte prospectiva	dulce	a,b
2,5,6	Cabelli, 1983	1983	Egipto	cohorte prospectiva	marina	a,b,c
2,5,7,8	Cabelli <i>et al.</i> , 1982	1982	US	cohorte prospectiva	dulce y marina	a,b
2,5,8	Mujeriego <i>et al.</i> , 1982	1982	España	cohorte retrospectiva/cs	marina	a,b
1,2,5	Stevenson, 1953	1953	US	cohorte prospectiva	dulce	b,c,d

*para el grupo ver el texto;

cs: estudio transversal;

a: solo utilizaron la media estacional para el análisis de la asociación con enfermedad;

b: controlaron menos de tres parámetros confundibles;

c: exposición no definida como inmersión de la cabeza / salpicadura a la cabeza / ingestión de agua;

d: menos de 1700 bañistas y 1700 no bañistas participaron en el estudio.

Nota: Dos estudios analizaron la misma serie de datos (van Dijk *et al.*, 1996, Pike, 1994).

En la Tabla 1.5 se listan algunos sesgos estadísticos que podemos encontrar en los estudios epidemiológicos.

Tabla 1.5. Diferentes sesgos estadísticos en estudios epidemiológicos del agua recreativa.

Tipo de sesgo	Descripción
Utilización de microorganismos indicadores para valorar la calidad del agua de la exposición.	La variación temporal y espacial del indicador es sustancial, y difícil de relacionar con bañistas individuales, a menos que el diseño del estudio sea experimental (Fleisher <i>et al.</i> , 1996; Kay <i>et al.</i> , 1994). También, la limitada precisión de los métodos para contar organismos indicadores añadiría errores de medida sustanciales. Además, los organismos indicadores utilizados no se relacionan bien con los virus, los cuales pueden representar una parte importante de los agentes etiológicos.
Utilización de medias estacionales para valorar la calidad del agua	Distintos estudios utilizan medias estacionales de los organismos indicadores en vez de medidas diarias para la caracterización de exposiciones individuales, lo que añade una imprecisión sustancial.
Valoración de la ruta de exposición	Ciertos estudios no tienen en cuenta la vía potencial de infección para definir la exposición, por ej. principalmente inmersión de la cabeza o ingestión de agua para los síntomas gastroentéricos. Las dificultades en recordar la exposición incrementan todavía más la inexactitud de la exposición individual.
Parámetros confusos sin controlar	El descontrol de parámetros que inducen a confusión, tales como ingesta de alimento y bebida, edad, sexo, historia de ciertas enfermedades, uso de drogas, contacto personal, baños adicionales, sol, factores socioeconómicos etc., pueden influir sobre la asociación observada.
Selección de población estudiada no representativa	Los resultados obtenidos para ciertas poblaciones estudiadas (por ej. grupos de edad limitados o de regiones con ciertos endemismos) no son <i>a priori</i> directamente transferibles a poblaciones con otras características.
Autoinforme de los síntomas	Muchos estudios de observación se basan en el autoinforme de los síntomas por la población estudiada. La validación de los síntomas por examen médico reduciría el sesgo potencial. Factores externos, tales como medios de comunicación o publicidad pueden haber influido en el autoinforme.
Porcentaje de respuesta	La tasa de respuesta fue más del 70 % en todos, y más del 80 % en muchos estudios. Informes diferenciales, por ej. respuesta más alta entre los participantes que experimentan síntomas, probablemente no tendrían consecuencias importantes.
Método de reclutamiento	El método de reclutamiento consistía en la aproximación a personas en la playa en casi todos los estudios de observación y operaba por anuncio en los estudios controlados al azar.
Efecto del entrevistador	Diferencias en la metodología de la obtención de datos entre los entrevistadores puede influir en los resultados del estudio.

1.1.3.2 Virus entéricos y valoración de riesgos

La US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) recomienda que el tratamiento del agua de bebida debe asegurar que la población no esté sujeta a un riesgo de infección superior a 1:10000 (10^{-4}) en un año de exposición y éste es un nivel aceptable para aguas potables. Para el caso de las aguas recreativas, numerosos estudios epidemiológicos han mostrado que el baño en aguas contaminadas resulta en un riesgo mayor de gastroenteritis. Se ha sugerido que un riesgo de 6×10^{-3} a 8×10^{-3} de enfermedad gastrointestinal para el baño es aceptable (Cabelli *et al.*, 1983). El corto periodo de incubación y la alta frecuencia de enfermedad en niños ha conducido a la sugerencia de una etiología vírica (Cabelli *et al.*, 1983).

Los rotavirus son la causa más común de gastroenteritis en todo el mundo y son responsables de la forma más severa de gastroenteritis víricas en humanos (Gerba *et al.*, 1996). En la Tabla 1.6 se presentan algunos de los resultados de la valoración de riesgo para rotavirus de origen hídrico de una revisión conducida por Gerba *et al.* (1996). En dicho estudio se aplica un modelo dosis-respuesta β -Poisson, y se calculan las probabilidades de infección considerando las concentraciones más baja y más alta de rotavirus encontradas en aguas superficiales. Los riesgos se basan en una exposición diaria de 100 ml por ingestión al nadar en aguas continentales.

Tabla 1.6. Riesgos de infección por rotavirus para la población general asociados con la natación en aguas continentales contaminadas*.

	Concentración media más baja (0.24 por litro)			Concentración media más alta (29 por litro)		
	1 día	5 días	10 días	1 día	5 días	10 días
Riesgo de infección	1.43×10^{-2}	6.95×10^{-2}	1.34×10^{-1}	4.16×10^{-1}	9.32×10^{-1}	9.95×10^{-1}
Riesgo de enfermedad (x 0.5)	7.17×10^{-3}	3.47×10^{-2}	6.71×10^{-2}	2.08×10^{-1}	4.66×10^{-1}	4.98×10^{-1}
Riesgo de muerte (x 0.0001)	7.17×10^{-7}	3.47×10^{-6}	6.71×10^{-6}	2.08×10^{-5}	4.66×10^{-5}	4.98×10^{-5}

*Exposición de 100 ml/día
Gerba *et al.*, 1996

Observamos que el riesgo de enfermedad ya es superior a 6×10^{-3} después de 5 días de exposición a agua poco contaminada con rotavirus y que en agua con 29 rotavirus por litro el riesgo de contraer enfermedad ya es de 2.08×10^{-1} el primer día de exposición.

Posiblemente los riesgos están sobrestimados al considerar una exposición de 100 ml diarios, pero por otro lado también estarían subestimados dado que los métodos utilizados para la concentración y detección de rotavirus en el agua no son 100 % eficientes y también se dispone de pocos datos de las concentraciones de estos virus en distintos tipos de agua.

En la Tabla 1.7 se presentan los resultados de un estudio equivalente al anterior realizado por los mismos autores para la valoración de riesgo de adenovirus de origen hídrico. El modelo dosis-respuesta aplicado es una exponencial (Crabtree *et al.*, 1997). Al menos tres brotes de origen hídrico documentados implicaron la natación en aguas

recreativas contaminadas (dos piscinas y un estanque), siendo la tasa de incidencia para dos de estos brotes >50 % con los síntomas de fiebre faringoconjuntiva y para el tercer brote una incidencia del 32 % con conjuntivitis (Crabtree *et al.*, 1997).

Tabla 1.7. Riesgos asociados con la natación en aguas continentales contaminadas con adenovirus*.

	Concentración de 0.118 MPN/100 ml		Concentración de 12.8 MPN/100 ml	
	1 día	10 días	1 día	10 días
Riesgo de infección	1.48×10^{-5}	1.48×10^{-4}	1.60×10^{-3}	1.59×10^{-2}
Riesgo de enfermedad (x 0.5)	7.38×10^{-6}	7.38×10^{-5}	8.00×10^{-4}	7.98×10^{-3}
Riesgo de muerte (x 0.0001)	7.38×10^{-10}	7.38×10^{-9}	8.00×10^{-8}	8.00×10^{-7}

*Exposición de 30 ml/día por ingestión o inhalación.
Crabtree *et al.*, 1997

1.2 CONCEPTO DE ORGANISMOS MODELO EN LA HIGIENE DEL AGUA

Muchos patógenos de origen hídrico son difíciles de detectar y/o cuantificar en el agua, y la metodología específica óptima para detectarlos en las muestras ambientales todavía está por desarrollar. Los procesos de detección específicos disponibles actualmente son complejos e implican procesos de concentración y posterior enriquecimiento selectivo o amplificación por métodos moleculares. Además, la eficiencia de recuperación de estos procesos es baja y estas técnicas normalmente están limitadas a laboratorios especializados de investigación. Dada la dificultad de buscar patógenos en muestras ambientales, la calidad microbiológica de las aguas ha sido medida clásicamente por el análisis de microorganismos indicadores.

Ya en 1963, Bonde establece los requerimientos que han de cumplir los organismos indicadores (Borrego y Figueras, 1997):

- ✓ Los indicadores deberían estar presentes en las heces, agua residual y aguas contaminadas con agua residual siempre que el patógeno esté presente, y ausente en aguas sin contaminación fecal.
- ✓ Los niveles de indicadores deberían tener alguna relación directa con la densidad de patógenos en los ambientes acuáticos, y ser proporcional al grado de contaminación.
- ✓ La tasa de supervivencia de los indicadores en el agua tiene que ser al menos similar a la de los patógenos. Además, la resistencia de los indicadores a los factores de depuración y desinfección debería ser al menos similar a la de los patógenos.
- ✓ Los indicadores han de ser detectados a través de una metodología de laboratorio simple, barata, precisa y rápida.
- ✓ Los indicadores no deberían ser patógenos y deben ser aplicables a todo tipo de muestras de agua que requieran programas de control.
- ✓ Sus características han de ser constantes.
- ✓ Los indicadores no deben crecer ni multiplicarse en el agua.

Mossel (1982) define el término “organismo modelo” con referencia a dos funciones diferentes, índice e indicador. Los “organismos índice” están relacionados, directa o indirectamente, con el peligro para la salud o bien con la presencia del patógeno y deben cumplir los criterios que se dan en la Tabla 1.8. Por otro lado, los “organismos indicadores” están relacionados sólo con los efectos de los procesos de tratamiento o control de la calidad del agua. Los requerimientos de un organismo indicador son menos restrictivos que aquellos para un organismo índice: su resistencia al ambiente tiene que ser similar a la de los patógenos (pero no es necesario que tengan una ecología similar) y requieren metodologías de laboratorio más simples que la de los patógenos.

La utilización de organismos “índice” o “indicadores” para valorar la calidad microbiológica y sanitaria de las aguas está bien establecida y ha sido practicada desde

hace un siglo. Los grupos más ampliamente utilizados son los coliformes totales, los coliformes fecales y los estreptococos fecales.

Tabla 1.8. Criterios para microorganismos “índice” e “indicador”

Criterio	Índice	Indicador
Ecología similar	SÍ	NO
Presencia en heces humanas		
Ausencia en heces animales		
Detección en aguas contaminadas con heces humanas		
Ausencia en aguas contaminadas con heces animales		
Ausencia de multiplicación en el ambiente acuático		
Características constantes		
Resistencia y persistencia similar	SÍ	SÍ
A los tratamientos de agua residual		
A los procesos de desinfección		
Supervivencia en aguas dulces y marinas		
Resistencia a la luz solar		
Relación con virus entéricos humanos		
Relación con riesgos para la salud humana		
Metodología simple	SÍ	SÍ
No se requieren instalaciones especializadas		
Económico		
Rápido		
No patógeno		
Se requiere el análisis de grandes volúmenes de agua		

1.2.1 ESTABLECIMIENTO DE ESTÁNDARES MICROBIOLÓGICOS

Como parte de un estudio conducido por la EPA para la valoración de los estándares de calidad del agua ambiental, Cabelli (Cabelli *et al.*, 1979) llevó a cabo una investigación epidemiológica de la calidad del agua y los efectos para la salud en playas marinas. Las muestras de agua fueron analizadas para coliformes, enterococos, *Pseudomonas*, y clostridios como posibles indicadores. Se demostró una correlación entre los niveles bacterianos de enterococos en el agua y enfermedades gastrointestinales en nadadores que utilizaban el agua. Las recomendaciones de la EPA en 1986 (*Environmental Protection Agency*, 1986) sugieren que 35 enterococos/100 ml están relacionados con un riesgo de 19 enfermedades/1000 nadadores-días. Pocos estados y muy pocos países fuera de los Estados Unidos han elegido el uso de los enterococos como herramienta para el control y examen de las aguas recreativas.

En Europa también se recomienda cada vez más el uso de estudios epidemiológicos para evaluar los estándares de las aguas de baño (Mujeriego, 1989; Godfree *et al.*, 1990; Rees, 1993). Esta aproximación se basa fundamentalmente en la utilización de organismos modelo con función índice. Los estudios epidemiológicos

usualmente no han identificado los agentes causantes de las enfermedades reportadas y por consiguiente, la ecología y resistencia de los organismos modelo propuestos no puede ser evaluada frente a los patógenos relevantes. Por otro lado, las relaciones numéricas entre las densidades de los organismos modelo y los efectos para la salud en los nadadores varía considerablemente entre estudios y se debe principalmente a dos razones. Primera, la relación entre el número de patógenos y número de organismos modelo es variable tanto en el tiempo como en el lugar. La concentración de organismos modelo en las heces o agua residual es relativamente constante, pero la concentración de patógenos varía dependiendo de la circulación de la enfermedad entre la comunidad a partir de la que se origina el material contaminado. Segunda, la susceptibilidad de los bañistas a los agentes patógenos depende de una gran variedad de factores. Se supone que la susceptibilidad de los bañistas que no son de la zona es mayor que la de la población indígena. Esto es importante si los datos obtenidos de los estudios epidemiológicos sobre la población local son utilizados para establecer los estándares de calidad para las instalaciones turísticas.

El marco conceptual (Figura 1.3) para la valoración de los estándares de calidad del agua recreativa debería basarse, como en el caso de la gestión de la calidad de los alimentos, en los puntos de control críticos en análisis de riesgo (HACCP: *Hazard Analysis Critical Control Points*).

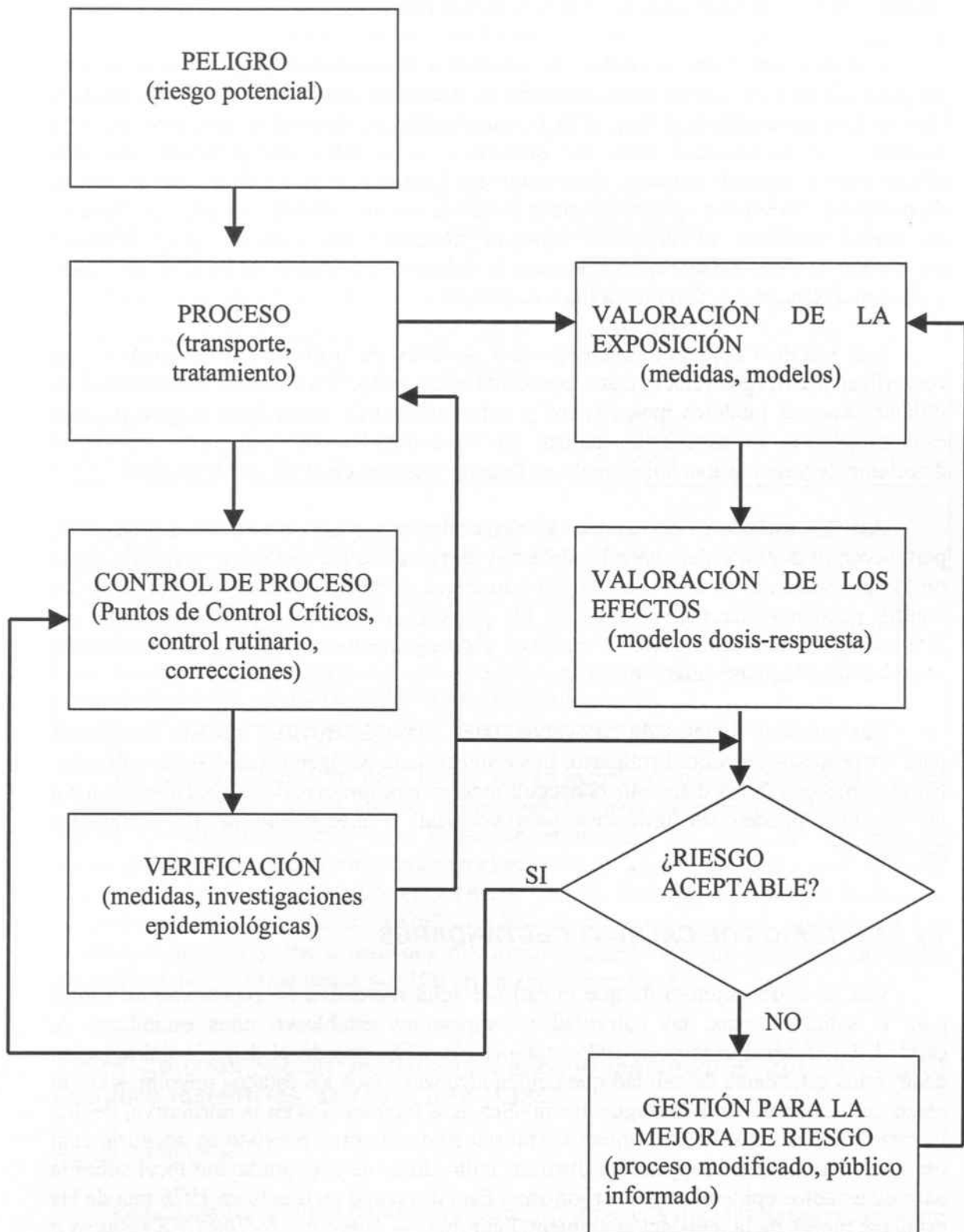
El proceso combinado de valoración de riesgo/HACCP empieza con la identificación de todos los peligros relacionados con la contaminación microbiológica de las aguas recreativas. La información puede ser obtenida de diversas fuentes:

- Estudios de la frecuencia de patógenos (potenciales) en el agua.
- Estudios de laboratorio y con animales, de los factores de virulencia de estos organismos.
- Estudios con humanos voluntarios.
- Brotes reportados.

Todos los peligros identificados son estudiados en relación con las estrategias de prevención existentes (estrategias de salud pública general o de tratamiento y eliminación) que son utilizadas para reducir la contaminación de las aguas recreativas. Los datos sobre la exposición de los bañistas son determinados directamente (por mediciones) o indirectamente (por deducción a partir de medidas de organismos modelo o por modelos matemáticos) y los posibles riesgos para la salud son cuantificados utilizando datos de dosis-respuesta a partir de brotes o estudios con voluntarios.

Si el riesgo es considerado inaceptable, se formulan nuevas o adaptadas estrategias de gestión de riesgo, que resultaran en una exposición reducida. Si no se dispone de una estrategia aceptable para la reducción de exposición, el público debería ser informado y los esfuerzos deberían ser dirigidos a cambiar los hábitos que conducen a la exposición; una prohibición de utilizar una playa es una medida de estas características.

Figura 1.3. Marco conceptual para el establecimiento de los estándares microbiológicos utilizando un proceso de riesgo combinado y Análisis de Peligro de Puntos Críticos de Control (Havelaar, 1993).



Si han sido definidas las estrategias preventivas, la aplicación real puede empezar. Para este propósito, se lleva a cabo un examen minucioso de los puntos críticos de control, esto es, aquellos pasos en la estrategia de gestión de riesgo total que son de influencia directa en el resultado final. Para estos puntos críticos de control, se formulan criterios. Es necesario un control frecuente para asegurar que el proceso está bajo control y donde sea necesario, se ejercen acciones correctivas.

Debido a que el proceso entero de valoración de riesgo invariablemente se basa en un gran número de suposiciones, también es necesario verificar el resultado final en términos de medir directamente si se ha conseguido el efecto deseado, esto es, si la incidencia de enfermedad entre los bañistas o la presencia de patógenos ha sido efectivamente reducida hasta un nivel aceptable. Ésta es la fase donde el control directo de patógenos y estudios epidemiológicos tienen su mayor utilidad. No deberían hacerse de forma rutinaria ni tampoco deberían utilizarse directamente para acciones correctivas. Pueden señalar que el proceso de valoración de riesgo no ha sido apropiado y pueden desencadenar una nueva línea de acción.

Los estudios epidemiológicos pueden también ser utilizados directamente para cuantificar los riesgos relacionados con cierta exposición, y así aliviar la necesidad de utilizar extensos modelos matemáticos y extrapolación de datos dosis-respuesta. Para este propósito, es necesario analizar la concentración de patógenos relevantes directamente y no basarse únicamente en determinaciones de organismos modelo.

Así, los estándares de calidad del agua tales como los criterios bacteriológicos, pertenecen al dominio del control y deberían derivarse de los puntos de control críticos de los procesos relevantes. Los valores numéricos establecidos para estos criterios de control pueden variar dependiendo de los procesos utilizados y pueden también ser diferentes para diferentes áreas geográficas. Esto representa una dificultad considerable para definir estándares internacionales.

Las medidas directas de patógenos, tales como enterovirus, no son apropiadas para los procesos de control rutinario. Los criterios para patógenos pueden ser utilizados para establecer valores diana que conseguir mediante programas de control apropiados y las medidas pueden ser utilizadas para verificar la efectividad de las estrategias preventivas.

1.2.2 CRITERIOS DE CALIDAD Y ESTÁNDARES

Con el claro objetivo de que el uso del agua recreativa no represente un riesgo para la salud humana, las autoridades competentes establecen unos estándares de calidad. La Unión Europea en 1975 (entonces la CEE) acordó el decenio del agua, es decir, unos estándares de calidad que debían alcanzar todos los estados miembros en un plazo de diez años. Para conseguir los niveles guía establecidos en la normativa, debían llevarse a cabo obras de saneamiento. Transcurrido el tiempo previsto se decidiría cual iba a ser el valor concreto para los distintos indicadores de contaminación fecal sobre la base de estudios epidemiológicos rigurosos. Esto dio como resultado en 1976 una de las primeras piezas de la legislación ambiental europea: la *Directiva 76/160/CEE relativa a la calidad de las aguas de baño*. España incorporó esta directiva en el Real Decreto 734/1988.

En las puertas del siglo XXI, los estándares vigentes continúan siendo los mismos que se formularon hace más de veinte años, pero durante este tiempo se han puesto en evidencia importantes contradicciones. Actualmente, la directiva europea para aguas de baño está en revisión (Havelaar, 1993; EEC, 1994; Figueras *et al.*, 1997) y está previsto que aparezca una nueva propuesta.

En la Tabla 1.9 aparece un resumen de los criterios microbiológicos contemplados en la Directiva 76/160/CEE.

Tabla 1.9. Requerimientos de la calidad microbiológica para el agua de baño de acuerdo con la Directiva 76/160/CEE.

Parámetros	Valores guía G	Valores imperativos I	Frecuencia mínima de muestreo
Coliformes totales / 100 ml	500 (80%) ^a	10000 (95%)	(1)
Coliformes fecales / 100 ml	100 (80%)	2000(95%)	(1)
Estreptococos fecales / 100 ml	100 (90%)	-	(2)
Salmonella / 1 litro	-	0 (95%)	(2)
Enterovirus PFU / 10 litros	-	0 (95%)	(2)

^aPorcentaje de muestras que han de cumplir con el valor estándar.

I: Los Estados Miembros fijaran valores para todas las áreas de baño que no podrán ser menos restrictivos que este valor.

G: Los Estados Miembros procuraran observar estos valores como guías.

(1): Quincenalmente durante la temporada de baño, se reducirá en un factor de 2 si los resultados de años anteriores fueron apreciablemente mejores.

(2): La medida solo se requerirá cuando una inspección en el área de baño muestre que el parámetro pueda estar presente, o cuando la calidad del agua se haya deteriorado.

En Estados Unidos, la EPA define los estándares como una concentración del indicador por encima de la cual el riesgo para la salud de enfermedades de origen hídrico es inaceptablemente alta. Antes de la revisión de 1986 de los criterios nacionales, hubieron recomendaciones en el informe de "*the National Technical Advisory Committee*" a la Secretaria del Interior (*Water Quality Criteria*, 1967) y por la EPA en "*Quality Criteria for Water*, 1976". Ambos documentos estaban basados en los coliformes fecales y las densidades máximas recomendadas no excedían la media geométrica de 200 organismos por 100 ml en aguas recreativas.

1.2.2.1 Criterios bacteriológicos para el baño (contacto de cuerpo entero) en aguas recreativas, según la EPA (1986):

Aguas continentales

Basada en un número de muestras estadísticamente suficiente (generalmente no menos de 5 muestras espaciadas de forma equivalente sobre un periodo de 30 días), la media geométrica de las densidades bacterianas indicadas no deberá exceder una u otra de las siguientes:

<i>E. coli</i>	126 / 100 ml
Enterococos	33 / 100 ml.

Sólo se utilizará un indicador. La agencia reguladora seleccionará el indicador apropiado según sus condiciones.

Ninguna muestra deberá exceder un lado de los límites de confianza (L.C.) calculados utilizando las siguientes orientaciones:

Playas designadas para el baño	75 % L.C.
Uso moderado para el baño	82 % L.C.
Uso ocasional para el baño	90 % L.C.
Uso infrecuente para el baño	95 % L.C.

Basado en una desviación log estándar de sitio específico, o si los datos del sitio son insuficientes para establecer una desviación log estándar, entonces utilizar 0.4 como la desviación log estándar para ambos indicadores.

Agua marina

Basada en un número de muestras estadísticamente suficiente (generalmente no menos de 5 muestras espaciadas de forma equivalente sobre un periodo de 30 días), la media geométrica de las densidades de enterococos no deberán exceder 35 por 100 ml.

Ninguna muestra deberá exceder uno de los lados de los límites de confianza utilizando las siguientes pautas:

Playas designadas para el baño	75 % L.C.
Uso moderado para el baño	82 % L.C.
Uso ocasional para el baño	90 % L.C.
Uso infrecuente para el baño	95 % L.C.

Basado en una desviación log estándar de sitio específico, o si los datos del sitio son insuficientes para establecer una desviación log estándar, entonces utilizar 0.7 como la desviación log estándar.

Otros estándares aplicados en Norte América se muestran en la Tabla 1.10.

Tabla 1.10. Estándares de la calidad del agua recreativa en distintos países/áreas de América del Norte.

Agencia	Régimen de muestreo	Coliformes totales	Coliformes fecales	Otros	Referencia
1. United States National Technical Advisory Committee	No menos de 5 muestras tomadas en un periodo de 30 días	-	≤ 200 / 100 ml, ni excederán más de un 10 % de las muestras los 400 /100 ml	-	National Technical Advisory Committee, 1968
2. Province of British Columbia	No menos de 5 muestras tomadas en un periodo de 30 días	-	Media geométrica ≤ 200 / 100 ml ni excederán más de un 10 % de las muestras los 400 /100 ml	-	Province of British Columbia, 1968
3. Inland Waters Directorate, Department of the Environment	-	≤ 500 / 100 ml	≤ 200 / 100 ml	-	Environment Canada, 1972
4. Alberta Environment	No menos de 5 muestras tomadas en un periodo de 30 días	Media geométrica ≤ 1000 / 100 ml	Media geométrica ≤ 200 / 100 ml	-	Alberta Environment, 1977
5. Ontario Ministries of Health, Environment	Al menos 10 / 30 días	Media geométrica ≤ 1000 / 100 ml	Media geométrica ≤ 100 / 100 ml	Estreptococos fecales, Pseudomonas, Staphylococcus	Ontario Ministry of Health, 1975; Ontario Ministry of the Environment, 1978
6. Committee of the Great Lakes, Upper Mississippi River Board of State Sanitary Engineers	-	-	Media geométrica ≤ 200 / 100 ml sin que ninguna muestra exceda 1000 / 100 ml	Estreptococos fecales, Pseudomonas,	Committee of the Great Lakes, Upper Mississippi River Board of State Sanitary Engineers, 1975
7. United States Environmental Protection Agency	No menos de 5 muestras tomadas en un periodo de 30 días	-	Media geométrica ≤ 200 / 100 ml, ni excederán más de un 10 % de las muestras los 400 /100 ml	-	United States Environmental Protection Agency, 1976
8. Saskatchewan Environment	No menos de 5 muestras tomadas en un periodo de 30 días	Media geométrica ≤ 1000 / 100 ml	Media geométrica ≤ 200 / 100 ml	-	Saskatchewan Environment, 1977
9. Manitoba Clean Environment Commission	No menos de 5 muestras por mes	Mediana ≤ 500 MPN / 100 ml	Mediana ≤ 200 MPN / 100 ml	-	Province of Manitoba, 1979

Tabla 1.11. Valores Guía para la calidad microbiológica de las aguas recreacionales marinas (estreptococos fecales / 100 ml)

Valor percentil 95 de estreptococos fecales/100ml	Criterios	Tasa estimada de enfermedad
10	Este valor está por debajo del nivel de efecto adverso no-observado (NOAEL ¹) en la mayor parte de estudios epidemiológicos que han intentado definir un NOAEL	Utilizando el indicador nivel/carga de relación con enfermedad, se corresponde con el valor 95 percentil que está <u>asociado con menos de una única incidencia de síntomas entéricos para una familia de cuatro bañistas adultos sanos</u> teniendo 80 exposiciones por temporada de baño (valor redondeado), por un periodo de 5 años, sumando un total de 400 exposiciones.
50	Este valor está por encima del umbral y nivel de efecto adverso más bajo observado (LOAEL ²) para gastroenteritis en la mayor parte de estudios epidemiológicos que han intentado definir un LOAEL.	Utilizando el indicador nivel/carga de relación con enfermedad, se corresponde con el valor 95 percentil que está asociado con <u>una única incidencia de síntomas entéricos para una familia de cuatro bañistas adultos sanos</u> teniendo <u>80 exposiciones</u> por temporada de baño (valor redondeado).
200	Este valor está por encima del umbral y nivel de efecto adverso más bajo observado para todos los síntomas adversos para la salud en la mayor parte de estudios epidemiológicos.	Utilizando el indicador nivel/carga de relación con enfermedad, se corresponde con el valor 95 percentil que está asociado con <u>una única incidencia de síntomas entéricos para un bañista adulto sano</u> teniendo <u>20 exposiciones</u> por temporada de baño (valor redondeado).
1000	Derivado de evidencia limitada en relación con la transmisión de fiebre tifoidea en áreas de bajo nivel endémico de tifus y o paratífus. Estos son utilizados en este contexto como indicadores de efectos severos para la salud.	Sobrepasar este nivel debería ser considerado un <u>riesgo público para la salud</u> conduciendo a investigación inmediata por las autoridades competentes. Tal interpretación debería ser generalmente respaldada por evidencia de contaminación fecal humana (por ej. un vertido de agua residual).

WHO, 1998

(1)NOAEL = no-observed adverse effect level, (2)LOAEL = lowest-observed-adverse-effect level

1. Esta tabla proporcionaría protección a "bañistas adultos sanos" expuestos a aguas marinas frías como las aguas del norte de Europa.
2. No se refiere a niños, personas mayores o inmunosuprimidas quienes tendrían una menor inmunidad y requerirían un mayor grado de protección. No hay datos disponibles con los que se pueda cuantificar esto y por ello tampoco se dispone de factores de corrección que puedan ser aplicados.
3. Los datos epidemiológicos en agua dulce o exposiciones distintas al baño (por ej. actividades de alta exposición tales como surfing o rafting) son actualmente inadecuados para presentar un análisis paralelo de riesgos de referencia definidos. Por tanto se propone un único valor guía, para todos los usos recreativos del agua porque no existe evidencia suficiente por el momento para hacer otra cosa. En cualquier caso, se recomienda que la severidad y frecuencia de exposición para grupos de especial interés (tales como body, board y windsurfistas, buceadores subacuáticos, piragüistas y marineros de vela) se tenga en cuenta.
4. Cuando se desinfecta para reducir la densidad de los indicadores bacterianos en efluentes y descargas la presumible relación entre estreptococos fecales (como indicadores de contaminación fecal) y la presencia de patógenos puede estar alterada. Esta alteración es, por el momento, vagamente entendida. En el agua que recibe dichos efluentes y descargas, los recuentos de estreptococos fecales pueden no proporcionar una estimación precisa del riesgo de sufrir síntomas de gastroenteritis leve.
5. En el cálculo de estos valores se asume que la probabilidad en cada exposición es aditiva.

La valoración de la calidad del agua, hasta la fecha, se ha basado fundamentalmente en la enumeración microbiológica. Esto tiene una serie de limitaciones asociadas:

- Tales datos se consideran caros de obtener en muchos países.
- Estos datos son de valor cuestionable dada la variabilidad local espacial y temporal de la calidad del agua recreativa (por ej. diferencias en el grado de contaminación fecal en pocos metros en una única playa o entre pocas horas de diferencia en el mismo punto de muestreo), básicamente porque hay problemas fundamentales en los protocolos de muestreo.
- Estudios recientes han indicado que la comparación de los datos de control generados incluso por laboratorios que funcionan bien puede ser extremadamente pobre (esto es, hay problemas de reproducibilidad analítica y de comparación entre laboratorios).
- Los datos así obtenidos pueden no ser adecuados para los propósitos de comparación entre playas para lo que normalmente se utilizan (esto es, hay problemas fundamentales en la interpretación y presentación de los resultados).

Debido al tiempo que se requiere antes de que los resultados de los análisis microbiológicos estén disponibles y la frecuencia del análisis se lleve a cabo, los planteamientos y gestiones que se basan primariamente en la calidad microbiológica del agua son siempre retrospectivos por naturaleza.

1.2.2.2 Valores guía propuestos por la OMS

Las recomendaciones de la OMS (WHO, 1998) están basadas en consideraciones epidemiológicas. La información que contribuye a definir los valores guía deriva de:

- “Valores umbral” y “niveles de efecto adverso” publicados en estudios epidemiológicos individuales para gastroenteritis y otros desequilibrios de la salud humana.
- Tasas de incidencia de enfermedad derivadas de asumidas curvas de distribución de enfermedad típicas y funciones de densidad de probabilidad para los organismos indicadores.

Sólo se dispone de una tentativa y base científica suficientemente sólida para proponer una relación entre un problema de salud, los síntomas gastrointestinales, y la calidad del agua recreativa a través de los estreptococos/enterococos. Los valores guía solo están definidos para aguas costeras y están expresados en términos de estreptococos fecales/100 ml. La mayoría de estudios han identificado los estreptococos fecales y enterococos como los organismos indicadores que se correlacionan más estrechamente con los problemas de salud en aguas costeras. Para las aguas continentales, se han obtenido mejores correlaciones con coliformes fecales/*Escherichia coli* pero no se dispone de suficiente información para proponer valores guía por el momento (WHO, 1998). Parece ser que, bajo muchas circunstancias, el mismo nivel de bacterias indicadoras fecales en ambientes continentales puede corresponder a un mayor riesgo para la salud que en un ambiente marino.

Los riesgos estimados han sido calculados para aguas marinas templadas en países con bajas tasas de endemismo de enfermedades más severas potencialmente asociadas con el recreo. La Tabla 1.11 resume los valores guía. En la traducción de estos valores guía a valores específicos en estándares nacionales o locales y legislación deberían tenerse en cuenta las variaciones en factores sociales, económicos, ambientales y técnicos.

1.2.2.3 Limitaciones y contradicciones de la Directiva 76/160/CEE. Propuesta de nueva Directiva

La Directiva para aguas de baño, (y la Directiva para tratamiento de residuos urbanos 91/271/CEE), son herramientas importantes en el proceso de mejora de la protección y calidad de las aguas de baño. Sin embargo, distintos detalles de la Directiva han sido sujetos a críticas severas, y han sido difíciles de implantar.

Parámetros microbiológicos

La Directiva para aguas de baño de la Unión Europea considera que los coliformes totales y coliformes fecales son los principales parámetros microbiológicos que han de ser evaluados (Tabla 1.9). El término coliformes totales (CT) incluye aquellos microorganismos que pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Los coliformes totales serían indicadores pobres porque incluyen especies que no son estrictamente fecales y porque también son un parámetro redundante cuando se evalúan los coliformes fecales (UNEP/WHO 1983). Es por eso que en la propuesta de Directiva de 1994 son eliminados (EEC, 1994). Los coliformes fecales (CF) son un parámetro más ampliamente aceptado; incluyen *Klebsiella* termotolerante además de *Escherichia coli* (Cabelli, 1983) y se consideran indicadores de contaminación fecal reciente. *E. coli* se encuentra de forma consistente y exclusivamente en heces de animales de sangre caliente. Muchos autores se refieren a los coliformes fecales y a *E. coli* como si fueran sinónimos incluso cuando se refieren a la Directiva de la UE. Es cierto que *E. coli* es la especie predominante del grupo de CF, pero no es la única que cumple las características indicadas en el *Standard Methods* para este indicador (Figueras *et al.*, 1997). Éste es un punto importante que necesita ser aclarado en la Directiva para que los resultados de los controles microbiológicos reportados por los diferentes estados miembros de la UE puedan ser comparados. En la propuesta de Directiva de 1994, los CF han sido sustituidos por *E. coli* (Tabla 1.12).

La Directiva incluye otros parámetros microbiológicos tales como estreptococos fecales, *Salmonella* y enterovirus. Observamos contradicciones en la frecuencia recomendada de su análisis pues la medida de estos parámetros sólo se requiere “cuando una inspección en el área de baño muestre que el parámetro puede estar presente o que la calidad del agua se ha deteriorado” (EEC, 1975). Los estreptococos fecales (EF) son considerados por muchos autores como buenos indicadores porque son más resistentes que los coliformes al estrés ambiental y por tanto sobreviven por más tiempo y pueden ser más efectivos como indicadores de contaminación por agua residual (Sinton *et al.*, 1993). Un problema relacionado con la enumeración de este grupo de microorganismos es su heterogeneidad taxonómica y ecológica. A pesar de la opinión de que los EF raramente se encuentran en ambientes no contaminados, distintos estudios parecen demostrar que se pueden encontrar en otros hábitats o en plantas e insectos (APHA,

1995) y que incluso algunas cepas de origen no fecal podrían sobrevivir durante más tiempo que las de origen fecal en el ambiente. La taxonomía de este grupo ha estado sujeta a extensas revisiones recientemente (Leclerc *et al.*, 1996; Manero y Blanch, 1999). En opinión de Borrego y Figueras (1997) los estreptococos incluirían las siguientes especies de *Enterococcus* y *Streptococcus*, sobre la base de su inclusión taxonómica y el origen exclusivamente fecal de las especies: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. cecorum*, *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *S. alactolyticus*, *S. intestinalis*, *S. hyointestinalis* y *S. acidominimus*. Distintos estudios epidemiológicos han demostrado efectos adversos para la salud correlacionados con la presencia de muy bajas concentraciones de EF en el agua, esto es de 20 a 35 cfu/100 ml (Cabelli, 1983; Mariño *et al.*, 1995).

Por lo que respecta a los otros parámetros microbiológicos, las muestras de agua generalmente no se examinan de forma rutinaria para *Salmonella* y enterovirus. En la práctica es extremadamente difícil que un litro o diez litros de agua estén libres de *Salmonella* y enterovirus, respectivamente (Rees, 1993). La Directiva requiere cero enterovirus, aunque permite un cierto nivel de bacterias entéricas, por lo que sería casi imposible cumplir con este estándar para virus. En el caso de *Salmonella*, Figueras *et al.* (1997) las detectan en un 1 a 5 % de las muestras que están bajo los límites guía para coliformes fecales y también pueden ser aisladas en ausencia de indicadores. Así estos microorganismos pueden estar presentes cuando no hay razón para pensar que lo están. Ésta es otra contradicción en la Directiva. Otro aspecto contradictorio es que ni *Salmonella* ni enterovirus son imperativos para agua de bebida. Presencia o ausencia probablemente tampoco es una buena aproximación para *Salmonella*; sería mejor hacer cuantificación y serotipado (Figueras *et al.*, 1997). ¿Qué significaría la presencia de serotipos de *Salmonella* que nunca se han encontrado en aislamientos clínicos?. En el próximo apartado se comentan con más detalle algunos problemas con el estándar para virus.

Metodología microbiológica y estándares

La Directiva requiere una homogeneización y actualización de las metodologías, pues algunas de las recomendadas como el NMP (número más probable) con 3 ó 5 tubos se ha comprobado que no son fiables y en cambio siguen siendo utilizadas por muchos países. Francia ha decidido en 1995 utilizar un método común para todos los laboratorios que participan en el programa de control, que se basa en el NMP con 96 pocillos (método de microplacas) para la detección de *E. coli* y enterococos. La UE, a través del BCR (*Bureau Communautaire de Référence*), ha patrocinado y organizado ejercicios para la intercalibración de métodos microbiológicos (CF, EF) en el marco del programa "the Standards, Measurement and Testing EU Programme" (Hernández *et al.*, 1995; Figueras *et al.*, 1997). En el informe final quedó claramente demostrado que es inútil comparar resultados de diferentes países si los procesos de detección y enumeración no están claramente estandarizados. Incluso las diferencias observadas entre los métodos individuales son tales que ciertas aguas de baño pueden ser valoradas como en cumplimiento con los valores guía de la Directiva con un método, y como no conforme con el nivel guía con otro método.

De acuerdo con el artículo 5 de la Directiva, un área de baño es juzgada según cumpla simultáneamente con los estándares imperativos y guías para todos los parámetros. Una revisión de los estándares también parece necesaria. En la propuesta de

Directiva de 1994 (Tabla 1.12) aparece un nuevo estándar para EF, aunque no está claro qué criterios científicos se han utilizado para elegir este valor imperativo.

Como podemos observar al comparar las recomendaciones de la USEPA con la normativa europea, los valores guía de la ley 76/160/CEE son más restrictivos para coliformes totales y fecales y en cambio los valores imperativos para estos parámetros son los menos severos. *Salmonella* y enterovirus no aparecen en ninguna normativa internacional como obligado análisis en el control rutinario de la calidad microbiológica de las aguas de baño (Figueras *et al.*, 1997).

Tabla 1.12. Propuesta de Directiva en 1994 para aguas de baño (EEC, 1994).

Parámetros	Valores guía G	Valores imperativos I	Frecuencia mínima de muestreo
<i>Escherichia coli</i> / 100 ml	100 (80%) ^a	2000(95%)	Quincenal
Estreptococos fecales / 100 ml ^b	100 (80%)	400 ^b (95%)	Quincenal
Enterovirus PFU / 10 litros	-	0	Mensual
Bacteriófagos pfp / 100 ml	-	-	-

^aPorcentaje de muestras que han de cumplir con el valor estándar.

^bEn caso de valores pico anormales, en dos días de trabajo, este parámetro puede volverse a analizar.

1.2.2.4 Problemas con el estándar para enterovirus en la Directiva 76/160/CEE

En la Directiva para la calidad de las aguas de baño se incluye un valor imperativo para enterovirus de 0 PFP por 10 l de muestra, debiéndose cumplir en el 95% de las muestras analizadas durante la temporada de baño. Este estándar ha sido discutido en muchas reuniones nacionales e internacionales y también ha sido expresado por escrito por numerosos autores del Reino Unido (Morris, 1991). Las objeciones a esta Directiva se resumen a continuación (Havelaar, 1993):

- Los enterovirus en aguas de baño son relativamente menos preocupantes en el ámbito sanitario que otros grupos de virus entéricos. Desdichadamente no se dispone de métodos de detección adecuados para la mayoría de estos virus. Los métodos actuales para el control de los virus en aguas de baño sólo son capaces de detectar una pequeña proporción de todos los virus que pueden estar presente en aguas de baño contaminadas. Por tanto, la Directiva no define adecuadamente los virus diana.
- El control rutinario de enterovirus en aguas de baño es laborioso y requiere especialización de los laboratorios; es por ello que se han examinado pocas muestras por playa, en los casos que el control se ha llevado a cabo.
- Los métodos y muestreos requeridos han sido descritos en términos generales, permitiendo gran variabilidad y conduciendo a dudas sobre la comparación de

los resultados de diferentes laboratorios; diferencias en la metodología o incluso en la interpretación de los resultados analíticos pueden cambiar un “aprobado” a un “suspendido” o viceversa.

- La unidad de medida especificada es de PFP/ 10 litros, lo que requiere un ensayo cuantitativo, pero en muchas ocasiones el criterio es básicamente cualitativo.
- No es lógico establecer estándares directamente para microorganismos patógenos, y un estándar “cero” no es apropiado porque no permite sucesos inevitables de niveles bajos de patógenos en el ambiente por fuentes incontrolables.
- El criterio de conformidad no está basado en principios estadísticos.
- La anotación a pie de página sobre los requerimientos de control rutinario es ambigua y ha sido interpretada de diferentes formas; algunos autores concluirán que se requiere el control de los virus si la playa no cumplía el año anterior con los parámetros bacteriológicos, mientras que otros recomiendan concentrar los esfuerzos en playas que, aún cumpliendo con los estándares de bacteriología, se espera la presencia de virus (por ej. si ha habido descargas de efluentes desinfectados químicamente).
- La elección de 10 litros como volumen en el que no se han de detectar enterovirus no está basada en una evidencia científica, pero probablemente fue escogido porque es un volumen grande que aún es fácil de analizar con equipo poco sofisticado.

Los problemas en la interpretación e implementación del estándar para enterovirus de la Directiva han dado lugar a que se hayan hecho pocos análisis en toda la Unión Europea.

Los estados miembros informan a la Comisión sobre los resultados de la monitorización de las aguas de baño al final de la temporada de baño y sólo el Reino Unido aporta periódicamente datos del control de enterovirus en aguas de recreo marinas desde 1989. Alemania también evalúa enterovirus en algunas zonas de baño continentales. En los informes posteriores a 1989, Italia y España han reportado algunos resultados de enterovirus (Havelaar, 1993; Figueras *et al.*, 1997). En cualquier caso, se llevan a cabo programas irregulares de monitorización de enterovirus en el ámbito de los gobiernos regionales o locales, o como parte de programas de investigación, pero estos datos no son aparentemente informados a la Comisión.

La cantidad limitada de datos disponibles muestra que se detectan bajas concentraciones de enterovirus en aguas de baño del territorio europeo, incluyendo playas que conforman los criterios bacteriológicos. El significado de estos niveles de enterovirus en términos de riesgos para la salud pública es difícil de interpretar, y los datos no son apropiados para emprender acciones reguladoras.

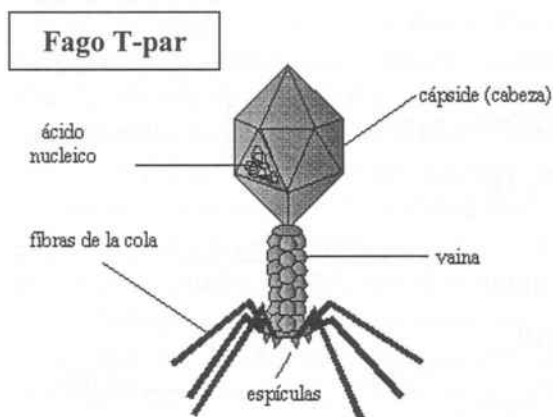
Como consecuencia de los problemas mencionados más arriba, la Comisión está buscando alternativas para el estándar de enterovirus en la Directiva de aguas de baño, sin perder de vista el objetivo de proteger la salud de los bañistas frente a las infecciones virales.

Los bacteriófagos aparecen como candidatos a sustituir el estándar actual para enterovirus en aguas de baño (Havelaar, 1993). Numerosos estudios proponen a los bacteriófagos fecales como organismos modelo para los virus entéricos (Simkova y Cervenka 1981; Stetler 1984; IAWPRC, 1991; Havelaar *et al.*, 1993; Lucena *et al.* 1994). Una segunda función de los bacteriófagos frecuentemente descrita en la literatura es la de índice de contaminación fecal (Wentzel *et al.*, 1982; IAWPRC, 1991). Los bacteriófagos son relativamente fáciles de detectar en ambientes acuáticos y muestran tasas de supervivencia (frente a barreras naturales y artificiales) y comportamientos más parecidos a los virus entéricos que las bacterias coliformes. Los potenciales indicadores incluyen a los colifagos somáticos, bacteriófagos F-específicos de RNA y fagos de *Bacteroides fragilis* y deben ser juzgados basándose en información detallada sobre su ecología en diferentes ambientes.

En el siguiente apartado presentamos información general sobre los bacteriófagos considerados como posibles indicadores de la calidad del agua.

1.3 LOS BACTERIÓFAGOS EN LOS ESTUDIOS DE CALIDAD DEL AGUA

1.3.1 CONSIDERACIONES GENERALES.



Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. Habitualmente constan de una molécula de ácido nucleico (genoma) rodeado por una cubierta proteica (cápside). Su clasificación formal está basada principalmente en la morfología de la cápside vista al microscopio electrónico y en la naturaleza del ácido nucleico. El Comité Internacional de Taxonomía Virica (Franki *et al.*, 1991) agrupa los bacteriófagos en nueve familias

(*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Tectiviridae*, *Corticoviridae*, *Microviridae*, *Leviviridae*, *Inoviridae* y *Cystoviridae*) pero algunas de éstas son relativamente poco importantes porque sólo contienen una o pocas cepas de fagos poco frecuentes. En la Tabla 1.13 aparecen las seis familias principales, previamente descritas como grupos morfológicos A-F. En dicha tabla también aparecen las morfologías características de los distintos grupos, especies tipo y otras, tipo de ácido nucleico, localización del receptor en la célula huésped y dimensiones de la cápside de la especie tipo (IAWPRC, 1991).

La infección de una bacteria huésped por un fago determinado tiene lugar generalmente en varias etapas:

1. Adsorción de las partículas fágicas a las células huésped.
2. Penetración del ácido nucleico fágico.
3. Síntesis de macromoléculas fágicas y subunidades proteicas.
4. Ensamblaje de las partículas fágicas.
5. Lisis de las células huésped y liberación de los fagos.

Como receptores para la adsorción de bacteriófagos al hospedador se han descrito: el flagelo (fago PBS1 de *Bacillus subtilis*), las fimbrias F (fagos M13, R17, fd y MS2 de *E. coli*), el lipopolisacárido (fagos T4 y T7 de *E. coli*), proteínas externas de la membrana para transporte de hierro (fago T1 de *E. coli*), para transporte de nucleósidos (fago T6 de *E. coli*), para transporte de maltosa (fago λ de *E. coli*) y para ácido teicoico (fago ϕ 29 de *B. subtilis*).

La opción del ciclo lisogénico, implica la integración del genoma vírico en el cromosoma de la bacteria huésped. Cuando se produce inducción, el material genético del fago provoca la síntesis de los constituyentes virales y se completa el ciclo lítico.

Una revisión más exhaustiva de la estructura y biología de los bacteriófagos puede encontrarse por ej. en Goyal *et al.* (1987) o Jofre (1991).

Tabla 1.13. Principales familias de bacteriófagos.

Familia		Características. Especie tipo y otras	Ácido nucleico ^a	Localización del receptor	Dimensiones cápside ^b
A. <i>Myoviridae</i>		Cola contráctil. Cápside icosaédrica o alargada. Colifago T2 , T4, T6	DNAds	Pared celular	95x 65 nm
B. <i>Siphoviridae</i>		Cola no contráctil, larga y flexible. Colifago λ , T1, T5	DNAds	Pared celular	54 nm
C. <i>Podoviridae</i>		Cola no contráctil y corta. Colifago T7 , T3	DNAds	Pared celular	47 nm
D. <i>Microviridae</i>		Cápside isométrica. Sin cola. Colifago ϕ X174 , S13	DNAss	Pared celular	30 nm
E. <i>Leviviridae</i>		Cápside isométrica. Sin cola. Colifago MS2 , f2	RNAss	Pili sexuales	30 nm
F. <i>Inoviridae</i>		Bastones helicoidales largos o cortos. Colifago fd , II	DNAss	Pili sexuales	810 x 6 nm

^ads: cadena doble; ss: cadena simple
^bDimensiones de la cápside de la especie tipo

1.3.2 FUNCIÓN INDICADORA DE LOS BACTERIÓFAGOS.

La utilización de los bacteriófagos como indicadores de la presencia y comportamiento de bacterias entéricas y virus animales siempre ha sido atractiva debido a la facilidad de detección y bajo coste asociado con el análisis de fagos. Además, pueden ser cuantificados en muestras ambientales en 24 h o menos comparado con los días o semanas necesarios para los virus entéricos. Históricamente los colifagos han sido los más comúnmente utilizados para este fin (Borrego *et al.*, 1990) y el estudio de su ecología ha sido justificado con la idea de aumentar el conocimiento del destino de los virus entéricos patógenos humanos.

El potencial de las aguas contaminadas fecalmente de transmitir enfermedades está bien establecido. Si se utilizan métodos suficientemente sensibles, pueden

detectarse de forma regular una gran variedad de organismos patógenos en el agua residual, aunque los número y tipos varían mucho según el estado puntual de salud de la comunidad contribuyente. La detección directa y enumeración de las bacterias patogénicas y virus requiere técnicas especializadas e instalaciones apropiadas. Además dichas técnicas son costosas y requieren tiempo. Para superar estas dificultades, pronto los bacteriologistas del agua desarrollaron el concepto de indicadores bacterianos de contaminación fecal. Así el grupo coliforme fue adaptado en 1914 por el *United States Public Health Service* como un indicador de contaminación fecal del agua de bebida. Las tasas de brotes de enfermedad bacteriana de origen hídrico en los Estados Unidos hoy son bajas debido primariamente a la implementación correcta del estándar de coliformes para evaluar la calidad sanitaria del agua. Sin embargo, cada vez es más evidente que los coliformes no indican correctamente la presencia de virus patógenos y protozoos. Guelin (1948) fue el primero en abogar por la utilización de bacteriófagos como indicadores de bacterias entéricas y virus. De igual forma, los colifagos ya fueron sugeridos en 1974 como indicadores potenciales de polución vírica humana en el ambiente por Kott *et al.* (Gerba *et al.*, 1987). Desde esta propuesta, ha habido muchos debates sobre la conveniencia de establecer a los bacteriófagos como organismos modelo de virus entéricos humanos en el medio ambiente.

Un modelo ideal de virus en aguas debería de cumplir las siguientes condiciones:

- ✓ Estar presente exclusivamente y de manera consistente en las heces humanas.
- ✓ No encontrarse en heces animales.
- ✓ No multiplicarse en el ambiente acuático natural.
- ✓ Superar en aguas contaminadas fecalmente el número de virus humanos en varios órdenes de magnitud.
- ✓ Comportarse como los virus humanos en el medio natural y en los procesos de tratamiento.
- ✓ Ser fácilmente detectados por métodos simples, rápidos y baratos.

En la década de los noventa tres grupos de bacteriófagos están siendo considerados como posibles modelos víricos en la higiene del agua: los colifagos somáticos (Kott *et al.*, 1974; IAWPRC, 1991), los bacteriófagos F-específicos de RNA (Havelaar y Hogeboom, 1984, IAWPRC, 1991) y los fagos de la bacteria anaeróbica *Bacteroides fragilis* (Jofre *et al.*, 1986; IAWPRC, 1991).

1.3.3 BACTERIÓFAGOS ENTÉRICOS: COLIFAGOS SOMÁTICOS, FAGOS F-ESPECÍFICOS DE RNA Y FAGOS QUE INFECTAN A BACT. FRAGILIS

La definición, métodos de detección, presencia y distribución en el ambiente de cada uno de los tres grupos de bacteriófagos propuestos como organismos modelo de virus en aguas, sedimentos y marisco, son ampliamente revisados en los trabajos de Gerba (1987), IAWPRC (1991), Jofre (1991), Havelaar (1993), Lasobras (1997), Puig-A (1998) y Puig-M (1998).

Tabla 1.14. Características de los grupos de bacteriófagos considerados apropiados como modelos víricos en contaminación ambiental.

Descripción	Cepa huésped	Comentarios
Colifagos somáticos Unión a receptores somáticos situados en la pared celular del huésped	<i>E. coli</i> C (Obtención de titulaciones diferentes si se utilizan otras cepas)	• Grupo heterogéneo. Morfología variada (familias A, B, C y D, Tabla 1.13) • Presencia frecuente en heces humanas y animales (10^2-10^8/g) y aguas residuales (10^3-10^4/ml). • Podrían multiplicar en el medio natural. • Buena resistencia en el medio ambiente. • Heterogeneidad en la inactivación durante los procesos de tratamiento de aguas.
Bacteriófagos F-RNA Unión a los <i>pili</i> sexuales codificados en el plásmido F	<i>S. typhimurium</i> WG49, <i>E. coli</i> HS (pFamp)R	• Grupo homogéneo (<i>Leviviridae</i>); morfología y constitución similares a las de los enterovirus. • No frecuentes en heces animales o humanas (inferiores a 10^3/g). • Presencia frecuente en aguas residuales (10^3-10^4/ml) • Sólo pueden multiplicarse a temperaturas superiores a 30 °C. • Resistencia relativamente alta a la radiación UV. • Los diferentes serotipos se pueden relacionar con el origen de la contaminación fecal (animal o humana).
Bacteriófagos de <i>Bact. fragilis</i> (BfHSP40 y BfRYC2056) Unión a receptores somáticos.	<i>Bact. fragilis</i> HSP40 <i>Bact. fragilis</i> RYC2056	• Grupo homogéneo (<i>Siphoviridae</i>) • Números relativamente bajos en aguas residuales (BfHSP40 < 10^2/ml; BfRYC2056 10^1-10^3/ml). • No se multiplican en el medio ambiente. • Resistencia relativamente alta tanto en procesos de tratamiento de aguas como en procesos de inactivación natural. • Alta especificidad, BfHSP40 sólo se encuentran en heces humanas y no en heces animales; BfRYC2056 se detectan mayoritariamente en heces humanas.

Tabla 1.15. Frecuencia de detección y concentraciones medias de bacteriófagos en diferentes tipos de muestras ambientales.

Tipo de muestra	COLIFAGOS SOMÁTICOS			FAGOS F-ESPECÍFICOS			FAGOS de <i>Bact. fragilis</i> HSP40			Referencia
	Frecuencia de detección (%)	Medias geométricas	Frecuencia de detección (%)	Medias geométricas	Frecuencia de detección (%)	Medias geométricas	Frecuencia de detección (%)	Medias geométricas		
• Aguas residuales domésticas sin tratar	100	5.1x10 ⁵ pfp/100 ml	100	8.1x10 ⁴ pfp/100 ml	100	2.7x10 ³ pfp/100 ml	Lasobras, 1997			
• Aguas residuales de matadero sin tratar	100	1.1x10 ⁷ pfp/100 ml	100	8.8x10 ⁵ pfp/100 ml	20	2.0x10 ¹ pfp/ml	Puig-A., 1998			
• Efluente secundario (salida planta fisico-química)	100	4.5x10 ⁵ pfp/100 ml	100	2.7x10 ⁴ pfp/100 ml	100	2.5x10 ³ pfp/100 ml	Lasobras, 1997			
• Lodos de planta depuradora (fisico-química)	100	2.9x10 ⁶ pfp/100 g	100	6.5x10 ⁵ pfp/100 g	100	5.2x10 ⁴ pfp/100 g	Lasobras <i>et al.</i> , 1999			
• Río (Llobregat)	100	7.9x10 ³ pfp/100 ml	100	590 pfp/100 ml	83.3	23 pfp/100ml	Araujo <i>et al.</i> , 1997			
• Sedimentos fluviales (Llobregat)	100	7.25x10 ⁶ /100 g	100	1.68x10 ⁵ /100 g	100	3.0x10 ³ /100 g	Lasobras, 1997			
• Mar (playa Santa Ana, Málaga)	100	15.8 pfp/100 ml	-	<10 pfp/100 ml	-	<10 pfp/100 ml	Córnax <i>et al.</i> , 1991			
• Sedimentos marinos (Barcelona)	78	510 pfp/100 g	-	-	90	120 pfp/100 ml	Lucena <i>et al.</i> , 1996			

Tabla 1.16. Comparación de bacteriófagos y bacterias fecales como potenciales candidatos a organismos modelo de virus humanos en aguas de baño.

Criterio	Organismos modelo en evaluación				
	Colifagos somáticos	Fagos F-específicos	Fagos de <i>Bact. fragilis</i>	Coliformes fecales	Enterococos fecales
Ecología					
Presencia en heces humanas.	++	+	+	++	++
Ausencia en heces animales.	-	+	++ ⁽¹⁾	-	-
Presencia en aguas contaminadas por heces humanas.	++	++	+	++	++
Ausencia en aguas contaminadas por heces animales.	-	-	++ ⁽¹⁾	-	-
No multiplica en el medio externo.	-	++	++	-	+
Características constantes.	-	++	+	-	+
Resistencia					
Tratamiento de agua residual.	+	+	+	+	+
Desinfección:	-	+	+	-	+
cloro libre	-	++	+	-	+
cloro combinado	+	+	+	-	-
ozono	-	++	+	-	+
radiación UV.	-	++	+	-	+
Coagulación/filtración	++	++	++	-	-
Transporte en aguas subterráneas.	+	++	+	-	-
Supervivencia en:					
aguas continentales	+	+	+	-	+
agua de mar.	+	-	+	-	-
Luz solar.	+	+	+	-	+
Relación numérica con virus.	+	++	+	-	-
Relación con efectos para la salud	0	0	0	-	+
Metodología					
No equipo especial.	++	+	+	++	++
Barato.	++	+(+)	+	++	++
Rápido.	++	++	++	+	+
No patógeno.	++	+(+)	++	++	++
No necesita grandes volúmenes.	++	++	+	++	++
Estandarización (internacional)	++ ⁽²⁾	++	++ ⁽²⁾	++	++

Adaptado de Havelaar, 1993.

++ El criterio se cumple correctamente; + el criterio se cumple parcialmente; - el criterio no se cumple; 0 información insuficiente; ⁽¹⁾ se cumple para los fagos de *Bact. fragilis* HSP40; ⁽²⁾ En 1999 los protocolos ISO están preparados pero no han llegado a la fase final.

En esta introducción hemos intentado dar una visión global de la metodología de trabajo, ecología y resistencia frente a barreras naturales y artificiales de los colifagos somáticos, fagos F- específicos y fagos de *Bact. fragilis* a través de las tablas 1.14 y 1.17, que resumen las características más relevantes de dichos grupos. Las Tablas 1.15 y 1.16 presentan datos numéricos de concentraciones de bacteriófagos en muestras ambientales.

1.3.4 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS EN AGUAS

Los bacteriófagos pueden ser detectados por microscopía electrónica, pero ésta es una técnica que requiere tiempo, es cara, poco específica y no es aplicable en análisis rutinarios.

Generalmente la detección de bacteriófagos requiere un paso en el que se hace multiplicar a los organismos de forma que producen efectos específicos que permiten su identificación y detección macroscópica. Las técnicas que pueden utilizarse son:

- Test de la gota o enriquecimiento.
- Técnica del MPN (número más probable).
- Enumeración de calvas.
- Métodos moleculares.

En el Anexo 2 de esta memoria se especifica con detalles como realizar el test de la gota o enriquecimiento y como se cuantifican los bacteriófagos por recuento de calvas.

La estimación por el número más probable utiliza el enriquecimiento en tubos múltiples (y test de la gota de cada uno de los tubos) y se basa en el mismo principio que el proceso del MPN utilizado en los tests bacteriológicos.

El método de PCR ha sido aplicado con éxito para la detección de fagos de *Bact. fragilis* en muestras ambientales (Puig-M., 1998).

Los fagos F-RNA pueden ser subdivididos en cuatro serogrupos por métodos serológicos, y el serotipaje puede dar indicación del origen humano o animal de la contaminación fecal (Furuse, 1987). La hibridación de calvas es un método sensible que permite estudiar la distribución de los genotipos de los fagos F-RNA en muestras de agua (Schaper y Jofre, 2000).

En la Tabla 1.18 se presentan las principales ventajas e inconvenientes de los métodos anteriormente comentados.

La detección de bacteriófagos por recuento de calvas (técnica DAL) es relativamente barata y fácil de realizar. Este método normalmente está libre de errores sistemáticos (esto es, buena recuperación, sensibilidad y especificidad), es preciso y sólo detecta organismos infecciosos.

Tabla 1.17. Principales ventajas e inconvenientes de los métodos de detección y enumeración de bacteriófagos.

MÉTODO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Test de la gota	• Simple.	• Máximo volumen reproducible, 100 ml, • cualitativo.
Número más probable	• Simple.	• Poca precisión, • requiere gran cantidad de medio.
Recuento de calvas	• Cuantitativo, • precisión similar a MF para bacterias	• Adecuado para volúmenes de 1 ml por placa (adaptaciones a 5 ml y 100 ml). • Para volúmenes superiores, se requieren técnicas de concentración
Métodos moleculares: PCR	• Sensibilidad, • especificidad.	• No detecta viabilidad, • semicuantitativo, • requiere equipo especializado.
Serotipaje	• Determinación del origen de la contaminación	• Laborioso, • requiere tiempo.
Hibridación calvas	• Sensibilidad, determinación genotipos	• Laborioso.

En la Tabla 1.19 se muestran las características operativas de los posibles métodos para el control microbiológico de las aguas recreativas.

1.3.4.1 Necesidad de métodos de concentración para bacteriófagos

En las aguas naturales, el número de bacteriófagos puede ser inferior a 10 en 100 ml que sería el límite de detección utilizando el método estándar de la doble capa de agar (DAL) en 10 placas con un mililitro de muestra en cada una. Se han hecho modificaciones de esta técnica para acomodarla a volúmenes de 5 ml (Havelaar, 1986; Havelaar, 1993) y hasta 100 ml (Grabow y Cobrough, 1986). El análisis de volúmenes mayores directamente con esta técnica implicaría una gran cantidad de medio y por ello resulta más económico utilizar un método de concentración antes de titular.

Tabla 1.18. Características de métodos para el control microbiológico de las aguas recreativas (tabla adaptada de Havelaar, 1993).

<i>Característica</i>	<i>Modelo bacteriano</i>		<i>Virus</i>		<i>Bacteriófagos</i>
	técnica MPN	técnica MF	Cultivo celular	PCR	DAL
Recuperación	> 60 %	> 60 %	30 – 60 %	30 – 60 %	> 60 %
Sensibilidad	> 90%	> 90%	variable	variable	> 90%
Especificidad	> 90 %	> 90 %	> 90 %	> 90 %	> 90 %
Precisión ^a	+	++	+	0/+	++
Infectividad ^b	+	+	+	-	+
Límite de detección ^c (l ⁻¹)	1	1	10 ⁻² – 10 ⁻³	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴	10 ^d
Tiempo para resultados (d)	1 - 2	1 - 2	5 – 7 ^e	1 - 2	1 ^d
Coste aprox. del análisis (€)	50	50	1000	300-500	50 ^d
Capacitación requerida	laboratorio rutina	laboratorio rutina	laboratorio especializado	laboratorio central	laboratorio rutina

^a++ bajo control estadístico; + semicuantitativo; 0 cualitativo^b+ la infectividad ha sido valorada, - la infectividad no ha sido valorada^cIncluyendo métodos de concentración apropiados^dExcluyendo métodos de concentración^eVolumen de muestra máximo de 10 litros

MPN: número más probable; MF: filtración en membrana; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; DAL: método de la doble capa de agar.

Para investigar la calidad higiénica de las aguas de baño a veces no es suficiente con volúmenes de muestra de 100 ml, particularmente si los resultados también se utilizan para controlar la eficiencia de las medidas de reducción de la contaminación.

Hay bastantes posibilidades de detectar bacteriófagos en muestras de 100 ml o superiores. Estas técnicas han derivado principalmente de los métodos desarrollados para la concentración de los virus a partir de muestras ambientales.

Atendiendo a las propiedades físico-químicas de los fagos como macromoléculas proteicas y a sus características biológicas, se han descrito diferentes técnicas de concentración:

- Métodos biológicos
 - ↳ Enriquecimiento
 - ↳ Adsorción a la célula huésped

- Métodos físico-químicos
 - ↳ Adsorción/elución (filtros electronegativos, electropositivos, precipitados inorgánicos sobre filtro).
 - ↳ Floculación (floculación orgánica, orgánica magnética, inorgánica).
- Métodos físicos
 - ↳ Hidroextracción
 - ↳ Ultrafiltración
 - ↳ Ultracentrifugación

Muchos de estos métodos presentan desventajas respecto a volumen a examinar, coste, esfuerzo y reproducibilidad. Sólo los métodos de adsorción-elución a filtros (microfiltración) han sido ampliamente utilizados y evaluados.

1.3.5 BACTERIÓFAGOS DE BACTERIAS ENTÉRICAS EN AGUAS DE BAÑO

La aplicación de los bacteriófagos en una nueva Directiva para aguas de baño podría enfocarse desde tres perspectivas relacionadas:

- a. Sustitución del valor imperativo para enterovirus con un estándar para bacteriófagos.
 - b. Utilización de un estándar de bacteriófagos como complemento de los estándares para coliformes y estreptococos fecales.
 - c. Utilización de un estándar de bacteriófagos que derive directa o indirectamente de la valoración de riesgos para la salud.
- a) La base científica del valor imperativo para enterovirus en la Directiva 76/160/CEE ha sido duramente criticada, sobretudo debido al limitado significado para la salud de los enterovirus en aguas de baño, debido a la naturaleza arbitraria del criterio numérico y debido a que los resultados del análisis de virus dependen fuertemente de los métodos utilizados. Un estándar de bacteriófagos derivado de este estándar para virus tendrá las mismas objeciones. La ventaja de un estándar para bacteriófagos es que puede ser más fácilmente controlado en toda la UE porque la metodología es simple y barata.
- b) Aunque un gran número de estudios han mostrado que no hay correlación, o si la hay es débil, entre la concentración de (entero)virus y bacterias fecales en aguas de baño, es evidente que el cumplimiento de los estándares para coliformes y estreptococos fecales limita también la presencia y número de virus. Pero hay que tener en cuenta que cuando se utilizan tratamientos para el agua residual éstos actúan de forma diferencial sobre la inactivación de bacterias y virus. Los estreptococos fecales parecen más resistentes que los coliformes a los procesos de desinfección y podrían predecir de forma más precisa la presencia de virus. Un estándar para bacteriófagos podría ser aplicado en aquellos casos donde los estándares bacteriológicos no protegieran adecuadamente frente a los riesgos para la salud

asociados con virus. En el ámbito práctico resultaría difícil decidir qué playas requieren el análisis complementario de fagos.

- c) La forma más válida de fijar estándares para las aguas de baño está en relación con los riesgos para la salud. Éste es un proceso complicado pues incluso los estudios epidemiológicos prospectivos no ofrecen relaciones constantes entre la concentración de organismos modelo (o patógenos) y riesgos para la salud ni en el lugar ni en el tiempo o para diferentes grupos de poblaciones. Esto significa que el establecimiento de un único criterio para la calidad microbiológica del agua de baño en un área tan grande y diversa como la Unión Europea conduce a una variabilidad en el riesgo aceptado. Sólo estudios epidemiológicos prospectivos o de pruebas controladas azarosas a gran escala pueden indicar la magnitud de esta variabilidad y podrían indicar la necesidad de diferentes estándares en diferentes regiones de la Unión Europea. Los colifagos somáticos han sido evaluados en este sentido en el Reino Unido (Pike, 1993) y en España (Mariño *et al.*, 1995). Sólo se ha encontrado relación entre síntomas gastrointestinales en bañistas y concentración de estreptococos fecales en el agua recreativa (Fleisher, 1993).

A partir de lo anteriormente expuesto, podemos decir que los estándares bacteriológicos continúan siendo importantes para la protección de la salud de los bañistas. Debería prestarse más atención a los enterococos fecales y respecto al grupo coliforme, los criterios deberían centrarse en *E. coli*. Los estándares bacteriológicos no siempre garantizan la ausencia de virus ni la violación de estos estándares indica que los virus estén presentes. De esta forma, un estándar para bacteriófagos añadiría información complementaria. La consecución de este objetivo requiere estudios adicionales de bacteriófagos para poder decidir qué grupo de fagos es el más adecuado en el control virológico de las aguas recreativas y para poder establecer valores guía y valores imperativos con una base firme sobre estudios epidemiológicos.

En el reporte de Havelaar (1993) se relacionan algunas de las áreas más importantes que requieren investigación con el objetivo de proteger la salud de los bañistas frente a enfermedades víricas:

- i Riesgos para la salud asociados al baño.
 - ✓ Estudios epidemiológicos. Identificación de brotes asociados con el nado e identificación de las causas. Valoración de riesgo cuantitativo de patógenos.
- ii Virus en aguas de baño.
 - ✓ Armonización internacional de métodos para la detección de virus epidemiológicamente relevantes en aguas de baño.

iii Metodología para bacteriófagos.

- ✓ Estandarización de protocolos y materiales de referencia
Desarrollo y validación de métodos simples y reproducibles para la concentración de fagos de F-RNA y de *Bact. fragilis* a partir de agua de mar.

iv Ecología de bacteriófagos y virus.

- ✓ Ecología de bacteriófagos en el ambiente. Supervivencia de virus y bacteriófagos en el medio natural y frente a procesos de tratamiento de aguas.

1.4 OBJETIVOS GENERALES DEL PRESENTE TRABAJO

Nuestro trabajo se enmarca dentro del proyecto europeo N° SMT4-CT95-1603 titulado “*A feasibility study on the development of a method for the determination of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of bathing waters*”, simplificado a lo largo de esta memoria como “Bacteriófagos en aguas de baño”. En este proyecto se han abordado temas de metodología y ecología de bacteriófagos. Los objetivos concretos de nuestro estudio han sido:

- Evidencia de la necesidad de concentrar bacteriófagos en aguas de baño.
- Elección y adaptación de un método de concentración para bacteriófagos:
 - Válido para aguas dulces y aguas marinas.
 - Aplicable a volúmenes de hasta 1000 ml.
 - Capaz de concentrar colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* con una eficiencia aceptable.
 - Simple, barato y de fácil aplicación en laboratorios de rutina.
- Verificación de la reproducibilidad del método de concentración:
 - El método funciona con materiales de referencia de bacteriófagos y es reproducible con muestras naturales.
 - El método es transferible a y reproducible en otros laboratorios europeos.
- Ecología de bacteriófagos:
 - Cuantificación de bacteriófagos en aguas de baño de diferente calidad.
 - Estudio de las relaciones de bacteriófagos y bacterias indicadoras en agua residual y en aguas de baño.
 - Estudios de supervivencia de bacteriófagos en agua de mar.
 - Presencia de bacteriófagos en sedimentos marinos.
 - Estudio de virus entéricos en agua de mar.

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

En la introducción general se ha señalado la importancia y necesidad de utilizar métodos estandarizados para la detección y enumeración de microorganismos, pudiéndose así comparar resultados de diferentes laboratorios y países.

En los últimos años, nuestro laboratorio ha realizado un esfuerzo dirigido a la estandarización de los métodos de trabajo en microbiología del agua. La fiabilidad de los resultados presentados en esta memoria queda garantizada en la medida en que el trabajo experimental ha sido realizado siguiendo procedimientos normalizados de trabajo, ajustados a normativas ISO en el caso de bacteriófagos, con la debida utilización de materiales de referencia y controles de proceso.

2.1 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

A lo largo de nuestro estudio (1996-1999) hemos asistido a la evolución paralela de diferentes técnicas y a la adaptación de las metodologías normalizadas en el trabajo con bacteriófagos.

La detección y enumeración de colifagos somáticos, inicialmente en nuestro grupo se realizaba sobre la cepa de *Escherichia coli* CN13 (Payment and Franco, 1993; Lasobras, 1997; Puig-A, 1998). Con la adopción de la cepa de *E. coli* WG5 (ISO 10705-2), el cambio de medio de crecimiento de la bacteria huésped (de triptona a medio modificado de Scholten) ha aumentado la sensibilidad del método y la utilización de cultivos de trabajo congelados ha permitido la estandarización del procedimiento. También comprobamos que con el método DAL ("Doble Agar Layer") se obtenían recuentos más altos que con el método SAL ("Single Agar Layer"), observación que condujo a la eliminación de este método en la normativa ISO.

El grupo de investigación del Dr. J. Jofre ha trabajado en la optimización y estandarización del método de detección y enumeración de los fagos que infectan a *Bact. fragilis*. Los principales objetivos fueron encontrar una cepa huésped apropiada, optimizar la recuperación de fagos y proporcionar un método más factible (Araujo *et al.*, 2000).

Inicialmente la cepa recomendada para el estudio de fagos de *Bact. fragilis* era HSP40 (Jofre *et al.*, 1987). Posteriormente incorporamos la cepa RYC2056 porque detecta cantidades similares en diferentes áreas geográficas, incluyendo Europa, África y América (Puig *et al.*, 1999). Se empezó con B56-1 como fago de referencia para los fagos detectados sobre la cepa RYC2056 pero, descubierta la insuficiente estabilidad en el número y morfología de calvas en los stocks congelados a lo largo de varios meses y diferentes enriquecimientos, se investigó la idoneidad de B56-3 para el propósito de material de referencia.

Entre las variaciones en la composición del medio y condiciones de trabajo investigadas en el grupo de J. Jofre, nosotros probamos temporalmente la adición de 0.25 % de bilis a los medios de cultivo de la cepa huésped. La bilis aumentaba aproximadamente 1.2 veces el número de calvas detectadas en muestras ambientales directas y en muestras concentradas, pero la dificultad e irregularidad en el seguimiento

espectrofotométrico del crecimiento de la bacteria huésped descartaron su utilización en un protocolo estandarizado.

Finalmente, las modificaciones que han permitido la estandarización del método de *Bacteroides* han sido:

- ✓ Consecución de cultivos congelados gracias a la obtención de un crioprotector apropiado para *Bact. fragilis* (20% sacarosa, 10% BSA).
- ✓ Adición, de forma sistemática, a los medios de los antibióticos Ác. nalidíxico y Kanamicina monosulfato (100m µg/ml de cada uno).
- ✓ Posibilidad de añadir al agar blando hasta 300 µg/ml de Kanamicina cuando se analizan muestras naturales muy contaminadas.

El trabajo con cultivos congelados representa una ventaja metodológica incuestionable. Por un lado, el cultivo de trabajo está sometido a un control de calidad que garantiza su buen funcionamiento y por otro, el cultivo inóculo se prepara el mismo día del análisis de fagos. La adición de antibióticos al medio de cultivo líquido facilita la manipulación de la bacteria huésped fuera de la cabina de flujo laminar. Además, el incremento en antibióticos durante la titulación de muestras ambientales facilita la lectura de los resultados al verse reducida la flora acompañante, sin necesidad de un paso previo de descontaminación.

Los resultados de dicho trabajo (Araujo *et al.*, 2000) han sido utilizados para preparar la ISO/DIS 10705-4.

2.1.1 PROCEDIMIENTO

La detección y enumeración de bacteriófagos en este trabajo se ha llevado a cabo según las normativas ISO correspondientes. En el momento de la redacción de esta memoria tenemos a disposición los siguientes documentos ISO (*“International Organization for Standardization”*):

- ISO 10705-1 (1996), corregida febrero 1997, para los bacteriófagos F-específicos de RNA
- ISO/DIS 10705-2, enero 1999 para los colifagos somáticos.
- ISO/CD 10705-4, enero 1999 para los fagos de *Bacteroides fragilis*.

En el Anexo 2 aparecen los protocolos de trabajo detallados, adaptados a nuestras necesidades, basados en los documentos anteriores.

La Tabla 2.1 es un resumen de los requerimientos básicos para la detección de bacteriófagos entéricos. En las Figuras 2.1 y 2.2 presentamos de forma esquemática la metodología seguida para la preparación de los cultivos de trabajo y los cultivos inóculo en la detección de colifagos. El método de la doble capa de agar para la enumeración de bacteriófagos se muestra en la Figura 2.3.

Tabla 2.1. Resumen de los requerimientos para la detección y cuantificación de bacteriófagos en el medio acuático.

Detección de	COLIFAGOS SOMÁTICOS	FAGOS F-ESPECÍFICOS DE RNA (F total menos fagos que crecen con RNasa en el agar blando)	FAGOS DE <i>Bacteroides fragilis</i>
Cepa huésped	<i>E. coli</i> WG5	<i>S. typhimurium</i> WG49	<i>Bact. fragilis</i> HSP40 y <i>Bact. fragilis</i> RYC2056.
Medios de cultivo	Medio modificado de Scholten (MSB, MSA, ssMSA)	Medio tripton-extracto de levadura-glucosa (TYGB, TYGA, ssTYGA)	Medio modificado de <i>Brucella</i> (BPRM, BPRMA, ssBPRMA)
Material de referencia	Fago ϕ X174	Fago MS2	B40-8 para la cepa HSP40 y B56-3 para la cepa RYC2056.
Aditivos a los medios	• CaCl_2 en el agar blando y agar duro. • Ác. nalidixico en el agar blando en muestras contaminadas.	• Calcio-glucosa a todos los medios. • Ác. nalidixico en el agar blando en muestras contaminadas. • RNasa para la detección de fagos F-específicos de DNA y/o fagos somáticos de <i>Salmonella</i> en el agar blando.	• Hemina, NaCO_3, ajuste de pH con HCl, antibióticos (Ác. nalidixico y Kanamicina) en todos los medios. • Triple concentración de Kanamicina en el agar blando en muestras contaminadas.
Incubación	Aeróbica, 37° C durante 18 $\pm$ 2 h	Aeróbica, 37° C durante 18 $\pm$ 2 h	Aneróbica, 37° C durante 18 $\pm$ 2 h
Crecimiento de células viables	Aeróbica, 37° C durante 20 $\pm$ 4 h	Aeróbica, 37° C durante 20 $\pm$ 4 h	Aneróbica, 37° C durante 36 $\pm$ 2 h
Control de calidad de la cepa huésped	Previamente seleccionada de agar McConkey, lac +, titula correctamente el material de referencia.	Previamente seleccionada de agar McConkey, lac +, • cálculo del % de colonias lac +/lac- en el cultivo de trabajo y en el cultivo inóculo (lac - < 8% en el cultivo inóculo). • Resistencia al Ácido nalidixico y sensibilidad a la Kanamicina. • Titula correctamente el material de referencia	• Tinción Gram. • Titula correctamente el material de referencia.
Crioprotector para la bacteria huésped	Glicerol	Glicerol	BSA y sacarosa.

Figura 2.1. Esquema general para el cultivo y mantenimiento de las cepas huéspedes utilizadas en la detección de colifagos (somáticos y F-RNA).

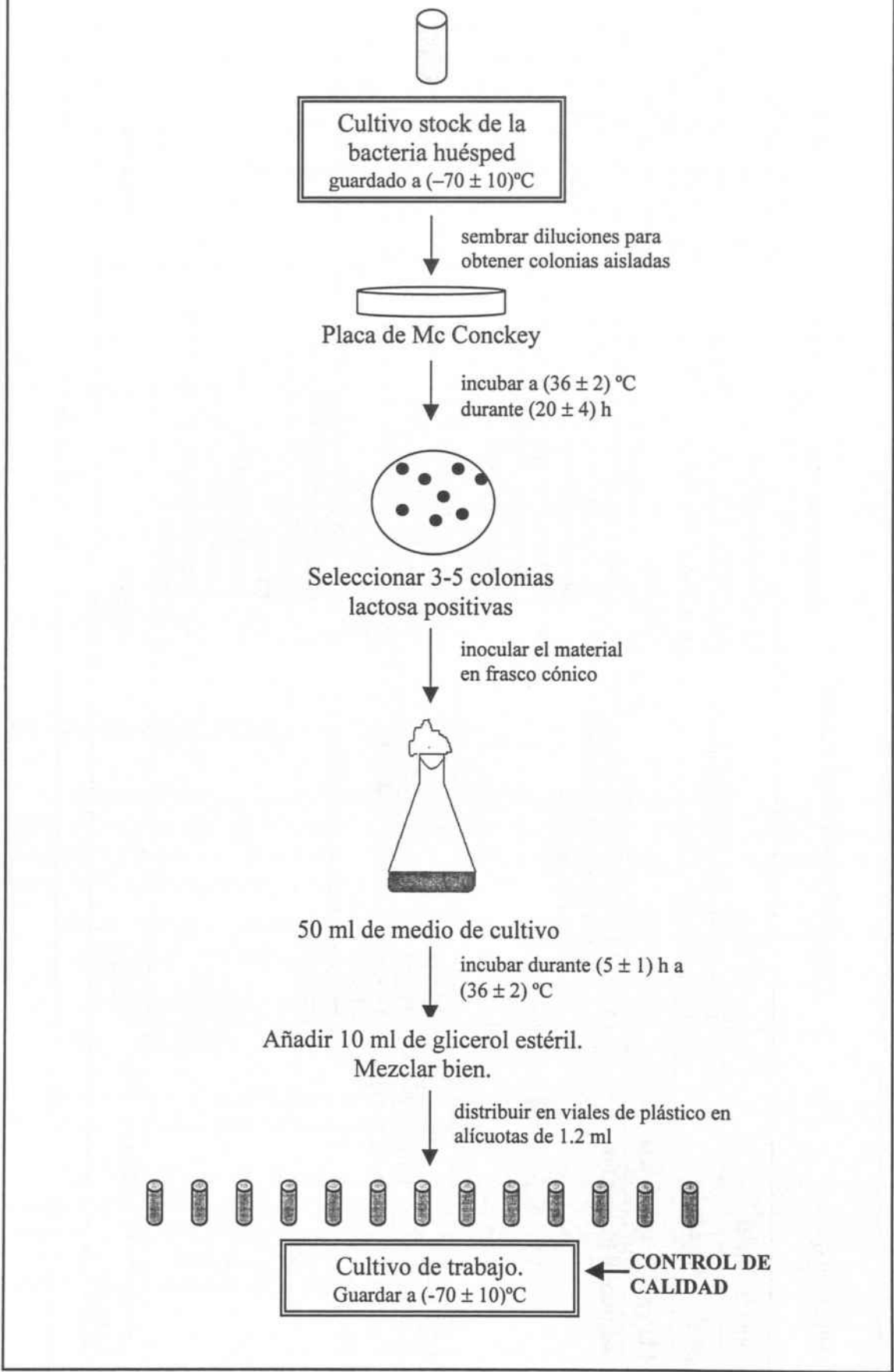
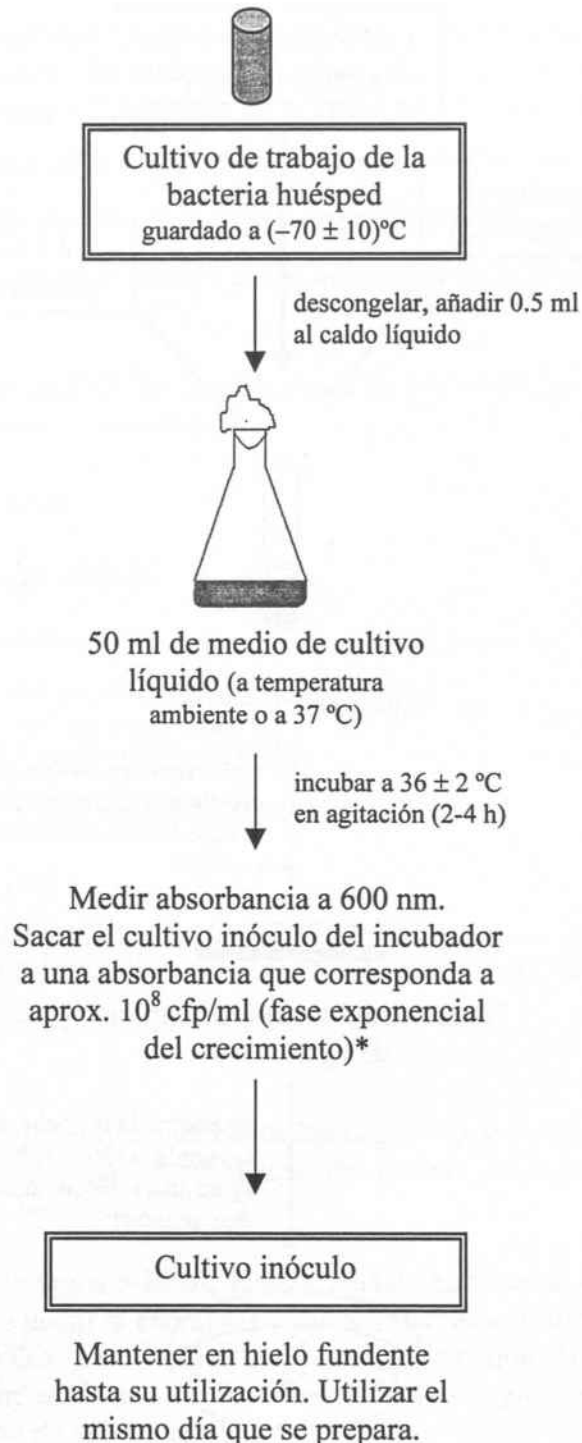
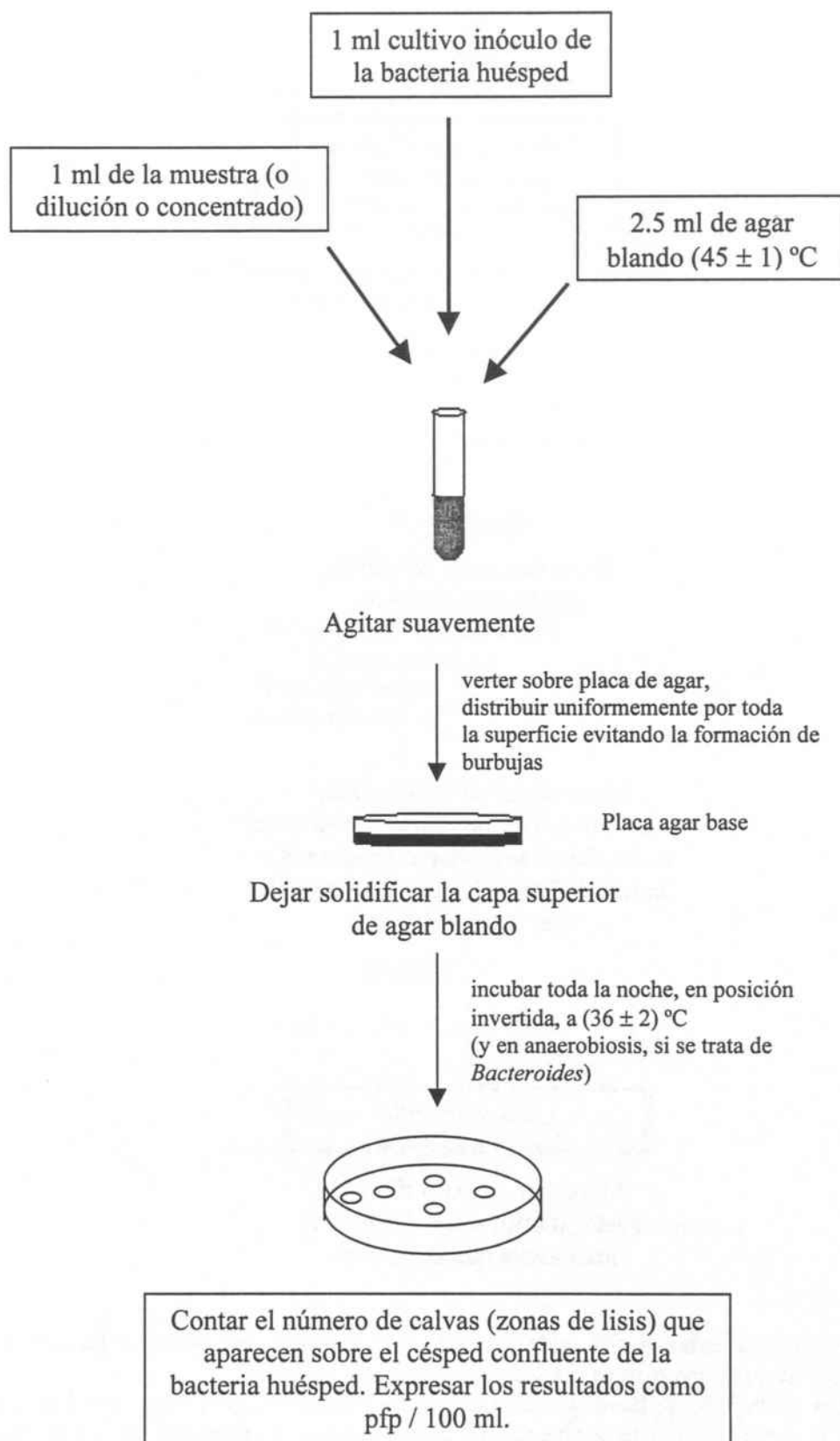


Figura 2.2. Enumeración de colifagos. Preparación del cultivo inóculo.

*previamente se habrá hecho la calibración de las medidas de absorbancia con los recuentos de microorganismos viables.

En dicha calibración se habrá ajustado la cantidad de cultivo de trabajo que hay que añadir al medio líquido para obtener un cultivo en fase exponencial en 2-4 h; este volumen oscilará entre 0.5 ml y 1ml. Si en 2-4 h no se llega a la fase exponencial de crecimiento, se descartará el cultivo de trabajo y se preparará otro nuevo.

Figura 2.3. Enumeración de bacteriófagos. Método de la doble capa de agar (DAL).



2.1.2 CONTROL DE LOS MATERIALES DE TRABAJO

El control se ha realizado a distintos niveles:

- ✓ Control de esterilidad (control de bacterias y bacteriófagos). Registro de los resultados en tablas diseñadas a tal efecto. Los medios de cultivo y aditivos sometidos a control se relacionan en la Tabla 2.1 (Anexo 2.G1)
- ✓ Control de calidad de las cepas huésped (Anexo 2.G2)
- ✓ Viabilidad de los cultivos de trabajo (ver procedimiento en Anexo 2.G3)
- ✓ Enumeración y cartas de control de los materiales de referencia (Anexo 2.F)

En cada serie de análisis de cuantificación de bacteriófagos (método de la doble capa de agar) se han incluido controles:

□ Inicio de la serie

- 2.5 ml agar blando sin aditivos
- 2.5 ml agar blando con aditivos
- 2.5 ml agar blando + 1 ml diluyente (peptona salina)
- 2.5 ml agar blando + 1 ml cultivo inóculo
- 2.5 ml agar blando + 1 ml cultivo inóculo + 1 ml diluyente

□ Final de la serie

- 2.5 ml agar blando + 1 ml cultivo inóculo + 1 ml material de referencia
- 2.5 ml agar blando + 1 ml cultivo inóculo

Es imprescindible realizar los controles negativos y positivos marcados por un recuadro en todas y cada una de las tandas de análisis de bacteriófagos para poder aceptar los resultados obtenidos.

En el análisis de fagos F-RNA, también deben hacerse un control negativo o de bacteria huésped y otro positivo con el material de referencia, utilizando en ambos casos el agar blando ssTYGA con RNasa para comprobar que la cepa WG49 de *S. typhimurium* crece bien en el agar semisólido con RNasa y que el enzima funciona bien inhibiendo la formación de calvas de MS2.

En el caso de *Bacteroides fragilis*, con estos controles también queda incluido el control de los materiales de anaerobiosis.

Resultados del control de los materiales de trabajo

□ Esterilidad

Se descartaron aquellos medios, aditivos y/o diluyentes que tras esterilización, incubación a 37° C o almacenaje no presentaron su aspecto característico. Las placas de agar donde aparecieron contaminantes (hongos o bacterias) después de algún tiempo de almacenamiento, se desecharon inmediatamente.

□ Calidad de las cepas huésped

En cada nuevo lote de cultivo de trabajo preparado se comprobó, según el caso, que:

- *E. coli* WG5 crecía en placas de agar McConkey y el 100 % de las colonias era lac + (colonias de color rosa).
- *S. typhimurium* WG49 crecía en placas de agar McConkey y entre el 95 y el 100% de las colonias fue lac +, según el lote, lo que significa que hubo poca segregación del plásmido (una colonia lac – significa que estas células han sufrido la pérdida del plásmido que codifica para los *pili* sexuales F donde se unen los bacteriófagos F-específicos). La bacteria presentaba resistencia al Ácido nalidíxico y sensibilidad a la Kanamicina.
- Los cultivos líquidos de *Bact. fragilis* HSP40 y *Bact. fragilis* RYC2056 fueron observados al microscopio óptico como bacilos Gram negativos y cultivo puro.

□ Viabilidad de los cultivos de trabajo

Para cada nuevo lote de cultivo de trabajo de una bacteria huésped se siguió el crecimiento de 2-3 viales mediante recuento de viables y densidad óptica para establecer la relación entre las medidas de absorbancia y recuento de colonias. De esta forma la preparación de los cultivos inóculo se siguió a través de la medida de la densidad óptica. Si las condiciones de cultivo eran siempre las mismas (temperatura del medio líquido inicialmente, volumen de cultivo de trabajo inoculado, volumen y forma del frasco o tubo, agitación durante el periodo de incubación), el tiempo de incubación necesario para llegar a la fase exponencial de crecimiento (aprox. 10^8 cfp/ml) era bastante constante, sobretodo en el caso de *E. coli* y *S. typhimurium*. En nuestras condiciones de trabajo obtuvimos:

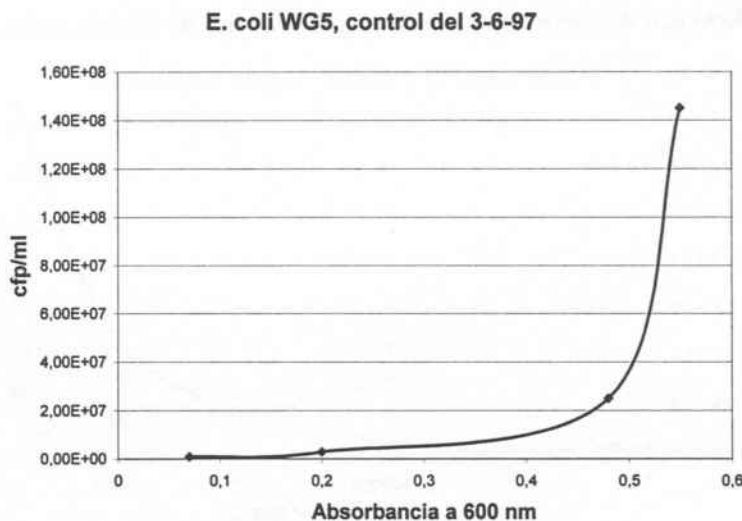
- *E. coli* WG5, entre 1 h 30 min y 2 h 30 min (absorbancia a 600 nm entre 0.5 y 0.6).
- *S. typhimurium* WG49, entre 3 h y 3 h 30 min (absorbancia a 600 nm entre 0.4 y 0.5). Cuando algún cultivo de trabajo empezaba a dar problemas porque el tiempo requerido para llegar a la fase exponencial aumentaba a 4 h o más,

descartábamos este cultivo de trabajo y preparábamos uno nuevo a partir del cultivo stock.

- *Bact. fragilis* HSP40 y *Bact. fragilis* RYC2056, entre 2 h 30 min y 4 h (absorbancia a 620 nm = 0.3) influyendo en gran medida si el medio estaba recién autoclavado o llevaba preparado algunos días. También es importante el inóculo de partida por lo que es útil saber el número de células viables en el cultivo de trabajo (lo ideal es que en la preparación del cultivo de trabajo, antes de congelar, tengamos del orden de $1-2 \times 10^9$ cfp/ml).

A modo de ejemplo, las Figuras 2.4 a 2.8 recogen algunas de las gráficas obtenidas durante los controles de viabilidad de los cultivos de trabajo.

Figura 2.4. Seguimiento de la densidad óptica y número de viables de un cultivo de trabajo de *Escherichia coli* WG5 preparado el 20/5/97.

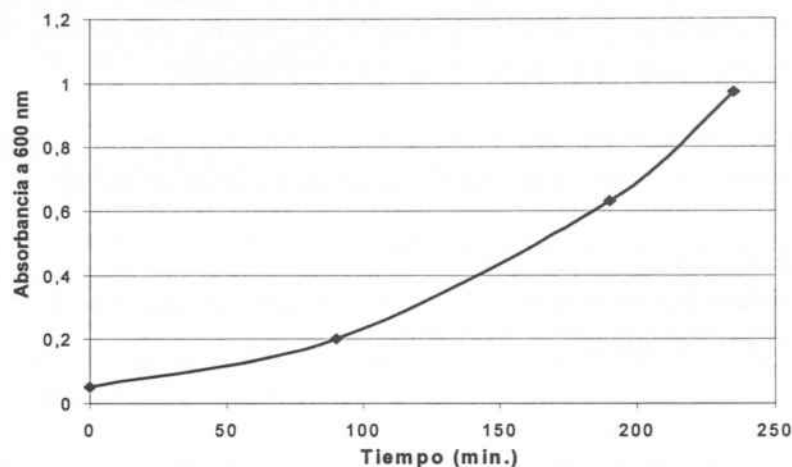


□ Enumeración del material de referencia y utilización de cartas de control

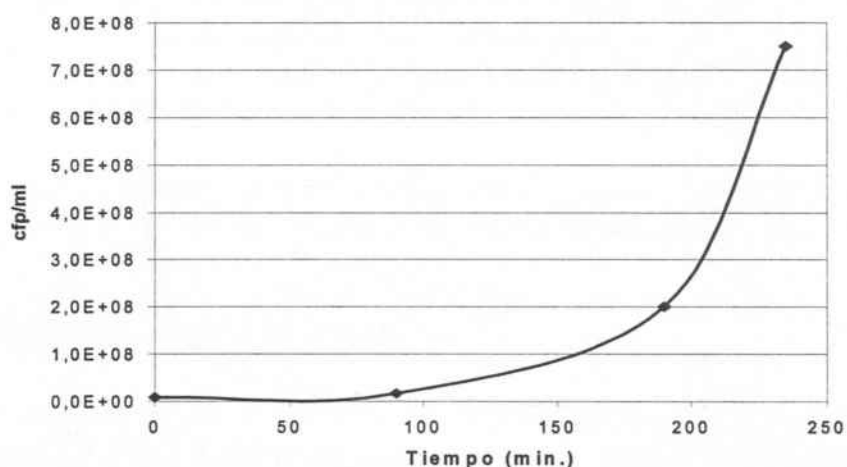
Una vez preparado un nuevo lote de cultivo de trabajo y comprobado que la curva de crecimiento es adecuada, como parte del control de calidad de la cepa huésped se ha de confirmar que titula correctamente el material de referencia. Se descongelan varios viales en días diferentes y se cuantifica el número de bacteriófagos en un mililitro. Como este lote de material de referencia está bien caracterizado (valor medio, límites de alerta y límites de acción), se situaran los resultados obtenidos con el nuevo lote de cultivo de trabajo sobre la carta de control y se observará si están dentro de los límites, verificando así que el cultivo de trabajo es correcto.

Figura 2.5. Curva de crecimiento de *Salmonella typhimurium* WG49 durante un control del cultivo de trabajo preparado el 5/12/97. Seguimiento por espectrofotometría y por recuento de células viables en el cultivo, en función del tiempo.

GRÁFICA A. Curva de crecimiento por densidad óptica, control 22/12/97



GRÁFICA B. Curva de crecimiento por recuento de viables, control 22/12/97



GRÁFICA C. Relación entre densidad óptica y recuento de viables, control 22/12/97

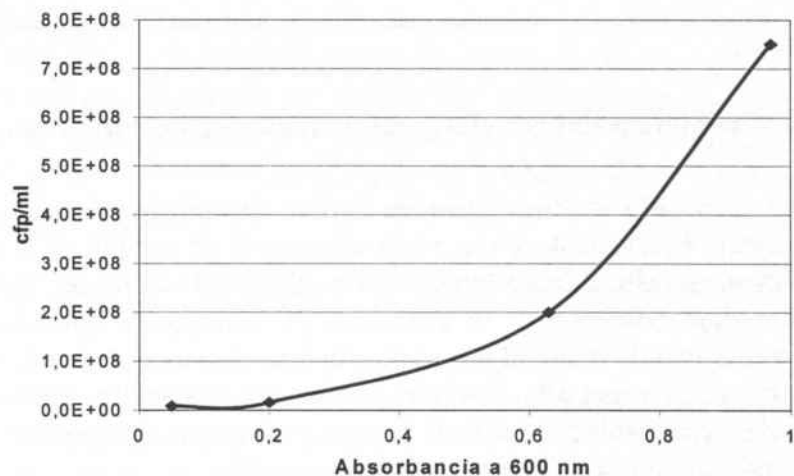


Figura 2.6. Curvas de crecimiento durante el control de un cultivo de trabajo de la cepa huésped *E. coli* WG5 preparado en junio de 1998. Cada uno de los días del control se testaron 2 viales del “working culture”. Se inocularon volúmenes de 0.1 y 0.2 ml en tubos de 20 con 10 ml de MSB y volúmenes de 0.5 y 1 ml en frascos nefelométricos de 250 con 50 ml de MSB.

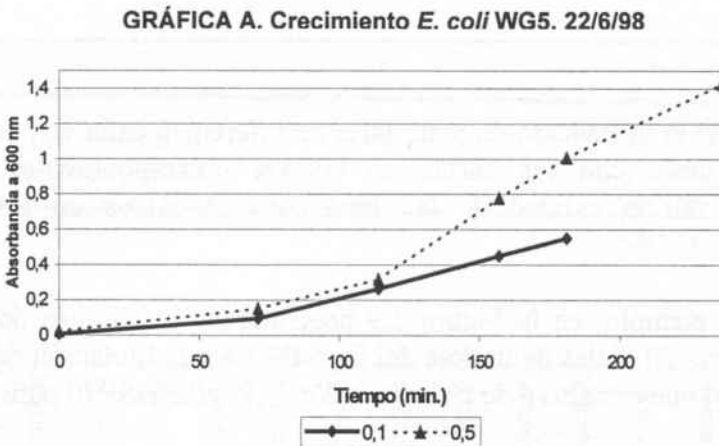
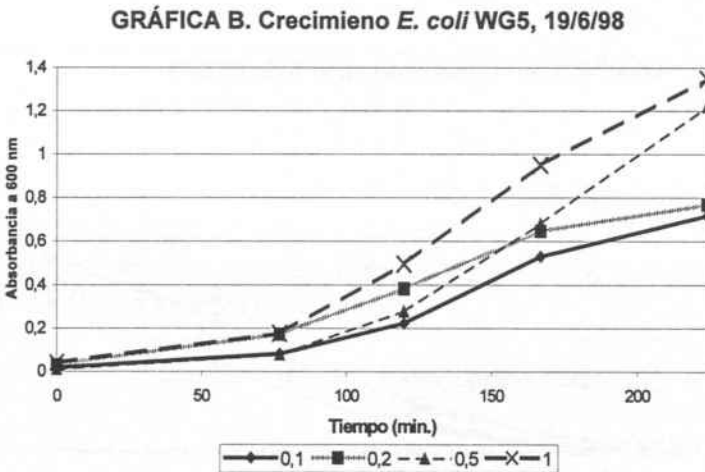
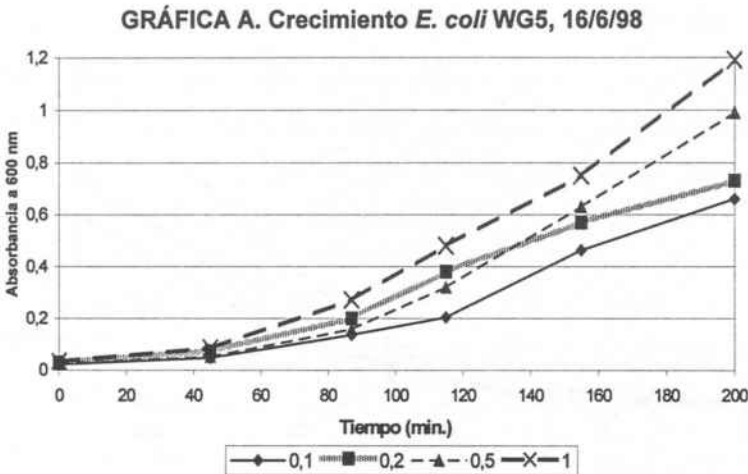
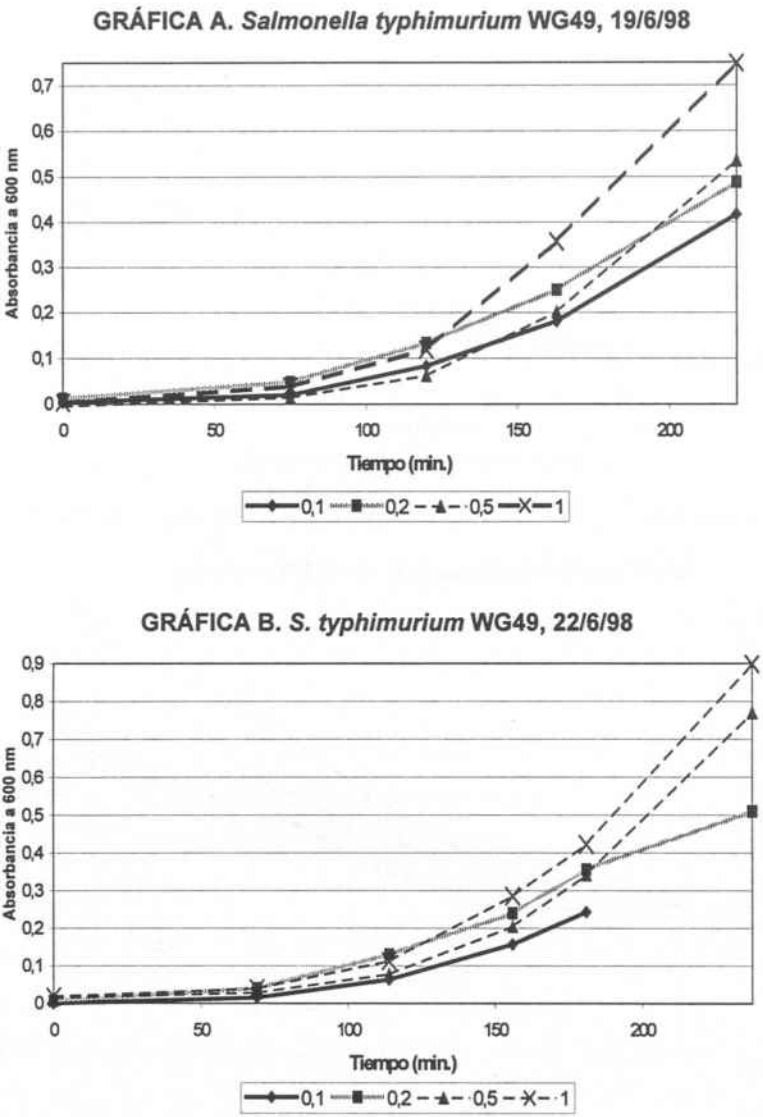


Figura 2.7. Curvas de crecimiento durante el control de un cultivo de trabajo de la cepa huésped *S. typhimurium* WG49 preparado en junio de 1998. Cada uno de los días del control se testaron 2 viales del “working culture”. Se inocularon volúmenes de 0.1 y 0.2 ml en tubos de 20 con 10 ml de TYGB y volúmenes de 0.5 y 1 ml en frascos nefelométricos de 250 con 50 ml de TYGB.



En definitiva, la utilización de materiales de referencia cada vez que se titula un grupo de fagos, junto con las cartas de control correspondientes debidamente preparadas, garantizan la calidad de los resultados obtenidos en los ensayos de bacteriófagos.

A modo de ejemplo, en la Figura 2.9 presentamos los límites de una carta de control preparada con 20 viales de un lote del fago B40-8 y la titulación de este material de referencia con un nuevo cultivo de trabajo de *Bact. fragilis* HSP40 para validarlo.

Figura 2.8. Seguimiento por densidad óptica del crecimiento de *Bacteroides fragilis* HSP40

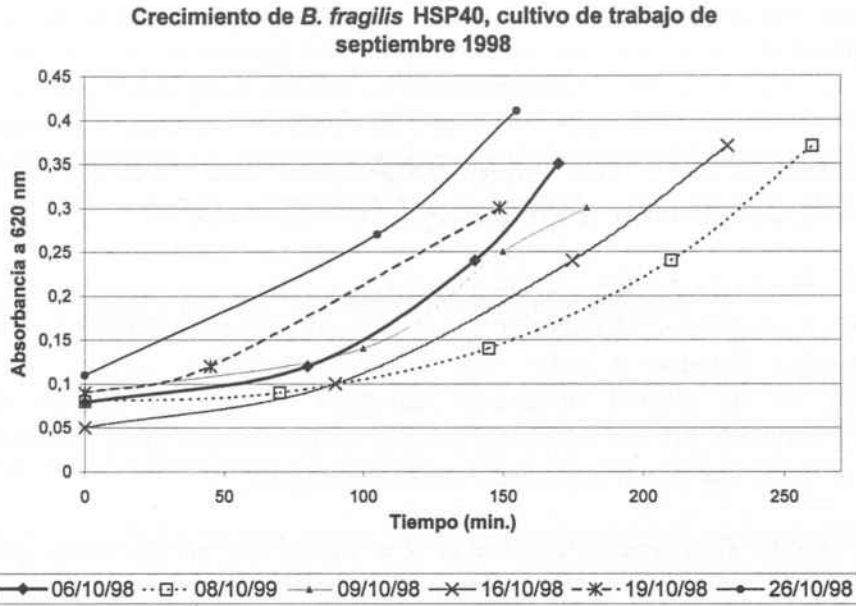
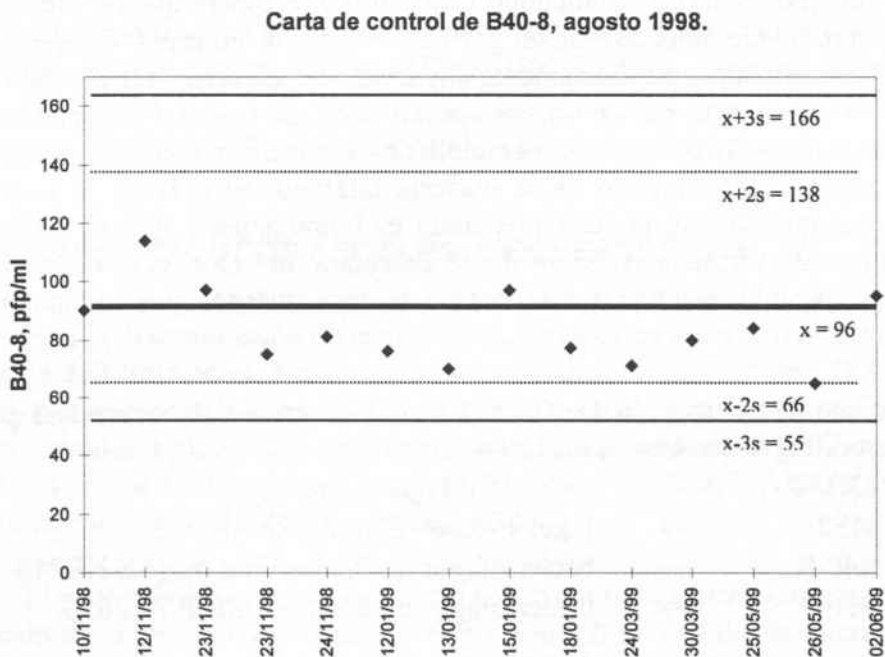


Figura 2.9. Gráfico control y resultados de la titulación de material de referencia del bacteriófago B40-8 (lote preparado el 23/2/98).



Entendemos que las cartas de control tienen “memoria”, esto quiere decir que es importante el orden de los resultados obtenidos en el momento de elaborar el gráfico control y establecer los límites. Las suspensiones de bacteriófagos pueden perder título a lo largo del tiempo y es por ello que transcurrido un cierto período de tiempo puede observarse una disminución del valor medio y esto implica que debería rehacerse el gráfico control.

2.2 PREPARACIÓN DE MATERIALES DE REFERENCIA Y CARTAS DE CONTROL PARA BACTERIÓFAGOS

En microbiología acuática, los resultados cuantitativos se utilizan para controlar si los estándares de calidad se cumplen. Se requieren análisis estándar de alta calidad que sólo pueden llevarse a cabo con la implementación de un esquema de aseguramiento de la calidad utilizando muestras control fácilmente accesibles, homogéneas y estables. En este contexto, los materiales de referencia son herramientas importantes en la evaluación de métodos y procedimientos.

En el intento de asegurar la calidad y la integridad de los datos generados y obtener resultados fiables y comparables, en nuestro laboratorio trabajamos con materiales de referencia y cartas de control.

La carta de control es un simple dispositivo gráfico para detectar modelos no naturales de variación en los datos resultantes de procesos repetitivos. Los puntos muestra son representados gráficamente de una manera secuencial, esto es, como se van obteniendo (es importante el orden de los datos). Los puntos son unidos por una línea, como una ayuda para la interpretación visual.

Para el caso que nos concierne, el material de referencia (“*reference material*”) es una suspensión de un bacteriófago modelo con un título alrededor de 10^2 pfp/ml y se guarda en alícuotas a -70°C (ver procedimiento de preparación en el Anexo 2.E). Se preparan series de gran cantidad de alícuotas (100-200) y se espera que en cada serie el título sea el mismo. Se recomienda realizar gráficos o cartas de control (“*control chart*”) de los bacteriófagos titulando periódicamente alícuotas de cada serie (ver procedimiento de preparación de una carta de control en Anexo 2.F). El material de referencia se utiliza cada vez que se hace una enumeración de bacteriófagos con el objetivo de comprobar el buen funcionamiento de la bacteria huésped. El gráfico de control es necesario para comprobar que la serie preparada es homogénea y que el material de referencia no presenta variaciones. Si un día se detectara un valor fuera de los límites del control, sería posible concluir que se debe a la cepa huésped y no al material de referencia.

Tal y como apuntamos en la Tabla 2.1, los materiales de referencia para el trabajo con bacteriófagos que hemos utilizado son:

- | | | |
|---------------------|---|--|
| • ϕX174 | → | colifagos somáticos, |
| • MS2 | → | fagos F-específicos de RNA |
| • B40-8 | → | bacteriófagos de <i>Bacteroides fragilis</i> HSP40 |
| • B56-3 | → | bacteriófagos de <i>Bact. fragilis</i> RYC2056 |

2.3 DETERMINACIONES BACTERIOLÓGICAS

2.3.1 COLIFORMES TOTALES

El análisis de coliformes totales no se ha llevado a cabo de forma sistemática en las muestras analizadas pero cuando se ha determinado este parámetro se ha realizado por filtración en membrana de acuerdo con el “*Standard Methods*” (APHA, 1995) y posterior incubación sobre agar m-Endo durante 24 h a 37° C (procedimiento en Anexo 3.A).

2.3.2 COLIFORMES FECALES (TERMOTOLERANTES)

Los coliformes fecales se determinaron por filtración en membrana, filtros de acetato de celulosa de 0.45 µm de diámetro de poro, y posterior incubación sobre agar m-FC durante 24 h a 44° C (APHA, 1995).

En muestras con un alto grado de contaminación (agua residual urbana, agua de río, agua de mar con aporte directo de agua contaminada) se analizaron diferentes diluciones decimales con Ringer 1/4 de la muestra directa. Para más detalles sobre el procedimiento, ver Anexo 3.B.

2.3.3 ESCHERICHIA COLI

Se considera que *E. coli* es más útil como indicador microbiano de la calidad del agua porque es más específico de la presencia de contaminación fecal que el grupo de coliformes fecales, tal y como se ha discutido en la introducción general de la presente memoria.

Para la detección de *E. coli* en agua de mar se utilizó el método de microplacas MU/EC, basado en el estándar francés (AFNOR NFT 90-433). Después de un mínimo de incubación de 36 h a 44 ± 0.5 °C se hace la lectura de las microplacas con luz ultravioleta (Sanofi, 1997). Para más detalles sobre el procedimiento, ver Anexo 3.C.

2.3.4 ESTREPTOCOCOS FECALES Y ENTEROCOCOS

Para la determinación de estreptococos fecales en los análisis rutinarios se utilizó la técnica de filtración en membrana y posterior incubación durante 48 h a 37° C sobre agar *m-Enterococcus*. La confirmación rápida se realizó transplantando la membrana con las colonias a placas con agar Bilis Esculina e incubación a 44°C durante 4 h. Este método es uno de los recomendados en el “*Standard Methods*” (APHA, 1995). Para más detalles sobre el procedimiento, ver Anexo 3.D.

El grupo de los enterococos es un subgrupo de los estreptococos fecales. Para la detección de enterococos en agua de mar se utilizó el método de microplacas MU/SF, basado en el estándar francés (AFNOR NFT 90-432). Después de un mínimo de

incubación de 36 h a 44 ± 0.5 °C se hace la lectura de las microplacas con luz ultravioleta (Sanofi, 1997). Para más detalles sobre el procedimiento, ver Anexo 3.E.

2.3.5 CONTROL DE CALIDAD DE LA ENUMERACIÓN DE E. COLI Y ENTEROCOCOS

Se utilizaron Lenticulas J, proporcionadas por el Instituto Pasteur de Lille (IPL), para el control de calidad de los métodos MU/EC (NFT 90-433) y MU/SF (NFT 90-432). El análisis de esta muestra estándar permitía un control de recuperación y los resultados se colocaron en una gráfica control elaborada por el IPL. Para más detalles sobre la preparación y el análisis de la muestra estándar, ver Anexo 3.F.

2.3.6 ESPORAS DE CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES

Para la detección de las esporas de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridios) se realizó la selección de las esporas presentes en la muestra mediante la aplicación de calor (80° C durante 10 min.) para destruir las bacterias vegetativas. La muestra se mezclaba con el agar SPS ("*sulfite polymyxin sulfadiazine*") en forma líquida, se dejaba solidificar y se incubaba a 44° C durante 24 h (Handford, 1974). Para más detalles sobre el procedimiento, ver Anexo 3.G.

2.4 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Para la determinación de los parámetros físico-químicos de las muestras se siguieron procedimientos recomendados en el "*Standard Methods*" (APHA, 1995).

- El **pH** de muestras y soluciones se midió con un pHímetro (Crison) calibrado diariamente, siguiendo las instrucciones del fabricante y los tampones comerciales. En los métodos de concentración de virus animales se utilizó un pHímetro portátil de campo, calibrado con las soluciones tampón siempre antes de ser utilizado.
- La **temperatura, salinidad y conductividad** de las muestras se tomaron con un conductímetro de campo (Ysi Model 33), siendo las unidades de medida grados Centígrados, tanto por mil (‰) y $\mu\text{mhos/cm}$, respectivamente.
- La **turbidez** de las muestras se determinó en el laboratorio con un turbidímetro (Hach, ratio/XR), con resultados en unidades de turbidez nefelométrica (NTU). La calibración del aparato se realizaba siguiendo las instrucciones del fabricante y los patrones correspondientes.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Uno de los gráficos más utilizados en el análisis estadísticos de los resultados de esta memoria ha sido el de diagrama de cajas obtenido con el programa estadístico SPSS.

Representación de los datos en diagramas de caja.

El diagrama de caja es un gráfico de resumen basado en la mediana, los cuartiles y los valores extremos. La longitud de la caja representa la amplitud intercuartil que contiene el 50% de los valores centrales. Los “bigotes” son las líneas que se extienden desde la caja hasta los valores más altos y más bajos, excluyendo los valores atípicos; como máximo, las líneas serán 1.5 veces la longitud de la caja. Una línea que atraviesa la caja indica la situación de la mediana. Este tipo de representación de los datos permite determinar si la distribución de los datos es asimétrica.

Los valores atípicos (representados como círculos) son casos con valores entre 1.5 y 3 longitudes de caja desde el borde superior o inferior de la caja (“outliers”). Los valores extremos (representados como estrellas) son casos con valores superiores a 3 longitudes de caja desde el borde superior o inferior de la caja.

Programas utilizados para los análisis estadísticos recogidos en esta memoria

- SPSS *The Statistical Package for Social Science* (SPSS para Windows, versión 8.0.1S, 31 julio de 1998; Chicago, IL, USA)
- Microsoft®Excel 97.

Capítulo III: NECESIDAD DE UN MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE BACTERIÓFAGOS VÁLIDO PARA AGUAS DE BAÑO Y DE FÁCIL APLICACIÓN EN LABORATORIOS DE RUTINA

3.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

3.1.1 ANTECEDENTES. NECESIDAD DE CONCENTRAR.

3.1.1.1 Presencia de bacteriófagos fecales en aguas recreativas. Referencias bibliográficas.

Las complicadas interacciones entre diferentes factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en el ambiente y los relativamente pocos datos disponibles hacen que las predicciones precisas de los números relativos de virus y organismos modelo sean difíciles. Así, es importante el examen de datos procedentes de estudios en los que se han analizado directamente los números relativos de bacteriófagos modelo, bacterias indicadoras y enterovirus en ambientes naturales para disponer de información más detallada sobre la ecología de los posibles organismos modelo en el control de la calidad del agua.

En la Tabla 3.1 recogemos estudios de distintos autores en el mundo sobre la presencia de bacteriófagos de bacterias entéricas en aguas que serían aptas para el baño según la Directiva europea 76/160/CEE (esto es, se han seleccionado muestras con niveles de coliformes termotolerantes inferiores a 2000 cfp/100 ml).

- ✓ Una de las primeras observaciones que podemos hacer al revisar los datos publicados es que son escasos los estudios en los que se han analizado en la misma muestra y de forma sistemática los tres grupos de fagos propuestos como microorganismos modelo de la contaminación fecal vírica (IAWPRC, 1991) en paralelo con los indicadores clásicos bacterianos. Cabe decir que también son pocos en la literatura los análisis de los parámetros microbianos mencionados anteriormente junto con los de virus entéricos dentro de las mismas muestras.
- ✓ Acusamos una abundancia relativa de datos para colifagos en comparación con los análisis realizados para fagos de *Bacteroides* así como un cambio de preferencia a partir de los años 90 a favor de los fagos F-específicos. Estos cambios de preferencias por uno u otro bacteriófago modelo se sitúan en un contexto cronológico específico: los fagos somáticos fueron propuestos como indicadores de contaminación fecal ya en los años 60 (Kott, 1966), los fagos F-RNA empezaron a considerarse como buenos organismos modelo para virus en aguas a principios de los 80 (Primrose *et al.*, 1982; Havelaar, 1986) y es a partir de los estudios de Jofre y col. (1986) que se proponen los fagos de *Bacteroides fragilis* como posibles índices y/o indicadores de contaminación fecal vírica humana.
- ✓ En relación al cuadro 3.1, queremos apuntar que la mayor parte de estudios son limitados en el tiempo y en el lugar y por otro lado, que hay una considerable variación en la metodología entre diferentes autores que contribuye con una proporción desconocida de variabilidad. Así, en el caso de las bacterias huésped, para el análisis de fagos somáticos se han utilizado las cepas de *Escherichia coli* C, K12 Hfr, C603, C600 y CN13, según autores; para la cuantificación de fagos F-específicos se han utilizado las cepas *E. coli* HS(pFamp)R y *Salmonella typhimurium* WG49 y la

detección de fagos que infectan a *Bacteroides fragilis* se ha realizado con la cepa HSP40, a excepción de los estudios de Chung y col (1998) en los que se ha trabajado con la cepa VP1 3625. La enumeración de fagos se ha llevado a cabo siguiendo la técnica estándar de la doble capa de agar (Adams, 1957) en la mayoría de los trabajos referidos en la tabla pero alguno de ellos utiliza una modificación del número más probable (Tartera *et al.*, 1989), otro emplea una modificación de la doble capa de agar con 5 ml de muestra y placas de petri de 14 mm de diámetro (Havelaar, 1993) y otros acomodan muestras de 100 ml según describieron Grabow y Coubrough en 1986 (Genthe *et al.*, 1995). También encontramos diferencias en los medios de cultivo empleados por diferentes autores para la detección del mismo grupo de bacteriófagos. Esta heterogeneidad en los métodos se podría explicar por la falta de estandarización en el ámbito internacional, sobretudo antes del primer documento ISO para la detección y cuantificación de fagos F-RNA (1995).

- ✓ Uno de los aspectos más sobresalientes después de la observación de los datos presentados en la Tabla 3.1 son los bajos números de fagos de *Bacteroides* y fagos F-específicos en muestras ambientales poco contaminadas mientras que los colifagos somáticos se detectan en un porcentaje alto de los ambientes acuáticos analizados y a mayores concentraciones que los otros dos grupos. Los resultados se han obtenido por análisis directo de 10 ml en los estudios de Inglaterra y España y en el realizado por Jagals y col. en Sudáfrica mientras que en el resto de estudios citados en la tabla (aproximadamente la mitad) la cuantificación de bacteriófagos se ha realizado después de la aplicación de algún método de concentración (diferentes técnicas de filtración y en algunos casos reconcentración).
- ✓ Hay gran variabilidad sobre las relaciones entre parámetros microbiológicos que obtienen los diferentes autores.
 - En lagos con fines recreativos Havelaar (1993) encuentra que las concentraciones de fagos F-RNA se correlacionan bien con las concentraciones de virus. Por el contrario, los fagos F-RNA no muestran una relación directa con los niveles de contaminación fecal en los trabajos de Moriñigo y col. (1992), a partir de los cuales concluyen que los colifagos somáticos podrían ser buenos indicadores de la calidad microbiológica de las aguas naturales.
 - En otros trabajos de agua de río se concluye que son los fagos de *Bact. fragilis* los más resistentes a los procesos de inactivación natural (Tartera *et al.* 1989; Araujo *et al.*, 1997) a pesar de lo cual Jagals y col. (1995) conceden poco valor a los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 porque en los estudios de agua de río que ellos realizaron no fueron detectados por análisis directo en ninguna muestra, y como indican los mismos autores, se requieren métodos de detección más sensibles para este grupo de fagos. Jagals y col. sugieren que los fagos F-específicos indicarían contaminación fecal de origen humano y no de origen animal mientras que los colifagos somáticos no muestran ninguna relación particular con el origen humano o animal de la contaminación.
 - En varios estudios de aguas marinas con distintos grados de polución se obtiene que los bacteriófagos somáticos son los indicadores más apropiados de contaminación remota (Borrego *et al.*, 1987; Cornax *et al.*, 1991; Moriñigo *et al.*, 1992). O'Keefe y Green (1989) llegan a la conclusión de que los colifagos somáticos son indicadores de contaminación fecal igual de adecuados que los

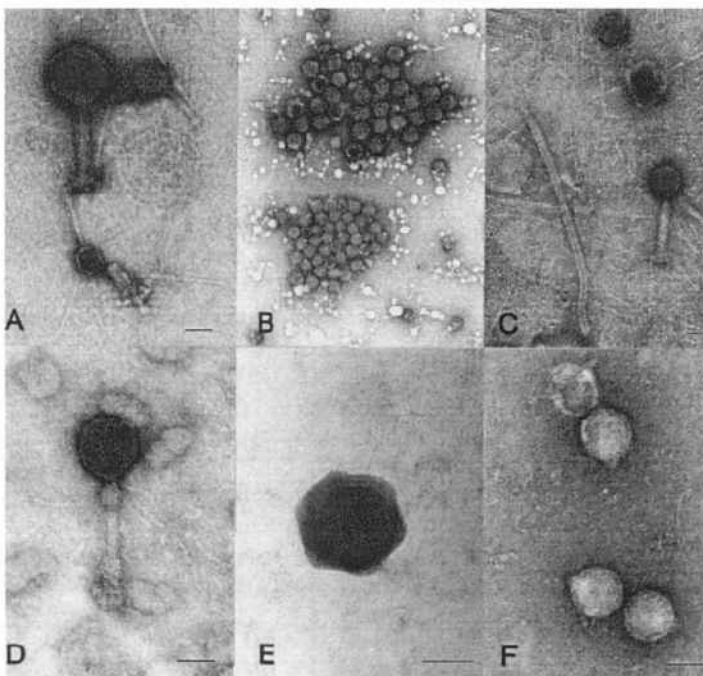
coliformes. Contrariamente a estos resultados, Genthe y col. (1995) indican con sus estudios que los colifagos somáticos no son indicadores adecuados de la calidad del agua marina.

- Alcantara y Almeida (1995) no observaron ninguna correlación entre los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y virus entéricos o colifagos en las rías de Portugal.
- Chung y col. (1998) apuestan por los fagos F-específicos (y serogrupo II) como indicadores de contaminación de virus entéricos humanos en aguas utilizadas para la cría de marisco dado que para los análisis de rutina los límites de detección de fagos de *Bact. fragilis* en estas aguas son inadecuados. Sin embargo, Lewis (1995) opina que aunque los fagos F-específicos parecen comportarse de forma similar a los patógenos, su escasa abundancia en aguas de baño marinas, su incerteza de origen y otras irregularidades en su detección hacen que su utilización como indicador sea problemática.

En definitiva, los resultados obtenidos por diferentes autores demuestran principalmente la variabilidad que encontramos al examinar los datos del análisis de muestras ambientales.

Consideramos que el estudio de los tres grupos de bacteriófagos en paralelo en aguas recreativas de distintas zonas geográficas y en las mismas zonas pero en diferentes épocas del año, utilizando métodos de detección más sensibles y aplicando métodos estandarizados para la enumeración, podrían aclarar un poco más la ecología de estos microorganismos (relaciones con otros parámetros bacteriológicos y virológicos, supervivencia en ambientes naturales, resistencia a distintos fenómenos de inactivación, etc.).

Figura 3.1. Diversidad de los virus marinos.



Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión. Las imágenes de la A a la C ilustran comunidades virales naturales del Golfo de Méjico. Las imágenes D y F muestran virus que infectan a cianobacterias marinas del género *Synechococcus* y la imagen E corresponde a un virus que infecta al flagelado fotosintético *Micromonas pusilla*.

(Suttle and Chan, 1993, 1994; Cottrell and Suttle, 1991, 1995)

<http://www.phage.org>. Consulta día 1-3-00

Tabla 3.1. Presencia de bacteriófagos y bacterias fecales en aguas recreativas. Se representan las medias geométricas en pfp ó cfp / 100 ml (mg) y/o el porcentaje de muestras positivas (pos). También se constatan los valores máximos y mínimos que aparecen en los artículos referenciados.

Muestras	n		SOM	F-TOT	Bf	CF	EF	Referencia
• Agua marina (CF < 2000 cfp/100 ml)								
Torremolinos Málaga, España		mg pos min max	6	-	-	1	-	Borrego <i>et al.</i> , 1987
Playas en Firth of Forth, costa este de Escocia	18	mg pos min max	11.1 94.4 % <1 89	-	-	87.7 88.9 % <1 1950	-	O'Keefe <i>et al.</i> , 1989
Misericordia Málaga, España	9	mg pos min max	800 100 % 9.7 7700	220 <10 <10 1200	<10 <10 <10 790	220 100 % 15.1 14000	530 100 % 3 12000	Cornax <i>et al.</i> , 1991
Santa Ana Málaga, España	10	mg pos min max	15.8 100 % 10 60	<10 <10 <10 50	<10 0 % <10 <10	12.5 100 % 3 63	79.4 100 % 30 1300	Cornax <i>et al.</i> , 1991
Ramsgate Kent, UK	6	pos	100 %	0 %	-	≤1000	100 %	Morinigo <i>et al.</i> , 1992
James River, USA		mg	-	759	<1	8	-	Kator and Rhodes, 1993
Playas Barcelona, España		mg	363	4.7	3.3	45.7	20.9	Lucena <i>et al.</i> , 1995
Milford, Nueva Zelanda	288	mg pos	-	<0.3 15 %	-	19 %	14 %	Lewis, 1995
Western Cape Sudáfrica	64	mg pos min max	2 <20 % 0 315	-	-	13 100 % 1 2000	6 0 253	Genthe <i>et al.</i> , 1995
Costa Nova, Ría Aveiro, Portugal	3	mg pos	2.29 100 %	<1 0 %	<1 0 %	147.4 100 %	23.41 100 %	Alcântara and Almeida, 1995
Costa noreste de Inglaterra	9	mg pos min max	-	48.2 33.3 % <20 140	-	729.4 100 % 200 1300	136.8 100 % 70 300	Pallin <i>et al.</i> , 1997
Waikiki, Hawaii, USA	8	mg	-	<0.1	-	<10	-	Paul <i>et al.</i> , 1997
Estuario Calico Creek USA	21	mg pos min max	-	3 <1 100	1.2 <1 19	12 100 % 3 86	3.2 <0.5 117	Chung <i>et al.</i> , 1998

(-) no se dispone del dato correspondiente

Continuación Tabla 3.1, presencia de bacteriófagos y bacterias fecales en aguas recreativas.

Muestras	n		SOM	F-TOT	Bf	CF	EF	Referencia
• Agua dulce (CF <2000 cfp/100 ml)								
Río Oldman Canadá		mg	324	-	-	79	-	Bell, 1976
Río Gualdhorce, Málaga, España		mg pos min max	54	-	-	1	-	Borrego <i>et al.</i> , 1987
Agua prístina Puerto Rico		mg	< 0.1	-	-	32	1442	Toranzos <i>et al.</i> , 1988
Río Llobregat, Barcelona España	15	mg pos min max	906 73% 0 4600	-	6.7 46% 0 43	1500 100% 10 5100	790 100% 8 1500	Tartera <i>et al.</i> , 1989
Delta de l'Ebre Tarragona España	30	mg pos min max	3.4 55 % 0 23	-	<10 0 %	73.5 0 1500	67.6 0 4600	Tartera <i>et al.</i> , 1989
Agua de río Canadá		mg pos min max	562	-	-	257		Payment <i>et al.</i> , 1989
Big Beach (lago) SW Ontario, Canadá	10	mg	13	24	-	35	17	Palmateer <i>et al.</i> , 1991
Río Thames Inglaterra	18	mg pos	100 %	55.6%	-	≤1000	94.4 %	Morínigo <i>et al.</i> , 1992
Río St Clair Canadá		mg	28	-	-	20	11	Marsalek <i>et al.</i> , 1992
Lagos Países Bajos	32	med pos min max	-	2.8 75 % <0.4 130	-	250 38 8900	40 6 7600	Havelaar <i>et al.</i> , 1993
Río Sudáfrica	15	mg pos min max	78 100 % 1 600	0 %	0 %	110 100% 6 1600	79 100 % 1 880	Jagals <i>et al.</i> , 1995
Río Barcelona España	96	mg pos	1.72 15.2 %	1.49 14.1 %	1.67 21.9 %	4	-	Araujo <i>et al.</i> , 1997.

(-) no se dispone del dato correspondiente

SOM: colifagos somáticos; F-TOT: fagos F-específicos totales; Bf: fagos de *Bact. fragilis* HSP40, excepto en el trabajo de Chung *et al.* (1998) que son fagos detectados con la cepa VP1 3625.

3.1.1.2 Datos preliminares: resultados del análisis directo de fagos en muestras ambientales.

Hemos observado en el apartado anterior que en ocasiones la sensibilidad de los métodos de detección directa de bacteriófagos en el medio acuático no es suficiente para valorar la calidad del agua. Nosotros analizamos muestras con distintos grados de contaminación con el objetivo de cuantificar directamente los colifagos somáticos, los fagos F-específicos y los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 presentes en volúmenes de 10 ml. Los muestreos se realizaron dentro del Área Metropolitana de Barcelona. La metodología empleada es la que se describe en el capítulo de *Material y Métodos generales* de la presente memoria. Con esta forma de proceder, el límite de detección es de 10 partículas formadoras de calvas en 100 ml. En las tablas 3.2 y 3.3 se presentan los resultados brutos en agua de mar y en agua de río respectivamente.

Observamos un alto porcentaje de resultados negativos para fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* en muestras, tanto marinas como de río, que cumplen el nivel imperativo de la Directiva europea 76/160/CEE para aguas recreativas (CF <2000 cfp/100 ml). En la figura 3.1 se manifiesta gráficamente que en muestras con niveles altos de polución microbiana, el análisis directo de los distintos parámetros es suficiente para poner en evidencia esta circunstancia.

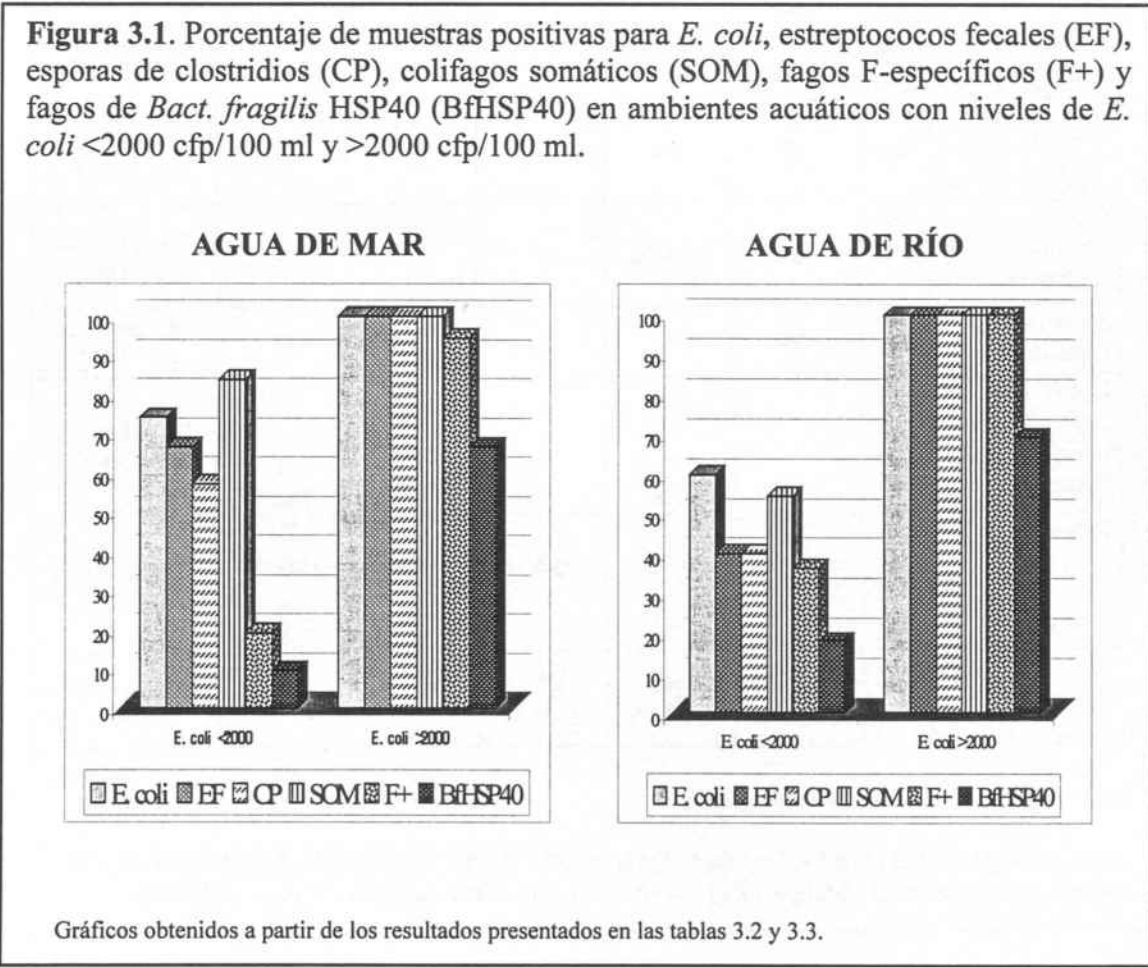


Tabla 3.2. Cuantificación de bacteriófagos de bacterias entéricas en agua de mar por análisis de 10 ml (método DAL). Comparación con los resultados de bacterias fecales y esporas de clostridios.

CFP/PFP 100 ml		BACTERIOLOGÍA			FAGOS, titulación directa		
MUESTRA	fecha	<i>E. coli</i>	EF	CP	SOM	F-TOT	BfHSP
NETA	01/07/97	0	0		175	0	0
CAS-3	08/07/97	0	0	0	40	0	0
PIN-4	22/07/97	0	0	0	0	0	0
MAR-01	29/07/97	0	0	0	10	0	0
PIN-5	29/07/97	0	0	0	0	0	0
MAR-02	05/08/97	0	15	0	0	0	0
PRAT-8	05/08/97	0	15	200	60	0	0
CAM 1	10/06/97	0	0	480	160	0	0
PRAT-5	08/07/97	15	0	0	100	0	0
PRAT-10	26/08/97	15	0		543	10	0
PRAT-7	29/07/97	30	15	0	0	0	0
PIN-6	05/08/97	46	30	75	0	0	0
CAS	23/04/97	100	50		120	0	0
BRUTA	01/07/97	100			140	0	0
PRAT-6	22/07/97	110	15	60	220	0	0
PIN-8	26/08/97	126	30	30	129	0	0
PRAT 3	26/06/97	144	15	30	100	0	0
PIN	23/04/97	160	140		760	0	0
PIN-1	26/06/97	179	0	0	120	0	0
MUR-3	22/07/97	195	0	10	60	0	0
CAM	23/04/97	220	50		420	0	0
MUR	23/04/97	330	190		580	0	20
BAR	17/12/96	420	150		1260	30	0
GOLF	23/04/97	430	150		81	0	0
MAR	30/10/97	773	742	500	2030	20	0
PRAT-2	17/06/97	796	179	1000	10500	260	56
SA	30/10/97	1089	390	1200	5670	20	0
PIN-3	08/07/97	1160	15	0	40	0	0
CAS-1	26/06/97	1180	15	60	220	0	0
CAM	17/12/96	1350	7900		820	0	0
E2	09/01/97	1650	400	240	440	10	20

AGUA DE MAR

<i>E. coli</i> cfp/100 ml	n	SOM % positivos	F-TOT % positivos	BfHSP % positivos
< 2000	31	83.9	19.4	9.7
100-2000	16	100	31.2	18.7
≤ 100	15	66.7	6.7	0

(Continúa)

Continuación Tabla 3.2. Cuantificación de bacterias fecales, esporas de clostridios y bacteriófagos de bacterias entéricas en agua de mar.

CFP/PFP 100 ml		BACTERIOLOGÍA			FAGOS, titulación directa		
MUESTRA	fecha	<i>E. coli</i>	EF	CP	SOM	F-TOT	BfHSP
E6	09/01/97	2350	200	330	1440	40	10
PRAT 1	10/06/97	2570	393	1180	9000	70	20
MUR-1	10/06/97	3114	419	2500	8760	50	0
E1	09/01/97	6860	650	250	840	40	0
MUR-2	17/06/97	9930	2380	900	1440	0	0
MUR	17/12/96	10000	140		2750	60	20
SAP	17/12/96	10000	200	100	19300	300	70
CAM-2	17/06/97	10700	1710	900	5060	100	20
Saa	17/12/96	12500	1350	300	14700	240	60
Ea	14/01/97	15100	2150	500	9360	140	380
Sac	17/12/96	16500	2500	400	19200	420	130
Eb	14/01/97	16900	3350	480	7360	90	310
SAd	17/12/96	29600	2550	200	17300	500	150
E4	09/01/97	32600	2150	800	2160	50	0
PRAT	30/10/97	35000	7101	1200	14200	1250	20
MUR	30/10/97	35000	1881	1200	6067	250	10
E5	09/01/97	63300	600	1200	3920	60	0
E3	09/01/97	283000	900	300	-	20	0

AGUA DE MAR

<i>E. coli</i> > 2000 cfp/100 ml	SOM % positivos	F-TOT % positivos	BfHSP % positivos
n = 18	100	94.4	66.7

- SOM: colifagos somáticos detectados con la cepa WG5 de *E. coli* (excepto en 1996 que se utilizaba la cepa CN13); F-TOT: bacteriófagos F-específicos detectados con la cepa *S. thyphimurium* WG49 sin la utilización de RNasa; BfHSP: fagos de *Bacteroides fragilis* HSP40.
- Cuando una celda de la tabla aparece en blanco, no se dispone del dato correspondiente.
- Los valores 0 significa que estamos por debajo del límite de detección. Para bacteriófagos analizamos 10 ml por muestra (1 ml por placa) y no se observó ninguna calva. El valor 0 de una celda sería equivalente a <10 / 100 ml para todos los parámetros microbiológicos presentados.
- Algunos datos de bacteriología han sido cedidos amablemente por M. Cerdá y J. Dellundé, miembros de nuestro grupo de investigación.

Tabla 3.3. Cuantificación de bacteriófagos de bacterias entéricas en agua de río por análisis de 10 ml (método DAL). Comparación con los resultados de bacterias fecales y esporas de clostridios.

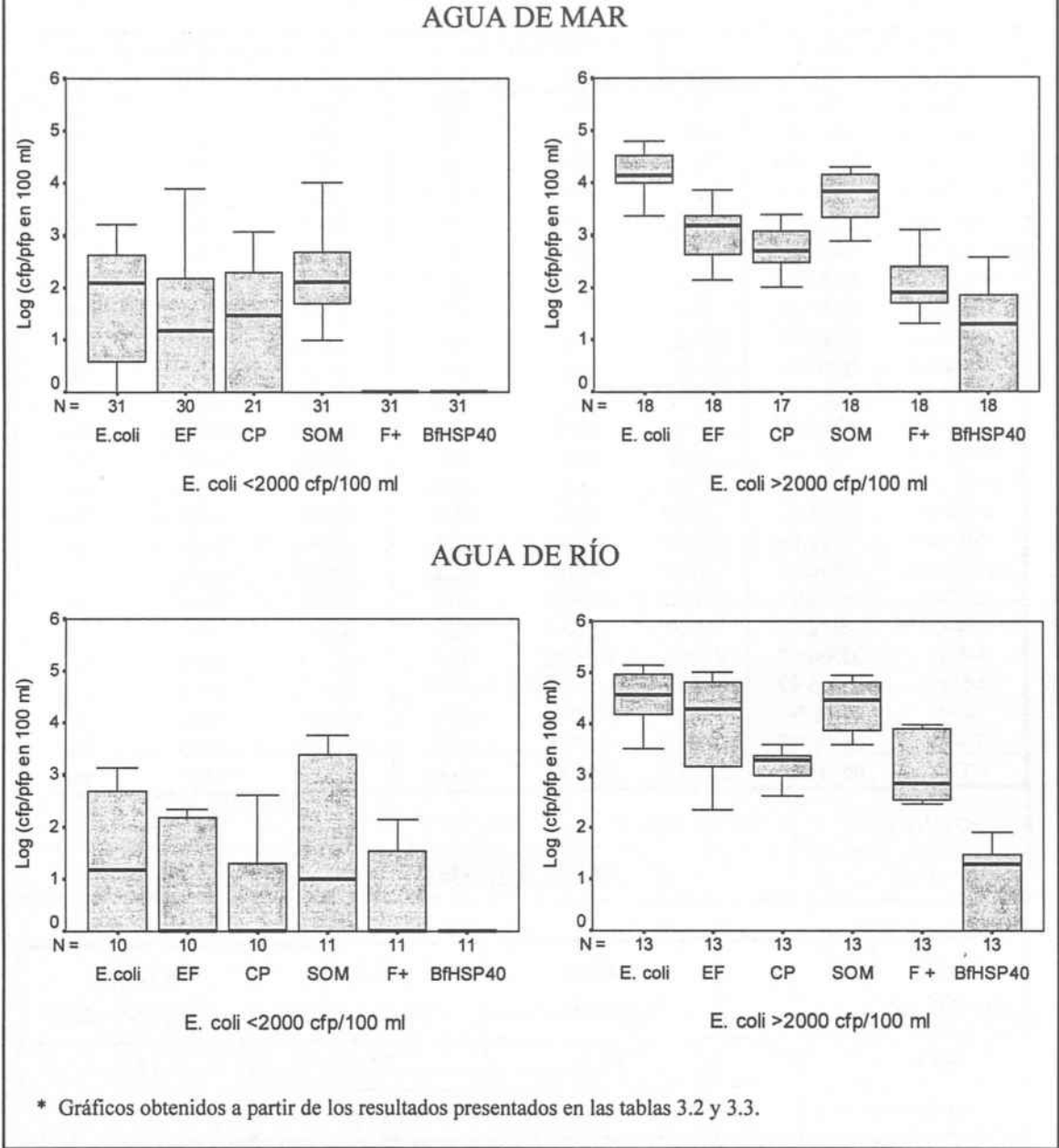
CFP/PFP 100 ml		BACTERIOLOGÍA			FAGOS, titulación directa		
MUESTRA	fecha	<i>E. coli</i>	EF	CP	SOM	F-TOT	BfHSP
CARDEDEU-1	12/06/97	0	0	10	10	0	0
CARDEDEU-5	10/07/97	0	0	0	20	0	0
CARDEDEU-7	31/07/97	0	0	0	0	0	0
CARDEDEU-4	03/07/97	0	0	0	0	0	0
CARDEDEU-3	26/06/97	15	0	0	0	0	0
CARDEDEU-6	24/07/97	15	0	0	0	0	0
CARDEDEU-2	19/06/97	30	15	0	0	0	0
ABRERA	21/05/97				2220	30	0
ABRERA-6	24/07/97	492	150	20	2833,3	40	10
ABRERA-5	10/07/97	760	152	300	5700	140	10
ABRERA-1	12/06/97	1350	215	400	3480	90	0
ABRERA-4	03/07/97	3390	1500	1200	30440	287,5	0
ABRERA-7	31/07/97	3600	660	700	8260	310	0
ABRERA-3	26/06/97	3730	520	1000	10212	300	10
ABRERA	22/04/97	15300	220	1750	7580	610	30
SJD-C	10/12/96	21500	4100	2400	4000	339	0
ABRERA-2	19/06/97	34700	34700	2000	29860	5400	0
SJD	16/12/96	37000	20000	400	5818	640	10
SJD	16/12/96	37000	20000	400	6636	700	20
SJD-B	05/06/97	91000	100000	4000	65250	8650	80
SJD-H	05/06/97	91000	100000	4000	78500	8775	20
SJD-I	05/06/97	91000	100000	4000	63250	9650	80
SJD-A	05/06/97	137000	64000	2000	90000	8275	20
SJD-G	05/06/97	137000	64000	2000	88250	8400	60

AGUA DE RÍO

<i>E. coli</i> cfp/100 ml	n	SOM % positivos	F-TOT % positivos	BfHSP % positivos
< 2000	11	54.5	36.4	18.2
> 2000	13	100	100	69.2

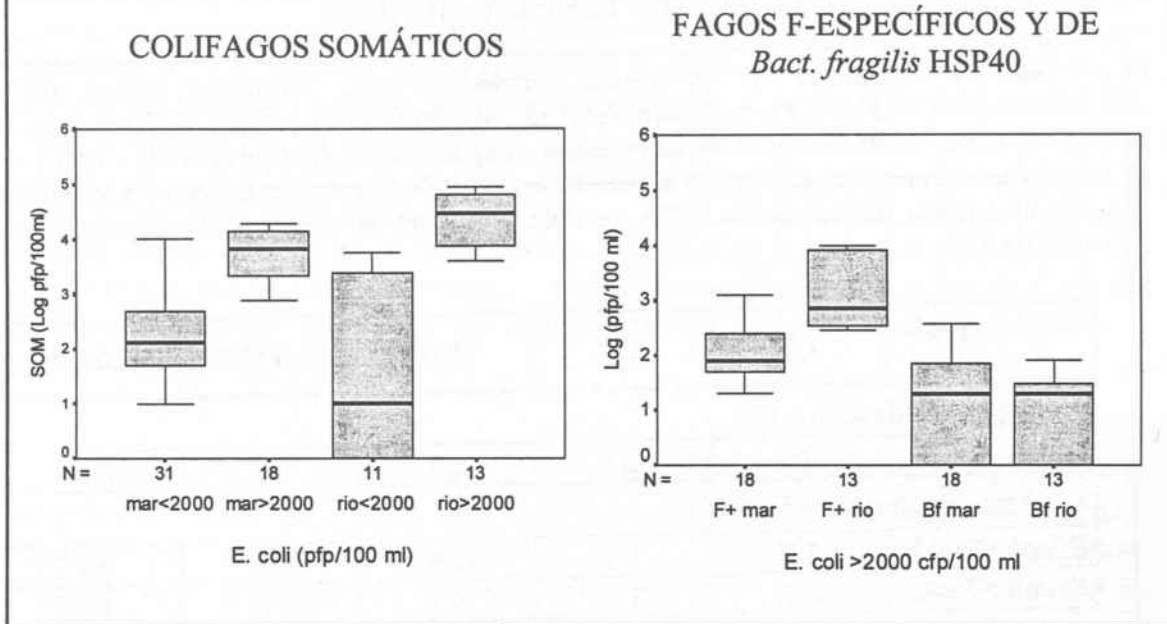
- SOM: colifagos somáticos detectados con la cepa WG5 de *E. coli* (excepto en 1996 que se utilizaba la cepa CN13); F-TOT: bacteriófagos F-específicos detectados con la cepa *S. typhimurium* WG49 sin la utilización de RNasa; BfHSP: fagos de *Bacteroides fragilis* HSP40.
- Cuando una celda de la tabla aparece en blanco, no se dispone del dato correspondiente.
- Los valores 0 significa que estamos por debajo del límite de detección. Para bacteriófagos analizamos 10 ml por muestra (1 ml por placa) y no se observó ninguna calva. El valor 0 de una celda sería equivalente a <10 / 100 ml. para todos los parámetros microbiológicos presentados.
- Algunos datos de bacteriología han sido cedidos amablemente por M. Cerdá y J. Dellundé, miembros de nuestro grupo de investigación.

Figura 3.2. Representación en diagrama de cajas de la distribución de bacteriófagos e indicadores bacterianos en diferentes muestras ambientales. Estudios preliminares.



La Figura 3.2 exhibe la distribución en diagrama de cajas de los microorganismos detectados en muestras de agua marina de Barcelona y ríos Llobregat y Ter. Los valores 0 de las tablas 3.2 y 3.3 se han sustituido por 1 para calcular la media de los logaritmos por tanto, hemos de tener en cuenta que la media geométrica de los fagos F-específicos y de *Bacteroides* en aguas relativamente limpias no es muy precisa debido al alto porcentaje de muestras negativas. Así, se observa que la dispersión de resultados en zonas con poca contaminación es grande mientras que en zonas no aptas para el baño la desviación típica de los resultados es menor, tal y como también demuestran los resultados de los descriptores estadísticos (datos no mostrados).

Figura 3.3. Comparación en el mismo gráfico de los niveles de colifagos somáticos en cada uno de los ambientes acuáticos presentados en la Figura 3.2. Comparación de los niveles de fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 en mar y río en muestras con >2000 cfp/100 ml de *E. coli*.



En el primer gráfico de la Figura 3.3 se comparan los niveles de colifagos somáticos en aguas de mar y río con poca y mucha contaminación; el segundo diagrama de cajas sugiere que en muestras con alto grado de polución los valores medios de fagos de *Bacteroides* son del mismo orden de magnitud en los dos tipos de muestras mientras que la media geométrica de fagos F-específicos en agua de río es más de un logaritmo superior a la media en agua de mar. En conjunto, las muestras con niveles de *E. coli* >2000 cfp/100 ml señalan una menor dispersión de los resultados de colifagos somáticos en comparación con los grupos de fagos F-específicos y de *Bacteroides*.

3.1.1.2.1 Origen de la contaminación y fenómenos de dilución.

Hay una clara percepción del problema que representa para la salud pública la descarga de agua residual o efluentes a las aguas superficiales; la utilización del agua para fines recreativos, para su consumo o para cultivo de marisco impone una demanda creciente sobre los sistemas de tratamiento de agua residual y, por tanto, un control rutinario efectivo es un prerequisite para formular políticas y restricciones con relación a la utilización del agua y descargas de agua residual. Los virus y otros microorganismos patógenos liberados del intestino a las heces pueden ser transportados por el sistema de aguas residuales y podrían acabar en el agua recreativa (Rao and Melnick, 1986). La cuestión crítica es si estos patógenos pueden sobrevivir por mucho tiempo y en concentraciones suficientes para causar enfermedad en individuos que utilizan estas aguas. Con el propósito de analizar dichas aguas para la determinación de

la contaminación fecal, en los laboratorios de rutina se utilizan microorganismos indicadores pues la detección directa del patógeno es más costosa en el ámbito económico, técnico y temporal.

Nosotros hemos observado los datos directos que obtuvimos en estudios preliminares de muestras de agua superficial (presentados en el apartado 3.1.1.2) con relación a los resultados de agua residual a la entrada de una planta depuradora de la provincia de Barcelona publicados por Lasobras y col. (1999).

Tabla 3.4. Logaritmo de las medias geométricas para coliformes fecales (CF), estreptococos fecales (EF), fagos somáticos (SOM), fagos F-específicos (F-TOT) y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 (BfHSP) de muestras de agua residual (Lasobras *et al.*, 1999) y de muestras marinas y de agua dulce analizadas en el periodo experimental de nuestro estudio por el método directo de la doble capa de agar para la enumeración de fagos (sin concentrar).

Log ₁₀ (cfp/pfp en 100 ml)	CF	EF	SOM	F-TOT	BfHSP
• Agua residual (n= 16)					
Lasobras <i>et al</i> (1999)	7.4	6.1	5.7	4.9	3.4
• Agua de mar (n= 31 + 18)					
<i>E. coli</i> <2000	1.7	1.3	2.0	0.3	0.1
<i>E. coli</i> >2000	4.2	3.0	3.7	1.9	1.1
• Agua de río (n= 11 + 13)					
<i>E. coli</i> <2000	1.3	0.8	1.5	0.7	0.2
<i>E. coli</i> >2000	4.5	4.0	4.3	3.2	1.0

Tabla 3.5. Reducciones logarítmicas de distintos parámetros microbiológicos a partir de los valores encontrados en agua residual urbana.

Log ₁₀ (cfp/pfp en 100 ml)	CF	EF	SOM	F-TOT	BfHSP
Residual	7.4	6.1	5.7	4.9	3.4
• Reducción de 3 logaritmos					
Log ₁₀	4.4	3.1	2.7	1.9	0.4
cfp/pfp en 100 ml	25119	1259	501	79	<u>2.5</u>
• Reducción de 4.1 logaritmos					
Log ₁₀	3.3	2	1.6	0.8	0.7
cfp/pfp en 100 ml	1995	100	40	<u>6</u>	<u>0.2</u>
• Reducción de 5 logaritmos					
Log ₁₀	2.4	1.1	0.7	-0.1	-1.6
cfp/pfp en 100 ml	251	13	<u>5</u>	<u>0.79</u>	<u>0.03</u>

Tal y como muestra la Tabla 3.4, el logaritmo de coliformes fecales en agua residual oscila alrededor de 7.4. Si imaginamos que este agua se vierte directamente al río o al mar, para que la calidad del agua de baño que recibe la contaminación cumpla los valores imperativos de la Directiva, se requiere un factor de dilución de al menos 4.1 logaritmos. La Tabla 3.5 pone de manifiesto que una reducción de 4 ó 5 logaritmos respecto al agua residual sitúa el nivel de bacteriófagos por debajo del límite de detección que es de 10 pfp en 100 ml (datos en negrita y subrayados). Por tanto, para saber si en estos ambientes acuáticos ha habido fenómenos de dilución y/o inactivación diferencial de los distintos microorganismos necesitamos ganar sensibilidad en el método de detección y cuantificación de bacteriófagos. A partir de las tablas 3.4 y 3.5, podemos calcular que en las muestras de mar polucionadas las reducciones logarítmicas respecto al agua residual de *E. coli*, estreptococos, colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* han sido de 3.2, 3.1, 2.0, 3.0 y 2.3 respectivamente; de igual forma, en agua de río contaminada encontramos reducciones de 3.0, 2.0, 1.4, 1.7 y 2.4 para los parámetros anteriores. Aunque aún es pronto para sacar conclusiones de estos resultados, apuntamos un comportamiento diferenciado entre bacterias y bacteriófagos en el medio ambiente.

Después de una breve revisión de estudios de bacteriófagos en aguas recreativas de distintas zonas del mundo (apartado 3.1.1.1) y de los resultados preliminares obtenidos de nuestros análisis (apartado 3.1.1.2) comprobamos que en ambientes acuáticos poco contaminados los fagos están presentes en número tan bajo que en muchos casos no pueden ser detectados por análisis directo de las muestras. Para estudiar la ecología de los fagos necesitamos ganar sensibilidad en los métodos de detección y cuantificación. Todas las observaciones referidas en esta sección de antecedentes (3.1.1) ponen de manifiesto la necesidad de concentrar bacteriófagos en muestras naturales.

3.1.2 MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE VIRUS DEL MEDIO HÍDRICO

La biología de los bacteriófagos empezó a ser ampliamente estudiada a partir de los años 30 pero a finales de los años 70 todavía se conocía poco sobre los números de diferentes bacteriófagos presentes en los hábitats acuáticos y de los factores que influyen sobre su supervivencia, distribución, multiplicación en el ambiente y los efectos que ellos ejercen sobre las poblaciones de sus células huésped. El mayor factor contribuidor de esta limitación de conocimiento había sido la falta de disponibilidad de un método simple para llevar a cabo trabajo cuantitativo cuando los fagos están presentes en números bajos en el agua natural (Primrose and Day, 1977; Goyal *et al.*, 1980; Seeley and Primrose, 1982). Primrose y Day (1977) ya apuntaban la aplicación de técnicas sencillas de concentración de fagos para estudios de contaminación del agua pues, por ejemplo, la enumeración de colifagos podía ser un método rápido de analizar la calidad del agua porque se conseguían resultados entre 4 y 6 horas después de titular la muestra concentrada. A partir de los 80, son numerosos en la literatura los trabajos en los que se evalúa la eficiencia de recuperación de diferentes métodos de concentración aplicados al estudio de bacteriófagos (Bitton *et al.*, 1981; Seeley and Primrose, 1982; Singh and Gerba, 1983; Schulze and Lenk, 1983; Farrah and Preston, 1985; Shields and Farrah, 1986; Armon *et al.*, 1987; Goyal, 1987; Preston *et al.*, 1988; Sobsey *et al.*, 1990;

Borrego *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 1991; Alonso *et al.*, 1994; Wommack *et al.*, 1995; Erb *et al.*, 1995; Lucena *et al.*, 1995; Sinton *et al.*, 1996; Jothikumar and Cliver, 1997; Li *et al.*, 1998).

Muchos de los procedimientos disponibles para la concentración de bacteriófagos son adaptaciones de prácticas ya utilizadas en el análisis de virus animales y humanos. Así, en este apartado nos referiremos a métodos utilizados en la concentración de virus en general a partir del agua.

Los métodos de concentración y de extracción de los virus a partir del agua y sedimentos se basan en las propiedades como macromoléculas proteicas virales. En efecto, ciertas estructuras proteicas confieren a los virus, dentro del medio acuático, las propiedades de un coloide hidrófilo de carácter anfótero donde la carga eléctrica varía en función del pH y de la fuerza iónica del medio. Así, los virus son susceptibles de adsorberse y de separarse fácilmente de diferentes soportes cargados positivamente o negativamente en función del pH. Los virus también pueden ser sedimentados en función de su peso molecular como en el caso de la ultracentrifugación.

- ✓ Un buen método de concentración debería responder a varios criterios:
 - simplicidad,
 - rapidez,
 - rendimiento elevado,
 - sensibilidad,
 - tasa de concentración elevada,
 - aplicación a diferentes tipos de virus,
 - producción de un concentrado que pueda ser utilizado en los sistemas de revelado de los virus,
 - coste reducido.
- ✓ Un método de concentración deberá ser escogido en función de múltiples factores:
 - la densidad vírica,
 - el tipo de agua,
 - el tipo de virus.

Las numerosas aproximaciones utilizadas para la concentración de virus contenidos en muestras de agua podrían separarse en dos categorías fundamentales: los métodos basados en fenómenos de adsorción/elución y los métodos no basados en fenómenos de adsorción/elución sino en otras propiedades físicas, químicas y/o biológicas inherentes a las propias partículas víricas. Podemos encontrar una amplia revisión de métodos de concentración, estudios comparativos y referencias a publicaciones sobre métodos de concentración de virus en la tesis doctoral de F. Ribas (1991) y en Lucena y col. (1991).

3.1.2.1 Métodos no basados en fenómenos de adsorción-elución

□ Técnicas basadas en la carga eléctrica de los virus

En relación con su carácter nucleoproteico, los virus tienen un comportamiento anfótero, lo cual implica que a pH situado por debajo de su punto isoelectrico (en la mayor parte de los virus inferior a 7) están cargados positivamente y a pH superior a él tienen carga negativa. Esta propiedad, además de ser una de las causas principales de su capacidad de adsorción a diferentes tipos de soporte, se ha utilizado para técnicas de concentración como la electroforesis a flujo forzado y la electroosmosis. Estos métodos se basan en la capacidad de migración de los virus en un campo eléctrico. La utilización de una membrana de diálisis permite la adsorción de los virus, que se recuperan por inversión de la corriente. La adición de una solución de electrolito de alto peso molecular del lado opuesto a la suspensión vírica crea, además, una presión osmótica que acelera la filtración del agua. Se trata de métodos simples que, al permitir caudales muy bajos, son más aplicables para reconcentración.

□ Técnicas basadas en el tamaño de los virus

Los virus tienen pequeñas dimensiones que, en el caso de los enterovirus, se sitúan entre los 20-30 nm. Esto implica que para su retención mecánica se precisen filtros cuyos poros sean de tamaño inferior al de la partícula vírica y en esto se basa la ultrafiltración. Se han empleado diversas modalidades: sobre ultrafiltros solubles de alginato, con circulación tangencial continua, bajo presión u osmosis, esta última a veces combinada con hidroextracción. Se trata en general de métodos de gran sensibilidad, aunque la colmatación de los filtros puede ser rápida y el caudal de filtración pequeño. Estas dificultades pueden superarse en parte con el empleo de membranas de gran superficie con alta presión, pero en general su uso se circunscribe a la reconcentración o a la concentración de muestras que casi podrían inocularse directamente.

Las membranas de ultrafiltración, a diferencia de las de microfiltración, no se definen por un tamaño de poro sino por los pesos moleculares que retienen y dejan pasar.

□ Técnicas basadas en el peso de las partículas víricas

Los virus sedimentan en función de su peso, siendo posible aumentar su capacidad de sedimentación intensificando la fuerza gravitatoria que actúa sobre ellos con una fuerza centrífuga y en esto se basan las técnicas de ultracentrifugación. Esta técnica de concentración se limita a pequeños volúmenes o a la reconcentración.

□ Técnicas basadas en la solubilidad y estabilidad de las partículas víricas

Los virus en el medio acuático se comportan como biocoloides hidrófilos en suspensión. La solubilidad aumenta cuando decrece la concentración de hidrogeniones, mientras que las fuertes concentraciones iónicas la disminuyen y provocan la precipitación y tienden a aumentar su agregación. También producen precipitación ciertos cationes orgánicos como las protaminas (en particular, el sulfato de protamina).

La desestabilización de las partículas víricas coloidales se produce por la adición de sales polivalentes, es decir, coagulantes como las sales de aluminio, el cloruro férrico, etc.

Diversos autores han estudiado la concentración de virus en el agua por precipitación y coagulación-floculación, seguida o no de una débil centrifugación. Otras técnicas se basan en la adsorción de los virus a precipitados que se forman previamente. De este modo, se ha usado la precipitación por sulfato amónico (aplicada a menudo en los concentrados obtenidos con extracto de carne), por cloruro de cobalto, por sulfato de protamina, coagulación-floculación por sulfato de aluminio, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, cloruro férrico, hidróxido férrico, hidróxido de magnesio y fosfato cálcico.

Estos métodos, simples y de eficacia muy variada, se utilizan más bien como segunda etapa de concentración.

□ Técnicas basadas en la polaridad de los virus

La polaridad de los virus explica tanto la inmiscibilidad de las partículas víricas en los disolventes orgánicos como, para los virus que no tienen envoltura lipídica (caso de enterovirus y rotavirus), su resistencia a la acción de esas sustancias: éter dietílico, n-butanol, cloroformo, fluorocarbono. En función de esta polaridad, las partículas víricas son susceptibles de un reparto entre dos fase líquidas inmiscibles y su interfase, reparto que depende de su tamaño y de las propiedades de superficie. Ciertas macromoléculas, tales como el sulfato de dextrano o el polietilenglicol en solución acuosa, mezclados en concentraciones bien definidas con la muestra, proporcionan, tras agitación y decantación, un sistema de dos fases. En razón de su tamaño, los virus se reparten en la fase inferior y en la interfase de la mezcla.

Se trata de métodos simples y económicos, pero muy lentos, limitados en general a pequeños volúmenes de agua, por lo que sólo resultan indicados para aguas muy contaminadas o como método de reconcentración.

Por otro lado, las técnicas de flotación, basadas en la adsorción en la interfase gas-solución, y electroflotación (producción de burbujas por electrólisis) se han usado para la separación de bacterias y algas pero muy poco para la de virus.

□ Técnicas basadas en la resistencia a bajas temperaturas

Una importante característica de los virus es su resistencia a las temperaturas bajas, incluso muy bajas. No en vano la mejor manera de conservar suspensiones víricas durante períodos prolongados es el congelador a temperaturas de hasta -80°C . Si se combina esta propiedad de los virus con la congelación de un líquido acuoso, que provoca la formación de un nuevo sistema de fases, líquida y sólida, se observa que las moléculas orgánicas se concentran en la fase de equilibrio entre ambas fases, en la fase líquida no congelada. De ahí la utilidad teórica de la congelación para la detección de partículas víricas presentes en el agua. En la práctica esta técnica se ha utilizado poco para concentrar virus.

□ Técnicas basadas en las propiedades antigénicas de los virus

La cromatografía de afinidad es el proceso por el cual los virus son retenidos durante el paso de la muestra de agua a través de una columna de partículas de gel polisacárido las cuales llevan unidos covalentemente anticuerpos que reconocen específicamente y unen un tipo particular de virus. Los virus son liberados de la columna por alteraciones en la composición o fuerza iónica del fluido tampón utilizado para el mantenimiento de la hidratación del gel polisacárido.

3.1.2.2 Técnicas basadas en fenómenos de adsorción

□ Adsorción pasiva

El método de las gasas flotantes utiliza la propiedad que posee la gasa hidrófila de retener los materiales en suspensión dentro del agua cuando es atravesada por una corriente de agua. Este proceso continúa con la expresión de los fluidos atrapados, ya sea con o sin la utilización de una solución eluyente para recuperar los virus. Simple y económico, este método no permite una aproximación cuantitativa dado que se desconoce el caudal de agua que ha circulado a través de la gasa.

□ Adsorción directa

El principio de los métodos de adsorción-elución se basa en la capacidad de los virus de fijarse a diversos soportes y después ser desenganchados al variar las condiciones electroquímicas. Esta propiedad a dado lugar al desarrollo de métodos importantes tanto por el número, la diversidad, como por los resultados obtenidos. De forma general, para todas estas técnicas, la composición química de los soportes, las condiciones de fuerza iónica, el pH, la presencia de materia orgánica o de proteínas, juegan un papel fundamental en la adsorción y elución de los virus. Existe actualmente toda una gama de soportes tales como las membranas y cartuchos filtrantes cargados negativamente o positivamente, polvo de vidrio, lana de vidrio, diversas sales metálicas como óxido de hierro, fosfato cálcico, hidróxido de aluminio, polielectrolitos insolubles, silicatos minerales, carbón activo así como diversos soportes biológicos. Después de la fijación a estos soportes, los virus son desprendidos por elución con la ayuda de toda una serie de soluciones eluyentes proteicas o no, en general a pH alcalinos. Las soluciones eluyentes más comúnmente utilizadas son las soluciones de extracto de carne y tampón glicina a pH situados entre 9.0 y 11.0.

Estas técnicas son cuantitativas, relativamente eficaces y sensibles. Son actualmente las más comúnmente utilizadas para la concentración de virus del agua. Además, las técnicas de adsorción-elución a filtros con tamaño de poro de micrómetros han tenido mayor aplicación que cualquier otro método debido a su posibilidad de procesar grandes volúmenes de agua (hasta 1000 litros) de una amplia variedad de calidades.

↳ **Explicación teórica de la adsorción directa, elución y reconcentración.**

La adsorción directa generalmente ha sustituido otras técnicas de concentración utilizadas en la recuperación de virus a partir de volúmenes grandes de agua. Los diferentes tipos de sólidos adsorbentes que se han utilizado con éxito pueden ser divididos en dos grupos, filtros y sólidos granulares. Los tipos de filtros que han sido probados están compuestos de fibras de hilo enrolladas alrededor de un centro hueco para formar un cartucho de filtración en profundidad, materiales de filtro en hoja configurados bien como capas planas o como cartuchos compuestos de hojas plegadas de material filtrante, y cartuchos preparados como tubos huecos de material filtrante. Los virus se adsorben en la matriz del filtro durante el paso de las muestras de agua que contienen virus a través de estos filtros. Los virus adsorbidos son normalmente recuperados por el paso siguiente del eluyente a través de los filtros o por disolución del filtro si está compuesto de alginato. Los sólidos granulares generalmente son utilizados como adsorbentes virales en una de estas tres modalidades: utilización por lotes, donde los gránulos son mezclados dentro de la muestra de agua y después recuperados utilizando filtración o atracción magnética, requiriendo esta última que los gránulos sean magnéticos; como capas de gránulos soportados sobre o entre medio de hojas de material filtrante plano no adsorbente de virus a través del que pasa la muestra de agua; o como columnas o lechos fluidizados de gránulos expuestos a la muestra de agua utilizando una configuración de flujo a través. La subsiguiente desadsorción de los virus a partir de los sólidos granulares tiene lugar durante la exposición de los gránulos a un eluyente, utilizando una de estas tres modalidades.

De los muchos tipos y configuraciones diferentes de adsorbentes de virus, aquellos que parecen ser preferidos para la utilización en la recuperación de virus a partir de grandes volúmenes de agua son los filtros en cartucho de fibras enrolladas, filtros en cartucho de membranas plegadas compuestos de microfibras de vidrio o nailon, incluyendo otros materiales filtrantes en hoja modificados para tener una carga más electropositiva, y columnas de polvo de vidrio. El método del polvo de vidrio evita el problema de colmatación física de los filtros aunque estos últimos ofrecen la ventaja sobre las columnas de polvo de vidrio de que son fácilmente transportables al campo.

La adsorción de los virus sobre los filtros, y presumiblemente también sobre otros sólidos adsorbentes, está gobernada por interacciones electrostáticas, las cuales predominan a niveles de pH bajos, e interacciones hidrofóbicas, que predominan a altos niveles de pH. La composición química del adsorbente sólido y el fluido en el cual están suspendidos los virus influenciará en gran medida sobre la atracción o repulsión que tendrá lugar entre los virus y el adsorbente. Otros dos factores importantes relacionados con la adsorción de virus del agua incluyen la proximidad relativa y tiempo de contacto permitido entre el adsorbente y los virus en la muestra de agua. Estos últimos factores están influenciados por (i) la tasa a la cual la muestra de agua fluye tangencialmente o a través del sólido adsorbente y (ii) la relación del diámetro de la partícula vírica frente al diámetro de los poros en el material adsorbente a través del cual el agua puede pasar. La adsorción de virus puede ser inhibida por la presencia de proteínas añadidas en la suspensión vírica, posiblemente como resultado de la competición entre las proteínas y los virus por los lugares de adsorción existentes en la superficie de la matriz sólida. Otros tipos de materiales orgánicos solubles tales como ácidos húmicos y fúlvicos pueden también interferir con la adsorción de virus. En el intento de facilitar la adsorción de virus a matrices sólidas se incluye la eliminación de materiales orgánicos

disueltos de las muestras de agua por el pase del agua a través de una columna de resina y adición de sales, incluyendo cloruros de sodio, magnesio, o de forma más efectiva, aluminio. La adsorción de virus a filtros puede ser también facilitada ajustando (normalmente disminuyendo) el pH de la muestra de agua, un proceso que puede realizarse añadiendo HCl bien en una operación por lotes o utilizando un inyector en línea configurado antes del filtro. Un pH de aproximadamente 3.5 a 4.0 parece adecuado con filtros cargados negativamente, mientras que para los filtros cargados positivamente parece preferible un pH próximo a la neutralidad.

El proceso de adsorción es reversible, y este proceso reverso se conoce como elución. La elución se lleva a cabo por exposición del adsorbente a una solución acuosa denominada eluyente, después de la cual el eluyente se denomina eluato y contiene al menos algunos de los virus que habían sido adsorbidos a la matriz sólida. Los eluyentes pueden ser divididos en al menos dos categorías en función de su forma de acción. La primera categoría consiste en materiales proteicos que simplemente compiten con las proteínas de las partículas víricas por los lugares de unión en el adsorbente; la segunda categoría consiste en compuestos que alteran los mecanismos de adsorción. Dentro de la primera categoría, el extracto de carne de vaca es el material eluyente más ampliamente utilizado actualmente. La segunda categoría de eluyentes incluye soluciones que contienen varias sustancias activas, entre las que se encuentran agentes caotrópicos* como la glicina o el ácido tricloroacético, detergentes como el Tween 80, y el EDTA como agente quelante para cationes metálicos. Ambos tipos de eluyente pueden ser utilizados a pH elevados, lo que ayudará a disminuir la atracción electrostática entre los virus y los adsorbentes. Generalmente, este primer eluato obtenido es reducido en volumen por una técnica de concentración secundaria antes de analizar la presencia de virus. Cuando en la primera etapa de concentración se han utilizado eluyentes que contienen extracto de carne, la concentración secundaria acostumbra a ser la floculación orgánica introducida por Katzenelson y col. (1976), llevada a cabo por disminución del pH del eluato, donde el material proteico precipita espontáneamente. Los virus contenidos en el extracto de carne quedan asociados con este precipitado que puede ser recogido por centrifugación y disuelto en una pequeña cantidad de tampón salino de pH más elevado tal como fosfato sódico o glicina. El pH óptimo para llevar a cabo la floculación orgánica con extracto de carne es de aproximadamente 3.5.

***NOTA:**

Los agentes caotrópicos “desordenan la estructura del agua”; son detergentes (Tween 80, NP40, urea), iones grandes (Cl_3COO^- , SCN^- ...) o etanol, que favorecen la solubilización de sustancias hidrofóbicas (Wait and Sobsey, 1983). Los compuestos caotrópicos han mostrado ser efectivos como eluyentes de virus adsorbidos a filtros de membrana y sedimentos acuáticos debido a que disminuyen las fuerzas hidrofóbicas entre las partículas víricas y los soportes sólidos (Farrah *et al.*, 1981).

Los agentes anticaotrópicos “ordenan la estructura del agua”; son iones pequeños (F^- , H_2PO_4^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} ...) que favorecen la adsorción de virus a filtros de membrana facilitando las interacciones hidrofóbicas. Así, la adición de sales catiónicas y/o disminución del pH, disminuyen la electronegatividad y aumentan las fuerzas de Van der Waals.

3.1.2.3 Detección de bacteriófagos en volúmenes de 100 ml y superiores.

En la Tabla 3.6 aparecen algunos de los métodos que se han probado para la concentración de bacteriófagos en ambientes acuáticos junto a las principales ventajas y desventajas que ofrecen cada una de las técnicas relacionadas.

El método más clásico de aislamiento de bacteriófagos es el de mezclar cultivos en crecimiento de la bacteria huésped con un inóculo que se espera que contenga fagos. Después de un período de crecimiento apropiado, las células se eliminan y el líquido del cultivo se analiza para fagos (Guelin, 1957). La mayoría de fagos aislados de ambientes acuáticos han sido obtenidos de esta forma utilizando una variedad de huéspedes específicos. Se han descrito algunas variaciones de esta técnica básica de enriquecimiento. Por ejemplo, adición de cultivos de *Azotobacter* al suelo para enriquecer fagos “*in situ*” (Bishop *et al.*, 1977), aislamiento secuencial de fagos a partir de mezclas de fagos utilizando filtros de membrana en serie (Grant, 1973) o test rápido de presencia/ausencia de bacteriófagos fecales en agua de bebida (Armon and Kott, 1993). Todas las técnicas de enriquecimiento presentan tres limitaciones básicas:

- No son cuantitativas, por tanto son de valor limitado para estudios de ecología de fagos, o donde los fagos se han de utilizar como trazadores del movimiento del agua o como indicadores de calidad del agua.
- Los métodos sólo funcionan si los fagos que se están buscando están presentes en el inóculo. Así, el enriquecimiento rara vez falla para colifagos pero en numerosas ocasiones ha fracasado al intentar aislar fagos de muchos otros géneros.
- Cuando están presentes diferentes fagos de un huésped particular en el inóculo, el más vigoroso será predominante. Si se buscan fagos raros o menos productivos su presencia puede ser enmascarada por el sobrecrecimiento.

En cualquier caso, estos métodos son adecuados para el aislamiento de pocos fagos de huéspedes particulares y se consideran técnicas sensibles. En los experimentos de enriquecimiento, se asume que la presencia de una partícula infecciosa en un volumen dado dará un enriquecimiento positivo para dicho volumen. Se concluye que los tests presencia/ausencia basados en enriquecimiento proporcionan buenas recuperaciones aunque no aportan información cuantitativa (Armon and Kott, 1993; Lucena *et al.*, 1995).

Además de los métodos de concentración relacionados en la Tabla 3.6, se han desarrollado o mejorado otros métodos basados en el mismo tipo de técnicas básicas. Por ejemplo, Sobsey y col (1990) ponen a punto un método de filtración simple para concentrar y enumerar colifagos F-específicos de RNA. La muestra de agua se suplementa con iones magnesio y se pasa a través de un filtro de ésteres de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro. El filtro con los fagos adsorbidos no se eluye sino que se coloca boca abajo sobre un césped de la bacteria huésped en un medio estándar suplementado con Tween 80 y violeta tetrazolium. Esta técnica es adaptada para la detección de colifagos somáticos por Alonso y col. (1994) que obtienen una recuperación media de 68.9 % similar a la obtenida por Sobsey y col. en las mismas condiciones experimentales. Paul y col. (1991) adaptan la tecnología de filtración en

flujo vórtice (VFF: “*vortex flow filtration*”) para concentrar simultáneamente virus y DNA libre (soluble) de ambientes acuáticos. Los métodos que se basan en la ultrafiltración para concentrar virus se utilizan principalmente para estudios ecológicos (Wommack *et al.*, 1995).

Tabla 3.6. Aplicación de métodos de concentración de virus en aguas al estudio de bacteriófagos.

TÉCNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS	Referencia*
• Método biológico			
Enriquecimiento	-Simple, -excelente para pocos fagos y para pocos huéspedes específicos.	-Son aislados sólo los fagos mejor adaptados a las condiciones del enriquecimiento, -cualitativo, -requiere gran cantidad de medio.	Guélin, 1957
• Métodos físicos			
Hidroextracción en polietilenglicol (Deshidratación por diálisis)	-No selectivo, -simple.	-Volúmenes pequeños de muestra, -requiere gran cantidad de material, -procesamiento lento.	Padan <i>et al.</i> , 1967
Ultrafiltración	-No selectivo, -simple, -adecuado para estudios ecológicos.	-Muy lento, a menos que se utilice equipo caro, -el material en suspensión en aguas naturales bloquea la mayoría de filtros.	Seeley and Primrose, 1979
Ultra-centrifugación	-No selectivo, -rápido.	-Volúmenes pequeños de muestra, -equipo caro, -inadecuado para trabajo de campo.	Metcalf, 1975
• Métodos físico-químicos			
Separación en dos fases por polímero (precipitación con PEG)	-Simple.	-Utiliza grandes cantidades de material para muestras de tamaño pequeño, -lento, -más eficiente para una concentración inicial de fagos alta.	Yamamoto <i>et al.</i> , 1970
Adsorción a polielectrolito PE60	-Simple, -podría ser apropiado para grandes volúmenes y trabajo de campo en sistemas de flujo a través.	-Inestable, -se desconoce si es apropiada para diferentes tipos de fagos.	Sorber <i>et al.</i> , 1971

(Continúa)

Continuación Tabla 3.6. Métodos de concentración de virus.

TÉCNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS	Referencia*
Adsorción a fosfato cálcico (hidroxilapatita)	-Simple, -adecuada para trabajo de campo con agua limpia.	-Inadecuada para agua sucia o > 5 l por el lento procesamiento debido al empaquetamiento.	Primrose and Day, 1977
Adsorción a hidróxido de aluminio	-Simple.	-Tasas de flujo muy lentas en sistemas de flujo a través, -las sales de aluminio pueden causar inactivación rápida de algunos fagos.	Seeley and Primrose, 1979
Adsorción a talco-Celita	-Barata, -simple.	-Tasas de flujo muy bajas, -conveniencia desconocida para fagos.	Seeley and Primrose, 1982
Adsorción a polvo de vidrio	-Barata, -simple, -puede ser utilizada con agua natural, -grandes volúmenes.	-Utiliza cambios de pH extremos, -sólo adecuado para fagos muy estables.	Schwartzbrod and Lucena-Gutierrez, 1978
Adsorción a filtros microporo electronegativos	-Adecuado para trabajo de campo, -grandes volúmenes, -agua relativamente turbia, -válido para agua dulce y agua marina.	-Requiere acondicionar la muestra (ácido, iones di- o trivalentes), -recuperación selectiva para ciertos tipos de fagos.	Seeley and Primrose, 1979
Adsorción a filtros microporo electropositivos	-Adecuado para trabajo de campo, -adsorbe fagos a pH próximos a 7 -menos selectivo que los filtros electronegativos, -volúmenes muy grandes de muestra.	-Requerimiento de algún equipo especializado, -probablemente algo selectivo, -filtros relativamente caros, -eficacia discutible en muestras de agua marina.	Logan <i>et al.</i> , 1980 Goyal <i>et al.</i> , 1980

(Continúa)

De los métodos de concentración disponibles, hemos escogido los cuatro más ampliamente utilizados y referenciados por los estudiosos de los virus en el medio hídrico para comparar su complejidad técnica: adsorción/elución a filtros electropositivos, adsorción/elución a filtros electronegativos, floculación orgánica y ultrafiltración tangencial. En las figuras 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 se muestran de forma esquemática dichas metodologías.

Continuación Tabla 3.6. Métodos de concentración de virus.

TÉCNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS	Referencia*
Floculación orgánica de extracto de carne a pH 3.5	-Simple, -rápido,	-Selectivo a favor de los fagos más estables a pH ácido, -no adecuado para volúmenes superiores a 1 litro.	Seeley and Primrose, 1979
Floculación orgánica-magnética	-Simple, -adecuado para trabajo de campo.	-Volumen máximo 4 litros, -limitado a muestras altamente contaminadas.	Bitton <i>et al.</i> , 1981
Floculación por hidróxido de magnesio	-Simple, -barato, -equipo básico de laboratorio.	-Método adaptado a 1 litro.	Schulze and Lenk, 1983
Floculación en extracto de carne con sulfato amónico a pH 7	-Simple, -no se producen cambios bruscos de pH.	-No adecuado para grandes volúmenes,	Shields and Farrah, 1986

(*) Se referencian las primeras publicaciones que constatan la utilización de estos métodos en el estudio de bacteriófagos.

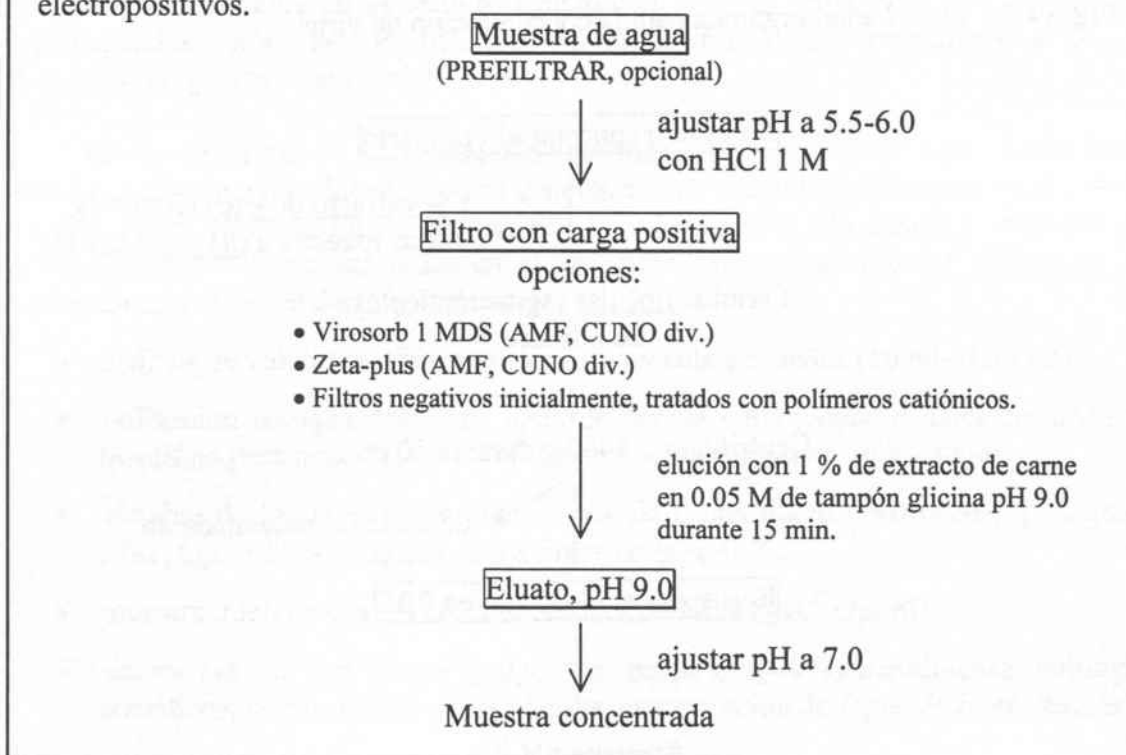
Figura 3.5. Concentración de virus a partir de agua dulce utilizando filtros electropositivos.

Figura 3.6. Esquema básico de la concentración de virus del medio acuático por adsorción a filtros electronegativos y posterior elución.

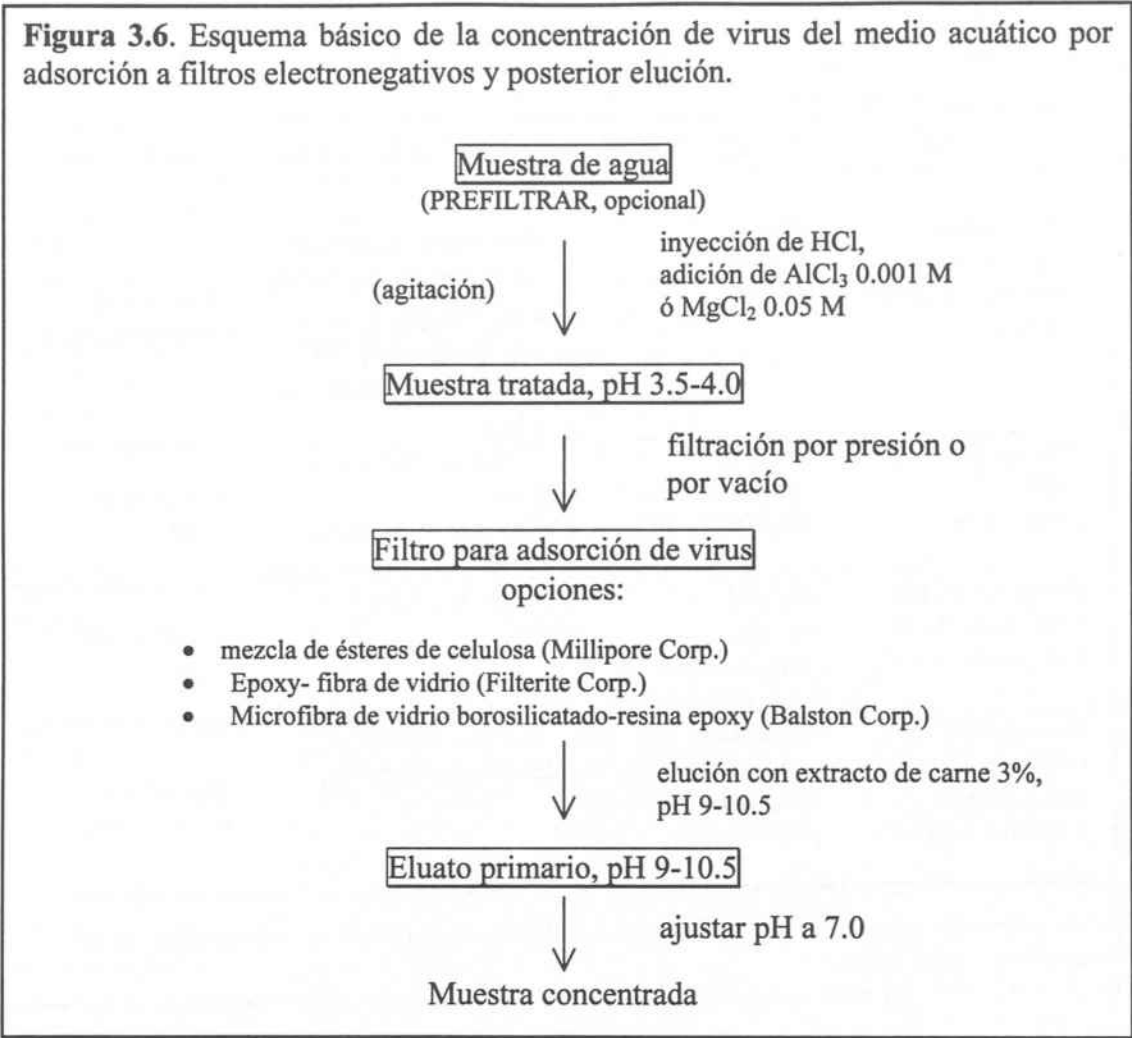


Figura 3.7 Floculación orgánica para la concentración de virus.

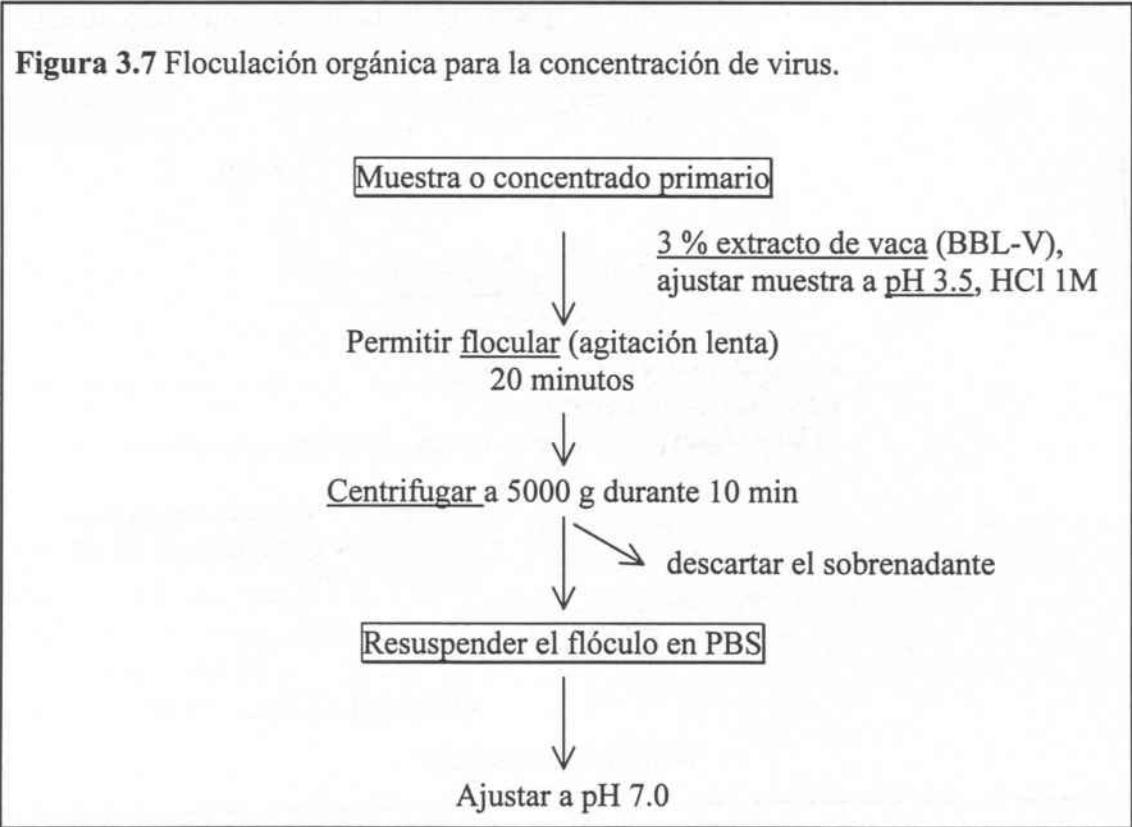
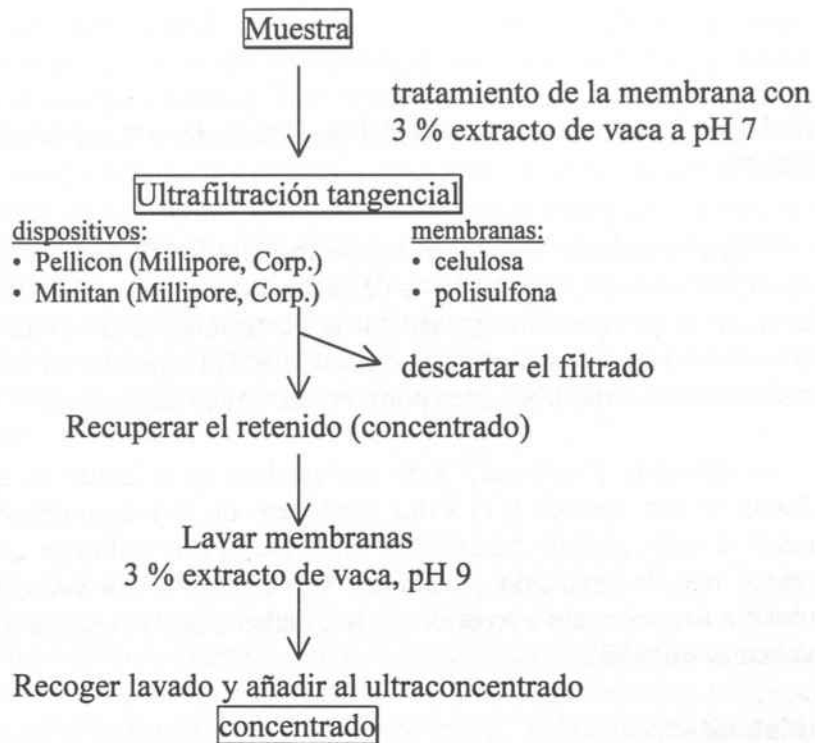


Figura 3.8. Procedimiento para la ultrafiltración y recuperación de virus de ambientes acuáticos.

Mantenimiento de las membranas: después de su utilización, pasar agua limpia, pasar solución limpiadora, determinación de la permeabilidad normalizada del agua y test de integridad. Guardar las membranas con solución de almacenamiento (Millipore Corp.).

Para concentrar virus de ambientes marinos y fluviales, comprobamos que las técnicas más factibles en el sentido económico y en el ámbito de laboratorios no especializados serían las de adsorción/elución a filtros electronegativos y las de floculación orgánica o inorgánica.

En la práctica, la concentración de fagos u otros virus bajo condiciones ambientales es menos eficiente que en condiciones de laboratorio (Borrego *et al.*, 1991; Lucena *et al.*, 1991). En el planteamiento experimental de muchos métodos de concentración de fagos valorados en el laboratorio podemos observar alguna de las limitaciones que se señalan a continuación:

- análisis de volúmenes de muestra relativamente pequeños (10 ml-1000 ml),
- utilización de agua destilada, agua de bebida embotellada o agua del grifo (y tiosulfato para neutralizar el cloro) para simular muestras ambientales,
- siembra de la muestra con algún stock de bacteriófago purificado (típicamente MS2, Q β , ϕ X174 o alguno de los fagos de la serie T),
- muestra inicial con altas concentraciones de virus ($\geq 10^4$ pfp/ml),
- valoración de un único grupo de bacteriófagos (generalmente colifagos somáticos; pocos métodos describen la concentración de fagos de *Bact. fragilis*).

Aún teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, es difícil simular las condiciones naturales en el laboratorio si se quieren obtener resultados fiables de eficiencias de recuperación.

3.1.2.4 Análisis de los métodos para la recuperación y ensayo de colifagos.

Después de la revisión anterior sobre métodos de concentración de virus a partir del agua, haremos un breve análisis de las características que debería cumplir un método válido para la recuperación y ensayo de bacteriófagos en análisis de rutina. También introduciremos algunos términos utilizados habitualmente en la caracterización de la calidad de las medidas obtenidas por métodos microbiológicos.

La exactitud (“*accuracy*”) de una medida es el grado de aproximación entre el resultado de una medida y el valor verdadero de la magnitud correspondiente y sería contraria al error global. Además, la exactitud podría definirse como el resultado de la veracidad más la precisión (“*trueness + precision*”). La veracidad o fiabilidad sería contraria a los errores sistemáticos y la precisión sería opuesta a los errores aleatorios (Havelaar *et al.*, 1992).

□ Fiabilidad.

La veracidad se valora a través de varios aspectos: eficiencia de recuperación, poder inhibitorio, sensibilidad y especificidad. En el caso que nos concierne, la sensibilidad del método define de qué forma todos los fagos de interés presentes en la muestra, son efectivamente recuperados y revelados. La especificidad o selectividad de un método es la habilidad para detectar los grupos diana de interés y relevancia y no detectar otros contaminantes que no son de interés o no son relevantes.

Los métodos para concentrar y detectar colifagos en el agua son generalmente fiables basándose en la eficiencia de recuperación. Esto es, recuperan colifagos con alta eficiencia y la variabilidad de la eficiencia de recuperación es comparativamente pequeña. La eficiencia de la detección directa de bacteriófagos por los métodos de ensayo en placa es alta, aproximadamente 1 unidad formadora de calva por virión o casi 100%. La eficiencia de recuperación por concentración a partir de grandes volúmenes de agua es más baja y depende del método. La concentración eficiente de colifagos a partir de aguas con baja turbidez por el método de filtro de membrana directo (Sobsey *et al.*, 1990) depende del volumen de agua analizada. Para un volumen de muestra de 300 ml la eficiencia de recuperación es 80% (rango 70-90%), para un volumen de muestra de 500 ml es aproximadamente 60% (rango 50-70%) y para un volumen de muestra de 1000 ml está sobre el 45% (rango 38-56%). Estos resultados sugieren que los métodos de concentración de colifagos son bastante fiables sobre la base de la sensibilidad (Sobsey, 1997).

En cuanto a la especificidad, utilizando las células huéspedes bacterianas más fiables, la detección y métodos de análisis para los colifagos F+ son bastante específicos en la detección de colifagos sólo F+ y mayoritariamente colifagos F+ RNA (Havelaar, 1993; Sobsey, 1997). Los colifagos F+ RNA parecen proceder solo de contaminación

fecal y no de ambientes no contaminados fecalmente. Además, el serotipado o genotipado de los colifagos F+ RNA dentro de los cuatro grupos a los que pertenecen puede hacer posible la distinción entre la contaminación fecal humana y la animal (Hsu *et al.*, 1995; Schaper and Jofre, 2000). Sin embargo, los colifagos somáticos pertenecen a varios grupos taxonómicos y por tanto son heterogéneos. Algunos colifagos somáticos pueden proceder de ambientes no fecales. Éste es un importante factor de incertidumbre en la fiabilidad de los colifagos somáticos para predecir o indicar contaminación fecal de las aguas superficiales. Podría ser posible la detección de sólo aquellos colifagos somáticos de origen fecal basándose en la elección de la célula huésped y la temperatura de crecimiento. La identificación taxonómica de los colifagos somáticos también sería útil en este esfuerzo. Por otro lado, los fagos que infectan a *Bact. fragilis* HSP40 son un grupo más homogéneo de virus bacterianos altamente específicos, pues parecen estar estrechamente relacionados con la contaminación fecal humana (Tartera, 1986; Jofre *et al.*, 1987; Puig-A, 1998) y por lo cual serían unos buenos candidatos a indicadores de virus entéricos humanos.

□ Precisión.

La precisión es la coincidencia entre sí, o repetibilidad, de un grupo de determinaciones del mismo parámetro realizadas en la misma muestra. Puede ser repetibilidad o precisión dentro del mismo lote (grupo de determinaciones realizadas en el mismo proceso) o determinaciones realizadas en la misma muestra en procesos diferentes, lo que indicará la precisión en días diferentes. Teóricamente la precisión dentro del mismo lote ha de ser superior a la que se obtenga con determinaciones analíticas realizadas en procesos distintos.

Replicabilidad, repetibilidad y reproducibilidad son términos que se suelen emplear como sinónimos pero hay pequeñas diferencias de matiz entre ellos (Sabater y Vilumara, 1988).

La replicabilidad es la precisión, generalmente expresada como una desviación estándar, que mide la variabilidad entre los parámetros repetidos y realizados en la misma serie analítica.

La repetibilidad puede definirse como la precisión, generalmente expresada como una desviación estándar, que mide la variabilidad entre resultados determinados a diferentes tiempos de la misma muestra y en el mismo laboratorio.

La reproducibilidad es la precisión, generalmente expresada como una desviación estándar, que mide la variabilidad entre resultados determinados en la misma muestra en diferentes laboratorios.

Así, un método de concentración debería de ser preciso, esto es, la desviación estándar como resultado del análisis por distintas personas de la misma muestra en el mismo laboratorio, debe ser pequeña. Además, el método debería ser reproducible en otros laboratorios del mundo con eficiencia similar.

❑ Complejidad técnica.

Los métodos de recuperación y ensayo de colifagos son solo ligeramente más complejos que aquellos utilizados para la recuperación y ensayo de bacterias indicadoras. La mayoría de laboratorios capaces de llevar a cabo análisis bacteriológico del agua son capaces de realizar análisis de colifagos del agua. Los métodos de concentración más fáciles de aplicar a este respecto son los de microfiltración en membrana así como los de floculación orgánica o precipitación por sales metálicas.

❑ Simplicidad, rapidez y coste.

Los métodos para detectar colifagos en el agua son suficientemente simples como para ser prácticos en el control rutinario o periódico y vigilancia. Además son rápidos y proporcionan resultados en el intervalo de 24 horas e incluso en 6-8 horas. Los métodos de detección de colifagos no son caros. Los métodos directos en placa son solo ligeramente superiores en coste a aquellos empleados en el análisis bacteriológico del agua. Los costes se incrementarían notablemente con la utilización de métodos sofisticados para la concentración como pueden ser la ultrafiltración o la ultracentrifugación.

3.1.3 OBJETIVOS

El objetivo encomendado por los responsables de un estudio más amplio de “Bacteriófagos en aguas de baño” (proyecto europeo STM4-CT95-1603), fue el ensayo de métodos simples y reproducibles para la concentración de bacteriófagos (sobretudo a partir de agua de mar) con el propósito de valorarlos y elegir el más conveniente para su utilización en el estudio de la ecología de fagos en diferentes laboratorios europeos.

El método de concentración debía responder a los siguientes requerimientos:

- Concentración de los tres grupos de bacteriófagos candidatos a microorganismos índice y/o indicadores de contaminación fecal y/o vírica (esto es, colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis*) con una sensibilidad similar.
- Válido tanto para aguas continentales como marinas.
- Aplicable a aguas de distintas calidades (diferentes grados de polución) y turbideces (material en suspensión variable).
- Fácilmente aplicable y reproducible en laboratorios de rutina y para estudios ecológicos: sencillo, coste reducido, no requiere personal especializado, no necesita mucha infraestructura.

Para la consecución de los requisitos relacionados anteriormente, indagamos en técnicas de adsorción-elución a membranas para microfiltración y en métodos de floculación orgánica e inorgánica.

PLAN DE TRABAJO

Durante esta etapa experimental en el laboratorio, trabajamos con muestras contaminadas de forma controlada con bacteriófagos de colección representantes de cada uno de los grupos de fagos propuestos como microorganismos modelo. Valoramos la tasa de concentración y el porcentaje de recuperación de distintas técnicas con el fin de seleccionar unos métodos eficientes y aplicarlos sobre el terreno.

⇒ Ensayo de métodos:

1. MICROFILTRACIÓN

- Filtros inorgánicos de óxido de aluminio de 0.2 μm y 0.1 μm de tamaño de poro.
- Filtros de celulosa modificados por precipitación "*in situ*" de hidróxidos férrico y aluminico.
- Filtros electropositivos Zeta Plus.
- Filtros de acetato/nitrato de celulosa de 0.2 μm .
- Filtros de nitrato de celulosa de 0.45 μm
- Prefiltros

Con las técnicas de microfiltración a menudo se hace necesario un paso previo de la muestra a través de prefiltros para evitar la obstrucción prematura de los filtros microporo con el material en suspensión o disuelto que puede encontrarse en las aguas naturales. Hemos probado distintos filtros en profundidad y mallas para prefiltrar: celulosa, nailon, fibra de vidrio y polipropileno.

2. FLOCULACIÓN

- Floculación orgánica a pH 3.5-4.0 con extracto de carne.
- Precipitación de extracto de carne con sulfato amónico a pH 7.
- Floculación por hidróxido de magnesio.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 PLANTEAMIENTO GENERAL SEGUIDO EN EL ESTUDIO DE MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN

3.2.1.1 Bacteriófagos modelos utilizados en los ensayos de concentración

La mayor parte de los experimentos para valorar el porcentaje de recuperación de los diferentes métodos en muestras contaminadas de forma controlada se han realizado con los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8.

MAR9 es un colifago somático aislado en *Escherichia coli* CN13 por M. Muniesa, miembro de nuestro grupo de investigación. Pertenece a la familia *Myoviridae*, bacteriófagos con cola contráctil y DNA de doble cadena, tiene cabeza isométrica y representa el tipo morfológico más abundante en agua residual recogida en Barcelona.

MS2, fago F-específico de RNA, es la especie tipo del género *Levivirus*, de la familia *Leviviridae*. Consiste en una cápside simple de simetría cúbica de 24 nm de diámetro y contiene una cadena sencilla de RNA como genoma (NCTC 12487 ó ATCC 15597-B1).

B40-8, seleccionado como organismo modelo porque su morfología es la más típica de los fagos que infectan a *Bacteroides fragilis* HSP40 en muestras ambientales (Tartera *et al.*, 1992). Pertenece a la familia *Siphoviridae*, tiene una cabeza icosaédrica isométrica (51 nm), que contiene DNA de doble cadena, y una cola larga (113 nm) no contráctil (Puig-M, 1998).

3.2.1.2 Dopaje de la muestra con stocks de bacteriófagos de laboratorio.

El tipo de muestras infectadas con bacteriófagos fueron:

- Agua de mar natural limpia.
- Agua de río limpia o autoclavada, según el caso.
- Agua de bebida embotellada.
- Agua de distribución a la que añadimos 1 ml de tiosulfato al 3% por litro de muestra para neutralizar el cloro.

Teníamos controlados en 3 botellas diferentes “stocks de trabajo” de los fagos MAR9, MS2 y B40-8, respectivamente, a una concentración de aproximadamente 10^5 pfp/ml en tampón para fagos que guardábamos a 4°C.

Para preparar la muestra de agua “problema” con la que trabajábamos, partíamos de las soluciones que contenían un bacteriófago modelo. Calculábamos el volumen necesario de stock que debíamos diluir en la muestra de agua para obtener la concentración de partículas fágicas deseada (10^1 - 10^3 pfp/ml).

Ejemplo:0.5 ml stock **MAR9** (3.2×10^5 pfp/ml)1 ml stock **B40-8** (4.3×10^4 pfp/ml)1 ml stock **MS2** (3.22×10^5 pfp/ml)

350 ml agua de mar

Agitación, 20 min.

Alícuota "directo"

Concentración teórica de bacteriófagos:

Concentración de fagos obtenida por
titulación directa (método DAL):

MAR9 = 457

MAR9 = 602

MS2 = 920

MS2 = 960

B40-8 = 123

B40-8 = 97

expresada en partículas formadoras de calvas por mililitro de muestra (pfp/ml).

3.2.1.3 Cálculo de los porcentajes de recuperación de un método de concentración.

El número de bacteriófagos teóricos en una muestra dopada no coincide exactamente con el número de bacteriófagos cuantificados experimentalmente, tal y como se ha visto en la sección anterior. Por esta razón, en los experimentos orientados a valorar los procesos de concentración con stocks de fagos, siempre se cuentan las partículas víricas en la muestra directa y después se cuentan en el concentrado. El porcentaje de recuperación se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{\text{pfp/ml conc} \times V \text{ conc}}{\text{pfp/ml dir} \times V \text{ total}} \times 100$$

pfp/ml conc	Partículas formadoras de calvas por mililitro de concentrado.
V conc	Volumen final, en mililitros, de concentrado.
pfp/ml dir	Partículas formadoras de calvas por mililitro titulado directamente de la muestra inicial.
V total	Volumen inicial de muestra directa que ha sido concentrada, en mililitros.

3.2.1.4 Planteamiento general

Los experimentos preliminares que llevamos a cabo tenían como objetivo escudriñar algunos métodos sencillos descritos en la literatura para la concentración de bacteriófagos. Igualmente examinamos si los concentrados obtenidos en nuestro laboratorio para la detección de enterovirus también eran válidos para la determinación de bacteriófagos que ocurren en las muestras naturales (esto es, filtros electropositivos y floculación orgánica). Esta última aproximación era una forma de aprovechar una metodología que ya funcionaba de forma rutinaria en nuestro laboratorio. En realidad, el desarrollo de un método de concentración adecuado para virus animales y bacterianos simplificaría los procesos de ensayo considerablemente.

Muchas de las pruebas de laboratorio se produjeron con stocks de bacteriófagos añadidos (MAR9, MS2 y B40-8) y volúmenes de 100 ml. En el siguiente apartado se expone la relación de estudios realizados, de filtración por un lado y de floculación por otro. Para cada método se señala: referencia de partida, procedimiento, tipos de agua examinada y modificaciones ensayadas.

Los requerimientos básicos para descartar un método o continuar con su estudio fueron:

- Porcentajes de recuperación aceptables para los tres bacteriófagos modelo.
- Eficacia similar en muestras marinas y de agua dulce.

Explorados diferentes métodos, finalmente se estudiaron con más detalle la filtración-elución orbital para concentrar volúmenes de 100 ml y la floculación inorgánica por $Mg(OH)_2$ para volúmenes de 1000 ml. Estas dos metodologías, sencillas y reproducibles, se aplicaron a estudios de campo para valorar sus eficiencias en la concentración de fagos salvajes. Los resultados de dicho trabajo de campo se recogen en el capítulo 4 de esta memoria.

3.2.2 MÉTODOS DE FILTRACIÓN

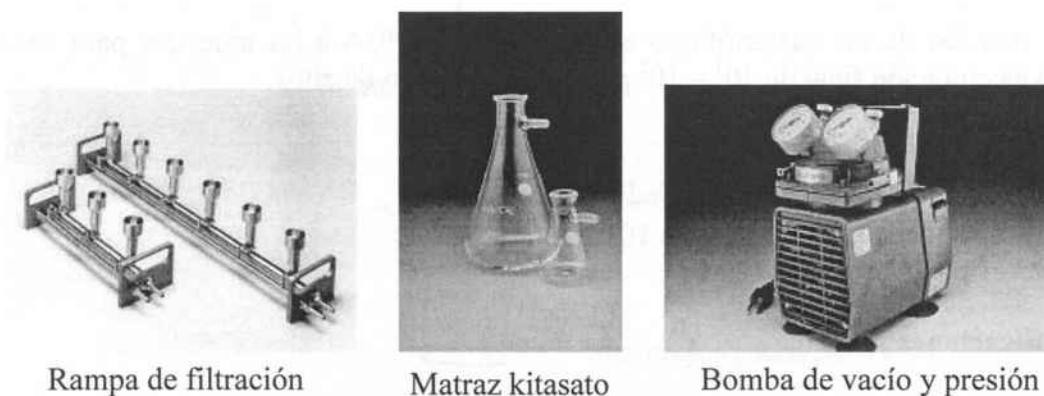
Estos métodos se basan en la técnica de adsorción-elución a membranas.

□ Equipo básico

- Dispositivos de filtración: Rampa de filtración de tres puestos (Sartorius® SM 168 28) con embudo de 100 ml y rejilla de acero para filtros de 47 mm. En algunos casos también se ha utilizado un matraz kitasato de 2 l (Afora) con embudo de 300 ml, base de filtración de vidrio sinterizado, tapón de acoplamiento de neopreno y pinza de sujeción.
- Sistema de vacío: Trompa de vacío (Afora) o bomba de vacío y presión (Millipore). En este último caso siempre se dispone de un matraz en serie para evitar la entrada accidental de líquido en el sistema de vacío.
- Pinzas de borde biselado de acero inoxidable (Millipore) para la manipulación de las membranas.

Los portafiltros, embudos y bases de filtración, siempre se utilizan estériles (121°C, 20 min). Las pinzas se esterilizan al pasarlas por la llama después de mojarlas en alcohol. Los dispositivos de filtración completos solo se esterilizan en el caso de que haya que recoger el filtrado para su posterior análisis.

Figura 3.9. Material utilizado en filtración.



3.2.2.1 Filtros inorgánicos de óxido de aluminio

Referencia

Lucena, F., Muniesa, M., Puig, A., Araujo, R. and Jofre, J. (1995). Simple concentration method for bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in drinking water. Journal of Virological Methods. 54, 121-130.

Procedimiento

1. Colocar la membrana inorgánica ANODISC™ (Anotec Inorganic Membrane Technology, Anotec Separation Ltd., Bambery, UK) de 47 mm de diámetro y 0.22 μm de tamaño de poro en la rejilla metálica. La membrana debe manipularse por el anillo de polipropileno que la rodea y se descartará en caso de que la superficie se vea dañada (es muy quebradiza). Este filtro, constituido por óxido de aluminio, a escala microscópica tiene una estructura porosa que recuerda a un panal de abejas y posee una baja actividad de unión a proteínas.
2. Tratar el filtro con 10 ml de extracto de carne BBL-V al 3 %
3. Filtrar 100 ml de la muestra.
4. Eluir los bacteriófagos retenidos en la membrana con tampón glicina 0.25 M pH 9.5:
 - Coger el filtro con unas pinzas, previamente flameadas y enfriadas, e introducirlo en un frasco estéril de 50 ml que contenga 6 ml de eluyente.
 - Triturar el filtro con ayuda de las pinzas.
 - Agitar con vórtex a velocidad máxima 30 segundos y después descansar 5 segundos. Repetir este ciclo tres veces (tiempo total de elución = 1 min 30 s).
5. Enumerar los bacteriófagos en la muestra inicial y en el concentrado siguiendo normativas ISO (Anexo 2). Calcular el porcentaje de recuperación del método.

Muestras

Adición de los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8 a las muestras para obtener una concentración final de $10^1 - 10^3$ pfp/ml de cada uno de ellos.

- Agua de mar (n = 18)
- Agua de bebida embotellada (n = 3)
- Agua de río, autoclavada 10 min (n = 8)

Modificaciones

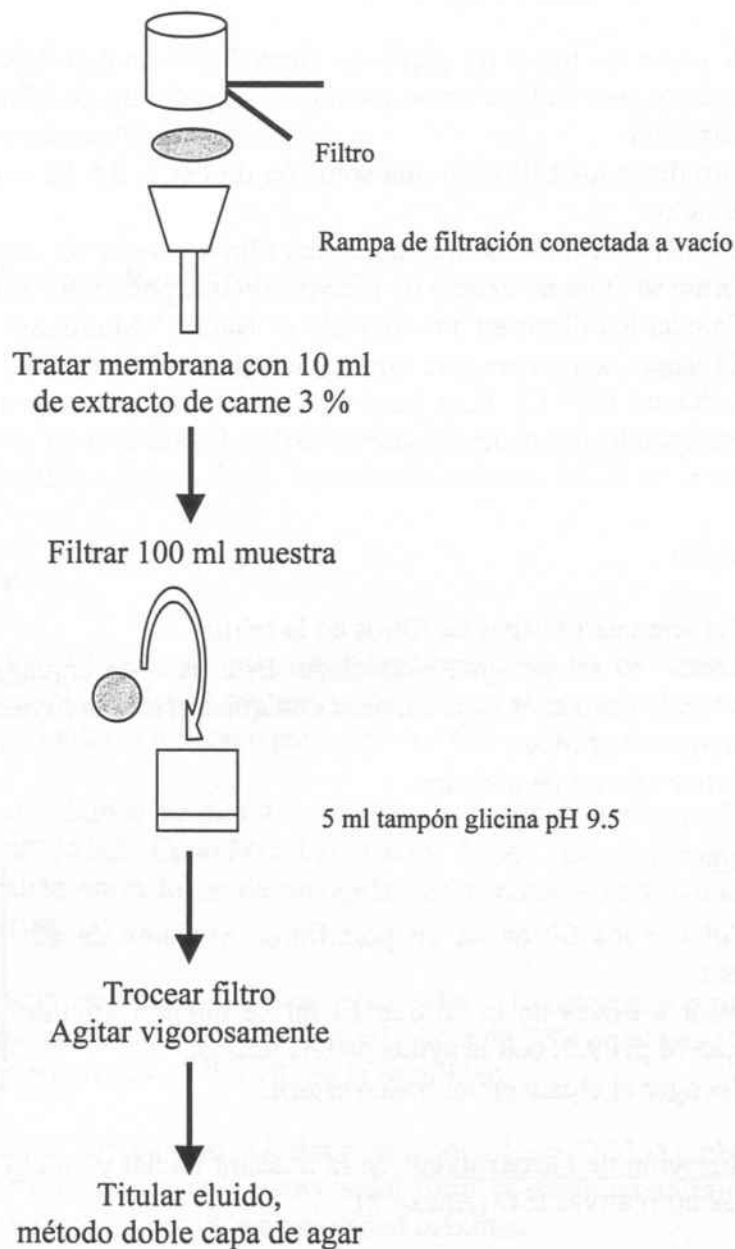
- ✓ Muestras: agua de mar infectada con stocks de bacteriófagos.
- a) Neutralización del tampón glicina pH 9.5 después de la elución de los filtros con HCl 1 N (n = 6).
- b) Tratamiento del filtro, previo a la filtración de la muestra, con 10 ml de una solución de extracto de carne al 5 % (n = 2) y con 10 ml de extracto de carne al 10 % (n = 2) con el objetivo de mejorar la recuperación de MS2.
- c) Utilización de filtros inorgánicos ANODISC™ de 0.1 μm de diámetro de poro (n = 15).

✓ Muestras: tampón de fagos conteniendo bacteriófagos.

d) Filtración de 50 ml ($n = 14$). Comparación de resultados:

- cuantificación de los fagos en el filtro directamente, sin eluir (colocar membrana con la superficie filtrante hacia arriba sobre la capa dura de agar, verter el agar blando con la bacteria huésped en fase exponencial, dejar solidificar, incubar siguiendo el método estándar) ó
- elución con 5 ml de tampón glicina pH 9.5 (tal y como se ha descrito en el apartado de procedimiento).

Figura 3.10. Esquema general seguido en los experimentos de filtración.



3.2.2.2 Filtros de celulosa modificados por precipitación “*in situ*” de hidróxidos férrico y aluminico.

Referencia

Farrah, S.R. and Preston, D.R. (1985). Concentration of viruses from water by using cellulose filters modified by in situ precipitation of ferric and aluminum hydroxides. Appl. Environ. Microbiol. 50, 1502-1504.

Procedimiento adaptado

1. Preparación de los filtros.

- A partir de hojas de papel de filtro Whatmann 3 MM (10x13 cm), recortar círculos para utilizar como membranas de 47 mm de diámetro en los sistemas de filtración.
- Introducir los filtros en una solución de FeCl_3 0.5 M - AlCl_3 0.5 M durante un minuto.
- Escurrir el exceso de líquido de los filtros y secar con papel absorbente. De esta forma se evita un exceso de precipitado que podría obstruir los filtros.
- Colocar los filtros en una solución de NaOH 1 M durante 15-30 s.
- Enjuagar completamente con agua bidestilada (3 veces) y secar a temperatura ambiente (25° C). Este paso de secado final es esencial para asegurar que el precipitado permanece asociado a los filtros cuando el agua pase a través de ellos.

2. Filtración.

- Colocar cuatro capas de filtros en la rejilla.
- Añadir 50 ml de agua bidestilada. Este paso de enjuagado de los filtros justo antes de utilizar es para eliminar cualquier precipitado que no esté estrechamente unido a los filtros.
- Filtrar 100 ml de muestra.

3. Elución.

- Colocar los filtros en un portafiltros Swinnex de 47 mm.
- Pasar a través de los filtros 10 ml de tampón glicina 0.25 M pH 9.5, con la ayuda de una jeringa.
- Recoger el eluato en un frasco estéril.

Figura 3.11. Portafiltros Swinnex.



4. Enumeración de bacteriófagos en la muestra inicial y en el concentrado de acuerdo con las normativas ISO (Anexo 2).

Muestras

- Agua de mar con MAR9, MS2 y B40-8 añadidos, $n = 15$.
 - Agua de mar sólo con MS2, $n = 23$.
- (Total de análisis con MS2 = 38)

Modificaciones

Cambios aplicados para mejorar la concentración y detección del fago MS2.

- Filtros tratados con 10 ml de una solución de extracto de carne al 3% antes de la filtración.
- Elución de las membranas con extracto de carne al 3%, pH 9.5.
- Elución de los filtros con glicina 0.25 M pH 10.
- Elución de los filtros con tampón glicina pH 11.

3.2.2.3 Filtros adsorbentes electropositivos.

Referencia

Sobsey, M.D. and Jones, B.L. (1979). Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. Appl. Environ. Microbiol. 37, 588-595.

Procedimiento adaptado

Este método se ha utilizado en nuestro laboratorio para la concentración de enterovirus de muestras ambientales. Aprovechamos dicha circunstancia para detectar bacteriófagos en el tampón glicina utilizado para eluir los filtros. Brevemente:

- Filtración de un gran volumen de muestra a través de un filtro electropositivo Cart Zeta Plus® MK 100 (AMF Cuno, Meriden, Conn, USA). Este primer paso de concentración se realiza en el lugar de recogida de la muestra con ayuda de una bomba de agua eléctrica.
- Transporte del cartucho, con posibles virus adsorbidos, al laboratorio en nevera a 4°C. Una vez en el laboratorio, se añaden unos mililitros de TSB en el recipiente que contiene el filtro y se guarda 24-48 h a 4°C en la oscuridad.
- Elución del filtro en el laboratorio. Utilizar tampón glicina 0.25 M pH 9.5 en circuito cerrado, de forma que circule a través del filtro en sentido contrario al que se filtró la muestra, durante 10 minutos a velocidad máxima.
- Recoger el tampón glicina en un recipiente adecuado y ajustar el pH a 7.

5. Una alícuota de esta concentración primaria se reserva para la detección de bacteriófagos, el resto se somete a un proceso de reconcentración por floculación orgánica (Katzenelson *et al.*, 1976).
6. Descontaminación de la muestra directa y del concentrado con unidades de filtración de baja adsorción de proteínas (Millex®-GV; SBGV025 SB, Millipore).

Muestras

Detección de bacteriófagos naturales.

	Volumen filtrado aproximado	Volumen de tampón glicina para la elución
Ríos, n = 6	50 litros	1 litro
Plantas tratamiento, n = 9	960 litros	1 litro
Pantanos, n = 2	200 litros	1 litro
Mar, n = 12	75 litros (mitad del cartucho)	0.5 litro

3.2.2.4 Filtros de acetato/nitrato de celulosa.

Referencia

Sinton, L.W., Finlay, R.K. and Reid, A.J. (1996). A simple filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100 ml water samples. J. Microb. Meth. 25, 257-269.

Procedimiento

1. Pretratamiento de la muestra. Añadir $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para obtener una concentración final de 0.5 mol/l (101,65 g por litro de muestra). Esto favorece la adsorción de fagos al filtro. Agitar hasta disolver y permitir contacto de los bacteriófagos con el cloruro de magnesio por un tiempo no inferior a 1 minuto.
2. Filtración. Colocar la membrana de acetato/nitrato de celulosa de 0,22 μm (GSWP04700; Millipore Corp., Bedford, MA,USA) en la rejilla y asegurarse de que el embudo de filtración queda bien sujeto. Añadir los 100 ml de muestra. Es aconsejable anotar el tiempo que tarda en pasar el agua a través del filtro.
3. Elución.
 - Composición del eluyente: 1% extracto de carne + 0.5 mol/l NaCl + 3% Tween80. Ajustar el pH a 9.0 y esterilizar en el autoclave.
 - Coger el filtro con pinzas y colocarlo boca abajo en una placa de petri estéril de 55 mm de diámetro que contiene 2 ml del eluyente. Colocar la placa en un agitador orbital, a 60 rpm durante 6 minutos.

4. Enumerar los bacteriófagos en la muestra inicial y en el concentrado final.

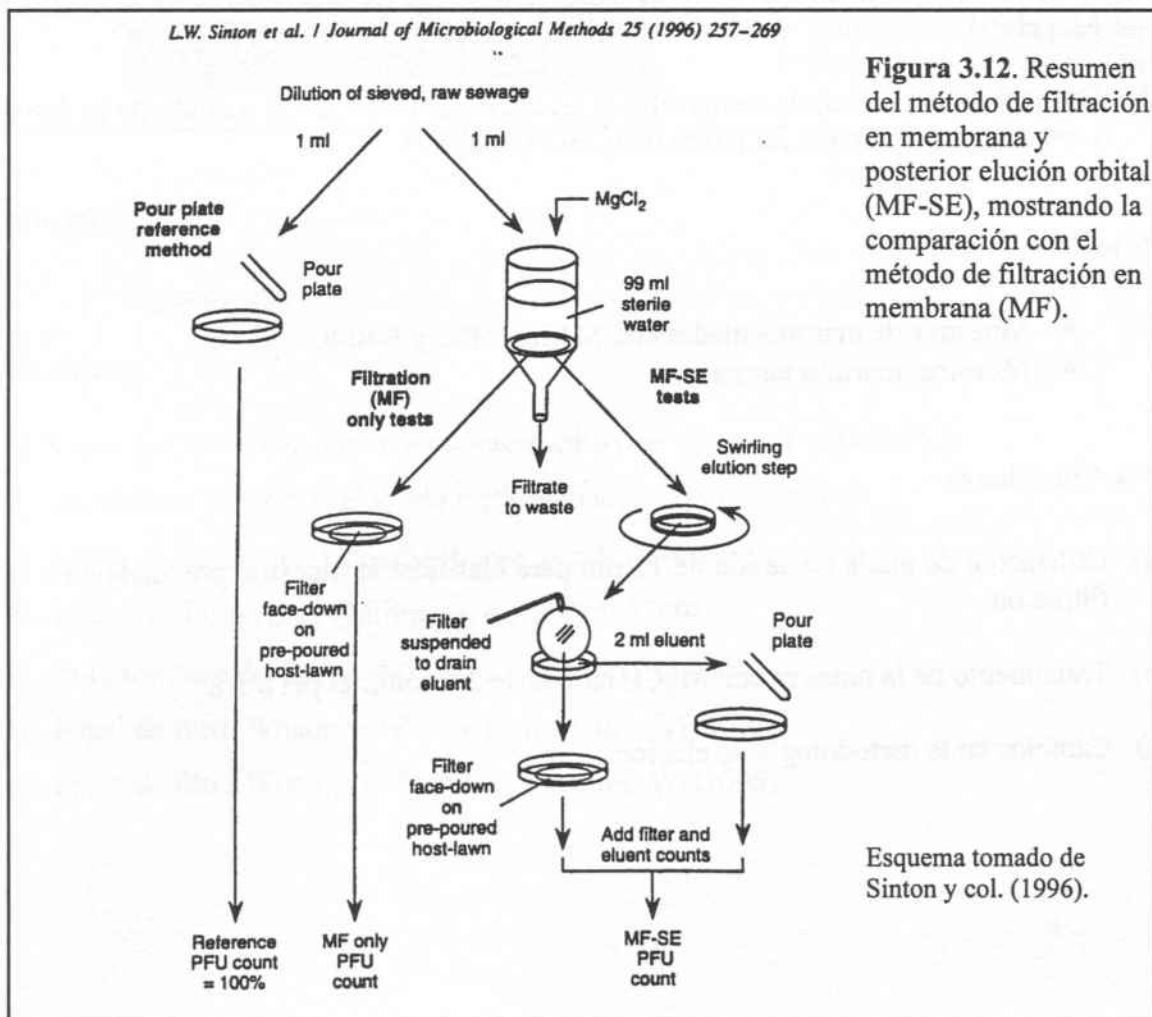
Muestras

Análisis de volúmenes de 100 ml con los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8 a concentraciones de 10^1 - 10^3 pfp/ml.

- Agua de mar, n = 24
- Agua de río, n = 3

Modificaciones del protocolo

- Cambios en el acondicionamiento de la muestra.
- Tiempos de elución.
- Elución con ultrasonidos frente a elución orbital.
- Estudios preliminares de adaptación a muestras superiores a 100 ml y/o muestras de elevada turbidez.



3.2.2.5 Más ensayos con filtros de nitrato de celulosa

Referencia

Seeley, N.D. and Primrose, S.B. (1982). The isolation of bacteriophages from the environment. J. Appl. Bacteriol. 53, 1-17.
(y A. Gawler, com. pers. 1998)

Procedimiento

Procedimiento adaptado a un litro de agua para la detección de bacteriófagos.

1. Ajustar el pH de la muestra a 3.8 ± 0.5 con HCl 1 N y NaOH 1 M.
2. Colocar en el soporte de filtros una membrana de $0.45 \mu\text{m}$ de nitrato de celulosa (SA11306047N; Sartorius, Gottingen, Germany) y encima de la membrana emplazar un prefiltro de fibra de vidrio GF/F (WH1825047; Whatman, Kent, UK).
3. Filtrar 1000 ml de la muestra (sistema de vacío).
4. Eluir con 15 ml de una solución de extracto de carne al 3% en tampón glicina 0.15 M, pH 9.0.
5. Cuantificar el número de bacteriófagos en el concentrado por el método de la doble capa de agar, siguiendo las normativas ISO (Anexo 2).

Muestras

- Muestras de mar inoculadas con MAR9, MS2 y B40-8.
- Muestras marinas naturales.

Modificaciones

- a) Utilización de malla de nailon de $11 \mu\text{m}$ para clarificar la muestra, previamente a la filtración.
- b) Tratamiento de la muestra con MgCl_2 en vez de disminuir el pH a 3.8.
- c) Cambios en la metodología de elución.

3.2.2.6 Utilización de prefiltros

Referencia

Seeley, N.D. and Primrose, S.B. (1982). The isolation of bacteriophages from the environment. J. Appl. Bacteriol. 53, 1-17.

Procedimiento

Figura 3.13. Montaje para recoger la muestra prefiltrada.



1. Colocar la membrana en el soporte de filtración. Utilizar un dispositivo de filtración que permita la recogida del filtrado.

2. Pasar la muestra a través del prefiltro.

3. Titulación de la muestra directa y de la muestra después del prefiltro. Valoración del porcentaje de retención de bacteriófagos en el prefiltro.

Muestras

- Agua de mar

Prefiltros

- Fibra de vidrio, tamaño de poro intermedio (Sartorius, ref: 1340047Q)
- Microfibra de vidrio GF grado F (Whatman, ref: WH1825047)
- Malla de nailon de 11 μm (Millipore, ref: NY1104700)
- Fibra de vidrio AP25 (Millipore, ref: AP2504700)
- Polipropileno de 10 μm (Millipore, ref: AN1H04700)
- Papel de filtro Whatman N° 1 (Whatman, ref: WH1001)
- Papel de filtro Whatman N° 6 (Whatman, ref: WH1006)

3.2.2.7 Observación de membranas al microscopio electrónico de barrido

Observación de la estructura en superficie de filtros de membrana.

1. Preparación de las muestras:

- Recortar trozos de aproximadamente 1 cm² de filtro, y engancharlo en el portaobjetos con plata coloidal. Dejar secar.
- Recubrimiento muy fino de oro, Jeol JFC 1100.

2. Observación de las membranas con el microscopio electrónico de barrido. Modelo: Leica 360. Condiciones de la observación: 5 kV.

NOTA: La preparación y observación de las muestras se realizó en los *Serveis Científico-Tècnics* de la Universitat de Barcelona.

3.2.3 MÉTODOS DE FLOCULACIÓN

Equipo básico: centrífuga de alta velocidad.

3.2.3.1 Floculación orgánica con extracto de carne.

Referencia

Katzenelson, E., Fattal, B. and Hostovesky, T. (1976). Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. Appl. Environ. Microbiol. 32, 638-639.

Procedimiento

Este método se ha utilizado en nuestro laboratorio para la concentración de enterovirus de muestras de 1 litro de ríos y depuradoras y como concentración secundaria tras la elución de los filtros electropositivos con tampón glicina. Aprovechamos dicha circunstancia para detectar bacteriófagos en los concentrados obtenidos por floculación orgánica de estas muestras.

Adaptación a un litro:

1. Añadir a la muestra extracto de carne BBL-V al 3 % (30g/l). Agitar hasta que se disuelva (solución transparente).
2. Disminuir el pH a 3.5-4 con HCl 1 M en agitación (la solución queda turbia).

3. Dejar en agitación magnética lenta (300 r.p.m.) durante 20 minutos para permitir que los virus se adhieran a los flóculos de proteína.
4. Centrifugar a 9000 g (7500 r.p.m. con el rotor JA10) durante 10 minutos a 4° C (repartir 1 litro en 3 tubos de centrifuga de 500 ml de capacidad).
5. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en tampón salino fosfato (PBS), 50 ml para muestras de río y depuradoras y 30 ml para muestras de playas, agua de plantas de tratamiento y de la red de distribución.
6. Ajustar el pH a 7 con NaOH 1 M.
7. Guardar a 4°C un día o cuantificar de inmediato los bacteriófagos presentes en el concentrado y en la muestra inicial, previa descontaminación con filtros de baja adsorción de proteínas (Millex®-GV; SBGV025 SB, Millipore).

Muestras

Detección de bacteriófagos indígenas.

- Ríos y depuradoras, n = 36.
- Tampón glicina obtenido después de la elución de cartuchos filtrantes electropositivos, n = 29.

3.2.3.2 Precipitación de extracto de carne con sulfato amónico.

Referencia

Shields, P.A. and Farrah, S.R. (1986). Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. Appl. Environ. Microbiol. 51(1), 211-213.

La precipitación por sulfato amónico se utiliza más bien como método de reconcentración en concentrados obtenidos con extracto de carne. La coagulación-floculación se produce por la desestabilización de las partículas víricas junto con el extracto de carne al añadir la sal.

Procedimiento

1. Utilizar una botella de 500 ml de boca ancha estéril para una muestra de 100 ml. Medir el pH de la muestra.
2. Añadir 10 g de extracto de carne BBL-V (10 %). Disolver por agitación magnética (se pueden añadir 5 ó 6 gotas de antiespumante). La solución queda de un color marrón transparente.

3. Ajustar el pH a 7 con NaOH 1 M si fuera necesario.
4. Añadir 200 ml de una solución de sulfato amónico saturado. Comprobar que el pH de la muestra se mantiene a 7. La solución adquiere un aspecto lechoso.
5. Agitar lentamente durante 20 minutos (300 r.p.m.).
6. Dispensar los 300 ml en un tubo de centrifuga estéril. Los tubos siempre estarán equilibrados para centrifugar.
7. Centrifugar la solución de extracto de carne - sulfato amónico a 14500 g (con centrifuga de alta velocidad y rotor JA-10, son 9000 r.p.m.) durante 20 minutos a 5-10°C.
8. Eliminar el sobrenadante transparente y resuspender el flóculo en 10 ml de tampón para fagos. Se aconseja hacer lavados sucesivos del tubo de centrifuga, primero con 4 ml y después con 3 lavados sucesivos de 2 ml.
9. Recoger el volumen final en un tubo estéril y agitar para homogeneizar la solución.
10. Cuantificar los bacteriófagos en el concentrado y en la muestra inicial según normativas ISO (Anexo 2). Expresar los resultados como pfp en 100 ml de muestra inicial y calcular el porcentaje de recuperación del método.

Muestras

- Agua de mar con MAR9, MS2 y B40-8 añadidos, n = 12.

3.2.3.3 Floculación por hidróxido de magnesio.

Referencia

Schulze, E. and Lenk, J. (1983). Concentration of coliphages from drinking water by $Mg(OH)_2$ flocculation. Naturwissenschaften. E. 70, S. 612 (1983).Springer-Verlag.

Procedimiento

Protocolo básicamente descrito por Schulze y Lenk sin modificaciones. Adaptación a un litro de muestra.

1. Dispensar un litro de muestra en una botella estéril.
2. Añadir 10 ml de cloruro magnesio 1 M.

3. Ir añadiendo en gotas, a la vez que se agita la muestra, 3.5 ml de hidrogenofosfato dipotásico 1M.
4. Añadir en gotas hidróxido sódico 2 M hasta que se enturbia el agua (pH final próximo a 9.0; son necesarios aproximadamente 2 ml de NaOH 2 M).
5. Agitar la muestra despacio otros 15 minutos, de forma que los flóculos permanezcan regularmente distribuidos permitiendo así que las partículas fágicas se adsorban (300 r.p.m.).
6. Dejar que los flóculos sedimenten durante 30-40 minutos (evitar cualquier vibración de la superficie de trabajo).
7. Aspirar el sobrenadante y concentrar el sedimento suelto que queda en la botella (aproximadamente 250 ml) con una centrifugación a 2000 g (rotor JA-10, 3000 r.p.m.), 15 minutos a 4° C (en el procedimiento original, una ligera centrifugación).
8. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante. Resuspender y homogeneizar el sedimento con 20 ml de tampón para fagos (en el procedimiento de Schulze y Lenk, caldo nutritivo). Medir el volumen final (suele estar en torno a los 30 ml).
9. Cuantificar el número de bacteriófagos en la muestra inicial y en el concentrado. Calcular el porcentaje de recuperación del método.

Muestras

Muestras de 1000 ml sembradas con los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8. En algunas muestras incluimos también ϕ X174 (colifago somático de la familia *Microviridae*, de 24 nm de diámetro) y B56-1 (bacteriófago aislado con *Bact. fragilis* RYC2056).

- Agua de mar, n = 18
- Agua de río, n = 9
- Agua del grifo, n = 8

Modificaciones

- a) Cambios en el pH de floculación.
- b) Retención de los flóculos con filtros en profundidad.
- c) Caldo nutritivo, tampón de fagos pH 7 ó tampón pH 6 para resuspender el precipitado metálico.

Conservación de muestras concentradas por floculación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$

Se realizaron algunos ensayos para evaluar por cuanto tiempo una muestra o una suspensión de fagos concentrados podían ser guardados a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ sin pérdidas importantes en el número de fagos.

Los experimentos de supervivencia a 4°C de bacteriófagos naturales se realizaron con diversas muestras:

- Agua de mar, agua de río y agua residual, directos.
- Concentrados resultantes de la floculación por $\text{Mg}(\text{OH})_2$

Flora acompañante en las placas con muestra concentrada

En las placas utilizadas para la titulación de fagos concentrados crecen microorganismos que dificultan más o menos la lectura de las calvas. Las placas con fagos de *Bact. fragilis* se ven más afectadas por dicho problema que las placas con colifagos somáticos. Probamos el efecto de la adición de bilis y antibióticos en los medios de cultivo de *Bact. fragilis* en relación con la visualización de las calvas de muestras directas y concentradas.

✓ Cambios en los medios de cultivo para *Bact. fragilis* (líquido y agares)

↳ BPRM

- Sin antibióticos
- Con antibióticos
 - Medio líquido y agar duro: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ácido nalidíxico y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamicina monosulfato.
 - Agar blando: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ácido nalidíxico y 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamicina monosulfato.

↳ BPRM + 0.25 % bilis

- Sin antibióticos
- Con antibióticos
 - Medio líquido y agar duro: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ácido nalidíxico y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamicina monosulfato.
 - Agar blando: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ácido nalidíxico y 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamicina monosulfato.

✓ Titulación de diversas muestras concentradas bajo las condiciones de cultivo anteriores (con bilis, sin bilis, con antibióticos, sin antibióticos): agua de río infectada con agua residual ($n = 8$) o con B40-8 ($n = 1$).

✓ Comparación de las calvas aparecidas en las placas que han seguido diferentes procedimientos de cultivo.

3.3 RESULTADOS

A continuación exponemos los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en el laboratorio durante la búsqueda de un método de concentración eficiente para bacteriófagos. Seguimos el mismo esquema presentado en el apartado de material y métodos (3.2) y, en general, la secuencia de experimentación siguió este orden. Para cada metodología ensayada señalamos el número de experimentos realizados (n), la media aritmética de los porcentajes de recuperación para cada bacteriófago modelo por separado (x), la desviación estándar (sd) y los valores máximos (max) y mínimos (min).

Consideraciones estadísticas. Cada valor individual de recuperación ha resultado del recuento de calvas en 6 placas (2 diluciones x 3 placas/dilución). El promedio de los porcentajes de recuperación se ha calculado tomando los valores superiores a 100 como 100% de eficiencia.

3.3.1 MÉTODOS DE FILTRACIÓN

3.3.1.1 Filtros inorgánicos Anodisc™

(Ref: Lucena *et al.*, 1995)

□ MEMBRANAS DE 0.2 μm DE TAMAÑO DE PORO.

- **Agua de mar** (Puerto Olímpico de Barcelona).

La Tabla 3.7 muestra los resultados globales obtenidos en la filtración de 100 ml de agua de mar con bacteriófagos añadidos. Como puede observarse en dicha tabla, el fago MS2 no es recuperado después de la concentración.

Tabla 3.7. Agua de mar. Resultados globales.

Experimentos	Fechas	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Est..	% recuperado después de la filtración		
				MAR9	MS2	B40-8
V= 100 ml n = 24	Abril- Mayo 1996	10^2 - 10^3 pfp / ml	x	11.7	1.1	53.0
			sd	18.8	1.8	44.1
			max	61.8	8.1	100
			min	0.4	0	1.2

Est.: estadísticos descriptivos.

Para el fago B40-8, 10 resultados de 24 son superiores al 100%.

Si de estos resultados eliminamos las 7 primeras pruebas de tanteo del método y los 6 experimentos en los que neutralizamos el eluato, la media de recuperación de los 11 ensayos restantes aumenta para los tres tipos de fagos: MAR9 = 18.1 ± 21.7 ; MS2 = 1.9 ± 2.4 y B40-8 = 94.2 ± 19.2 .

Modificaciones del protocolo.

- Neutralización del tampón glicina (inicialmente a pH 9.5) después de la elución de los filtros.

En la serie de 6 experimentos en los que se neutralizó el eluato, la concentración de la muestra inicial de MAR9, MS2 y B40-8 era 54, 55 y 47 pfp/ml respectivamente. La media de los porcentajes de recuperación fue: MAR9 = 1.7; MS2 = 0.6 y B40-8 = 13.1. Considerando los 18 ensayos restantes, la media es más alta: MAR9 = 14.7; MS2 = 1.3 y B40-8 = 66.3.

- Cambios en el pretratamiento de la membrana antes de la filtración.

Filtración de 100 ml de agua de mar dopada con MS2. Concentración inicial = 80 pfp/ml.

	BE 3%	BE 5%	BE 10%
Media n = 6	1.9	2.1	4.2

BE = extracto de carne

Comprobamos que la adición de más extracto de carne en la membrana no mejoraba sustancialmente la recuperación del fago F-RNA.

- Comparación entre filtración sin elución y filtración seguida de elución con tampón glicina pH 9.5.

Se filtraron 50 ml de tampón de fagos con bacteriófagos añadidos en cada uno de los ensayos.

FILTRACIÓN	MAR9	MS2	B40-8
pfp sobre filtro (no elución) n = 9	26.3 (n = 3)	0 (n = 3)	4.0 (n = 3)
pfp después de elución n = 6*	28.8 (n = 2)	1.6 (n = 2)	5.0 (n = 2)

(*) para cada bacteriófago modelo se llevaron a cabo dos procesos de filtración y por cada eluato se utilizaron 3 placas para la detección del bacteriófago.

La ventaja que ofrece el método de colocar los filtros directamente sobre la placa es que es más rápido porque no hay que eluir el filtro; una desventaja es la limitación de que, en un proceso de filtración, sólo puede evaluarse un único grupo de fagos. En cambio, la elución de bacteriófagos adsorbidos al filtro permite la evaluación de más de un grupo en un solo proceso de filtración, dado que el eluato puede repartirse en varias placas.

- **Agua de bebida embotellada RIBES™**

Antes de empezar nuestros estudios, la evaluación de la recuperación de bacteriófagos con membranas ANODISC™ se había realizado con filtraciones de 1000ml de agua de bebida infectada con B40-8 (Lucena *et al.*, 1995). Para comprobar que en nuestro diseño experimental no cometíamos errores, ensayamos la recuperación de los tres tipos de bacteriófagos en agua embotellada.

La Tabla 3.8 muestra un porcentaje de recuperación medio de 96.8 para B40-8 y observamos que también mejora la eficiencia del método para MAR9 en agua de bebida respecto al agua de mar. Sin embargo, el bacteriófago MS2 no es recuperado ni en muestras marinas ni en agua dulce.

Tabla 3.8. Agua de bebida embotellada.

Experimentos	Fechas	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Est.	% recuperado después de la filtración		
				MAR9	MS2	B40-8
V= 100 ml n = 3	Abril 1996	10^3 pfp / ml	x	37.3	0.3	96.8
			sd	5.8	0.2	5.4
			max	43.8	0.1	100
			min	32.8	0.5	90.6

Est.: estadísticos descriptivos.

Dos de los tres resultados para B40-8 son superiores a 100%.

- **Agua del río Llobregat, (CF: 10^3 - 10^4 cfp/100 ml, turbidez 10-30 NTU) autoclavada durante 10 minutos.**

La Tabla 3.9 muestra los resultados globales obtenidos con agua de río sembrada de MAR9, MS2 y B40-8. La recuperación de MS2 continúa siendo pésima.

Tabla 3.9. Agua de río. Resultados globales.

Experimentos	Fechas	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Est.	% recuperado después de la filtración		
				MAR9	MS2	B40-8
V= 100 ml n = 8	Abril- Mayo 1996	10^2 - 10^3 pfp / ml	x	25.4	0.2	68.1
			sd	20.7	0.1	41.2
			max	59.5	0.4	100
			min	1.0	0	12.1

Est.: estadísticos descriptivos.

Para el fago B40-8, 4 de los 8 resultados son superiores a 100%.

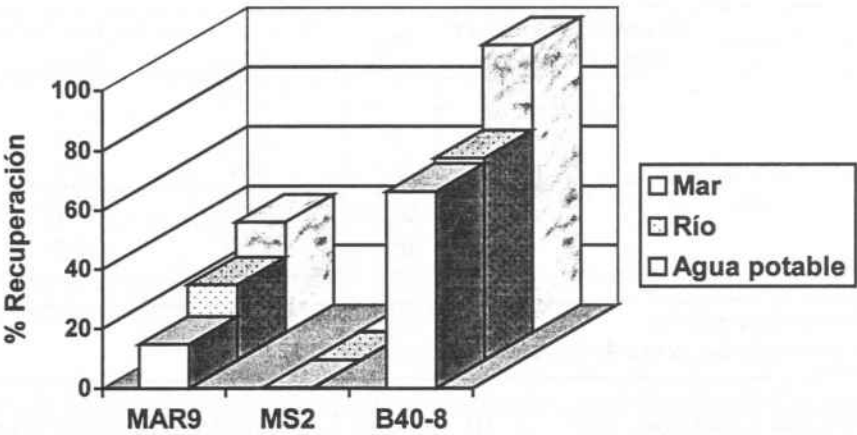
En realidad, estos resultados podrían desglosarse en dos bloques correspondientes a dos días de experimentación donde la diferencia básica estriba en la turbidez de la muestra. Aunque se trataba del mismo lote de muestra de río autoclavada, transcurridos 14 días el material en suspensión del primer día había quedado en el fondo y al separar la muestra para iniciar la fase de infección, tomamos la parte superior más clara. Haciendo distinción por día de experimentación, obtenemos los siguientes resultados:

	MAR9	MS2	B40-8
Día 1, n = 3	6.5	0.1	18.8
Día 2, n = 5	36.8	0.2	97.4

Para el fago B40-8, en el día 2, 4 de 5 resultados son superiores a 100%.

La Figura 3.14 es un resumen gráfico de la recuperación de bacteriófagos después de la filtración a través de membranas inorgánicas de 0.22 μm .

Figura 3.14. Concentración de bacteriófagos por filtración de 100 ml de agua a través de membranas inorgánicas ANODISC™ de 0.22 μm . Eficiencia de recuperación (expresado como porcentaje del título en la muestra inicial) en distintos tipos de muestras.



□ MEMBRANAS DE 0.1 μm DE TAMAÑO DE PORO.

Tal y como observamos en la Tabla 3.10, la recuperación media del fago MAR9 a distintas concentraciones iniciales en agua de mar mejora con la utilización de membranas inorgánicas de 0.1 μm ($x = 40.6$) respecto a las recuperaciones obtenidas al emplear membranas con un tamaño de poro de 0.2 μm ($x = 14.7$). También observamos un incremento en la eficiencia de recuperación del fago B40-8 con la utilización de filtros de 0.1 μm en comparación a la aplicación de filtros de 0.2 μm en agua de mar (77.9 frente a 66.3). Para MS2 no conseguimos recuperaciones aceptables.

Tabla 3.10. Agua de mar. Resultados globales.

Experimentos	Fechas	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Est.	% recuperado después de la filtración		
				MAR9	MS2	B40-8
V= 100 ml n = 15	Mayo 1996	10^1 - 10^3 pfp / ml	x	40.6	3.4	77.9
			sd	21.0	3.3	32.8
			max	57.3	11.7	100
			min	0.8	0	2.1

Est.: estadísticos descriptivos.

Para el fago B40-8, 8 resultados de 15 son superiores al 100%.

OBSERVACIONES GENERALES, no cuantificadas o no constatadas en este apartado.

- Los filtros inorgánicos ANODISC™ son frágiles, se quiebran con relativa facilidad, por lo que su manipulación inadecuada puede estropearlos.
- Apreciamos que cuando la filtración es lenta, la recuperación de bacteriófagos en el eluato es aceptable (>40%), mientras que cuando la tasa de flujo a través del filtro es rápida (> 100 ml/3 min), la recuperación disminuye.
- Parece que en los experimentos en los que la colmatación del filtro con extracto de carne no se realiza correctamente (< 10 ml al 3% de extracto de carne), el porcentaje recuperación de fagos disminuye. Igualmente, a mayor concentración de extracto de carne en la membrana, mejor recuperación.
- Los porcentajes de recuperación de MAR9 y B40-8 parecen responder a “errores sistemáticos” en el proceso de filtración, esto es, los valores más altos de recuperación de fagos de B40-8 se encuentran en los mismos experimentos que los valores más altos de MAR9. Por el contrario, los porcentajes de recuperación de MS2 parecen variar al azar.
- El valor teórico de pfp/ml en la muestra inicial después de la infección con stocks de bacteriófagos no coincide exactamente con el valor real que nosotros encontramos. Para B40-8 el valor teórico siempre es superior al obtenido experimentalmente; en cambio, para MAR9 y MS2 el valor teórico y el experimental están próximos e incluso a veces es mayor el experimental.

3.3.1.2 Filtros de celulosa modificados por precipitación “*in situ*” de hidróxidos férrico y aluminico

(Ref: Farrah y Preston, 1985)

La concentración de 100 ml de agua de mar natural con bacteriófagos añadidos se realizó por filtración a través de 4 capas de papel de celulosa modificado por precipitación “*in situ*” de hidróxidos férrico y aluminico. La Tabla 3.11 muestra los resultados que se obtuvieron tras elución con 10 ml de glicina 0.25 M pH 9.5, de los bacteriófagos adsorbidos a estos filtros modificados.

Tabla 3.11. Filtros de celulosa con $\text{Fe}(\text{OH})_3$ y $\text{Al}(\text{OH})_3$

Experimentos	Fagos iniciales, pfp/ml ^a			Desc. est.	% recuperado después de la filtración ^b		
	MAR9	MS2	B40-8		MAR9	MS2	B40-8
V= 100 ml Junio- Septiembre 1996	10^2 - 10^3	10^2 - 10^3	1-20	n	15	25	15
				x	7.2	5.9	2.5
				sd	9.5	5.7	3.4
				max	30.1	19.8	10.9
				min	0.1	0.1	0

Est.: estadísticos descriptivos.

^apH inicial de las muestras entre 7.5 y 8.0

^bElución de los virus adsorbidos a los filtros con 10 ml de glicina 0.25 M, pH 9.5.

El tratamiento de los filtros con 10 ml de extracto de carne al 3 % antes del proceso de filtración, y elución con 10 ml de glicina 0.25 M pH 9.5 tras la filtración, no mejoró en absoluto la recuperación del fago MS2 ($n=3$; $x=0.39$).

La elución de los filtros con extracto de carne al 3% pH 9.5, brindó una recuperación media para MS2 de 12.17 ($n=6$; $x=12.17$; $sd=10.83$; $max=27.08$; $min=2.07$). Destacamos que en estos 6 experimentos las muestras se ajustaron a pH 6.52 antes de la filtración.

El porcentaje de recuperación medio de dos procesos en los que la elución se realizó con tampón glicina 0.25 M pH 10 fue de 17.4 ± 0.6 para MS2, mientras que la elución con tampón glicina 0.25 M, pH 11 prácticamente no recuperaba este fago.

- Observaciones: Son factores importantes la tasa de flujo y la tasa de elución.

3.3.1.3 Filtros electropositivos Zeta plus®

(Ref: Sobsey y Glass, 1980)

La filtración de muestras naturales con cartuchos filtrantes Zeta Plus MK 100 se realizó en el lugar del muestreo y los filtros fueron eluidos en el laboratorio 24-48 h después de la primera etapa de concentración. El protocolo de trabajo no fue modificado en ningún momento para mejorar la recuperación de fagos indígenas presentes en las aguas naturales. Nos limitamos a coger alícuotas en las distintas etapas del procedimiento seguido para la concentración de virus entéricos durante el periodo de trabajo de junio a octubre de 1996.

Los resultados fueron decepcionantes. El análisis de 29 eluatos nos rindió 13 positivos para fagos somáticos, 6 positivos para fagos F-específicos y un solo positivo para fagos de *Bact. fragilis* HSP40. Las recuperaciones de colifagos somáticos oscilaron entre 0 y 1.8 % y para fagos F-específicos entre 0 y 41.2 %. El porcentaje de muestras positivas obtenido tras el análisis directo por el método de la doble capa de agar (titulados entre 3 y 10 ml) no aumentó después del análisis de varios mililitros de eluato (el volumen de concentrado analizado equivalía a 80-4800 ml de muestra inicial, según grupo de bacteriófagos y muestra disponible). No se observaron diferencias entre las muestras marinas y las de agua dulce.

Tabla 3.12. Resultados positivos para bacteriófagos antes y después de la concentración de muestras por microfiltración a través de filtros electropositivos.

	% positivos muestra directa			% positivos en el concentrado		
	SOM	F-TOT	BfHSP	SOM	F-TOT	BfHSP
Mar	9/10	3/12	2/6	6/12	1/12	0/6
n= 12	90.0	25.0	33.3	50.0	8.3	0
Agua dulce*	6/14	6/14	1/14	7/17	5/17	1/17
n= 17	42.9	42.9	7.1	41.2	29.4	5.9

*Agua dulce: pantanos, ríos, muestras recogidas en diferentes etapas de una ETAP.

SOM: colifagos somáticos; F-TOT: fagos F-específicos totales; BfHSP: fagos de *Bact. fragilis* HSP40

3.3.1.4 Filtros de acetato/nitrato de celulosa

(Ref: Sinton *et al.*, 1996)

El método de filtración-elución orbital tal y como se describe en el apartado de *material y métodos* 3.2.2.4 se basa en el procedimiento propuesto por Sinton *et al.* (1996) para enumerar fagos F-específicos y colifagos somáticos en muestras de 100 ml. En nuestro estudio de valoración del método utilizamos agua de mar natural (Villa Olímpica de Barcelona; Tordera y San Francesc, de Malgrat) con una antigüedad de 1 a 15 días (almacenada a 4° C), pH 8.1-8.2 y un rango de turbidez de 1 a 14 NTU. La Tabla 3.13 muestra los resultados globales de la concentración de 100 ml de agua de mar con bacteriófagos añadidos. Encontramos diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las recuperaciones obtenidas para los distintos grupos de fagos: B40-8 fue recuperado más eficientemente que MS2 y MAR9.

Tabla 3.13. Método de filtración-elución orbital. Resultados globales en agua de mar.

Volumen	Fechas	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Est.	% recuperado después de la filtración		
				MAR9	MS2	B40-8
100 ml	Nov 1996 Feb 1997	1-10 ² pfp / ml	n	24	18	18
			x	58.9	61.6	82.9
			sd	17.2	14.3	16.7
			max	92.3	90.4	100
			min	29.8	38.5	44.6

Est.: estadísticos descriptivos.

Para B40-8, 6 resultados de 18 son superiores a 100 %.

Un análisis más detallado (Tabla 3.14) muestra que el método es eficiente en un rango de concentraciones iniciales de bacteriófagos entre 2 y 200 pfp/ml (recuperaciones $\geq 50\%$). En la Figura 3.15 observamos algunas diferencias en la recuperación de MAR9, MS2 y B40-8 según el contenido de fagos de la muestra inicial. La comparación de medias y tabla ANOVA de un factor (95% intervalo de confianza) apuntan que la recuperación de MAR9 es independiente de la concentración inicial de fagos. MS2 parece recuperarse menos eficientemente a concentraciones de 100-200 pfp/ml al contrario que B40-8, para el cual obtenemos las mejores recuperaciones en este intervalo de concentraciones iniciales.

Algunas pruebas con agua de río y bacteriófagos añadidos muestran que el método es igualmente eficiente con muestras continentales. Las tasas de recuperación medias de 3 experimentos fueron las siguientes: MAR9 = 24.7 ± 6.2 ; MS2 = 98.7 ± 2.3 ; B40-8 = 97.9 ± 3.7 .

Tabla 3.14. Método de filtración-elución orbital. Agua de mar con distintas concentraciones iniciales de bacteriófagos.

Volumen	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Est.	% recuperado después de la filtración		
			MAR9	MS2	B40-8
100 ml	2-10 pfp / ml	n	11	5	6
		x	67.6	67.7	69.6
		sd	20.2	7.4	15.3
		max	92.3	78.2	85.6
		min	29.8	60.8	44.6
100 ml	11-100 pfp / ml	n	6	6	7
		x	50.0	69.0	82.1
		sd	10.9	14.4	13.2
		max	71.0	90.4	100.0
		min	41.6	54.9	69.3
100 ml	101-211 pfp / ml	n	7	7	5
		x	52.7	51.0	100
		sd	9.6	12.6	-
		max	62.7	76.3	-
		min	37.4	38.5	-

Est.: estadísticos descriptivos.

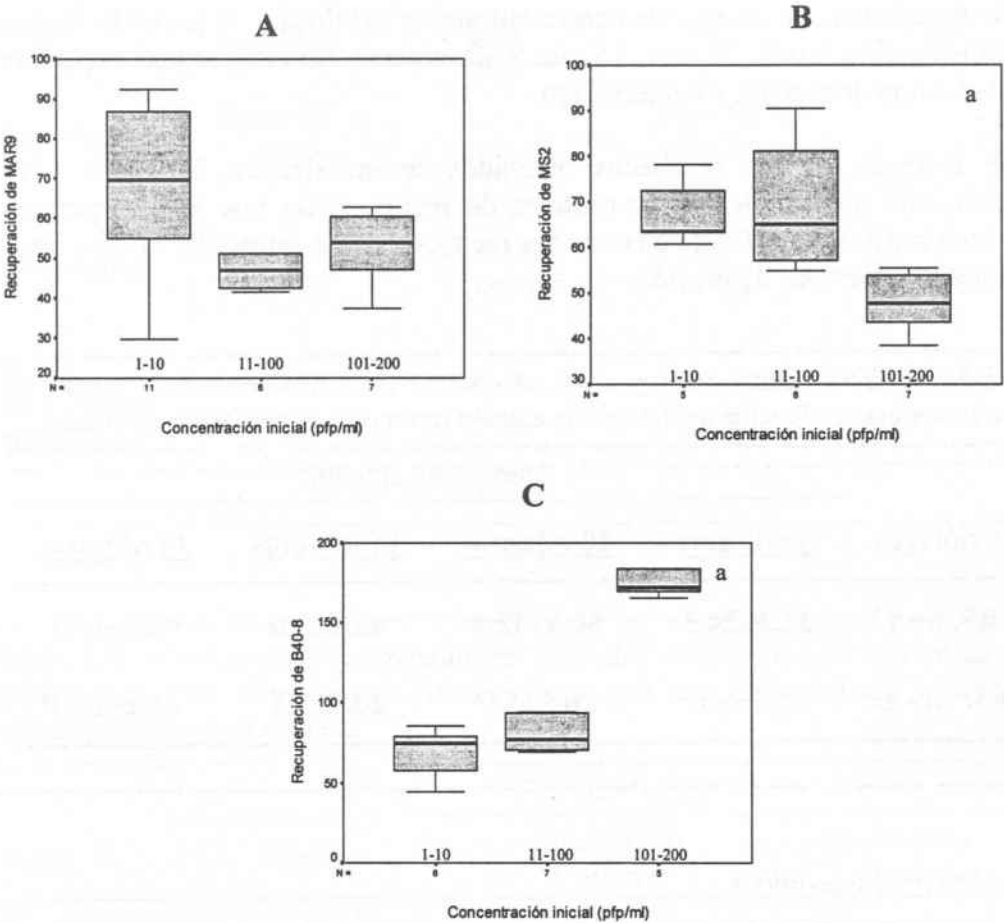
Modificaciones del protocolo

- Cambios en el pretratamiento de la muestra

Se realizaron pruebas preliminares con agua de mar del Port Olímpic y bacteriófagos añadidos para observar la influencia del cloruro de magnesio en la recuperación de bacteriófagos tras filtración y posterior elución. Muestras de 100 ml fueron tratadas con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a concentraciones finales de 0M, 0.005M, 0.05M y 0.5M. Se analizaron 4 muestras para cada condición con MAR9 y 3 muestras por tratamiento con MS2 y B40-8; la Tabla 3.15 muestra un resumen de los resultados obtenidos.

La comparación de medias, tablas ANOVA de un factor (95% intervalo de confianza) y eta cuadrado aplicadas a los resultados que obtuvimos apuntan que el acondicionamiento con cloruro de magnesio a concentraciones de 0 a 0.5M de muestras marinas no explica la variabilidad en los porcentajes de recuperación de bacteriófagos, es decir, no hay diferencias significativas de eficiencia del método de filtración-elución orbital entre los distintos grupos de tratamiento.

Figura 3.15. Porcentajes de recuperación de MAR9 (diagrama A), MS2 (diagrama B) y B40-8 (diagrama C) por filtración de 100 ml de muestras de mar, con distintas concentraciones iniciales de bacteriófagos, y posterior elución orbital.



NOTA: Para la representación de los diagramas de caja se han tomado los porcentajes de recuperación sin modificar, esto es, las eficiencias superiores a 100 se han considerado tal cual.

^aDiferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos, por análisis de la varianza de un factor.

Tabla 3.15. Recuperación de fagos por el método de filtración-elución orbital de muestras marinas tratadas con distintas concentraciones de $MgCl_2$ ($\bar{x} \pm sd$)

Bacteriófagos	Adición de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en la muestra inicial			
	<u>0M</u>	<u>0.005M</u>	<u>0.05M</u>	<u>0.5M</u>
MAR9, n= 16	39.1±14.5	62.2±20.2	47.7±22.8	47.4±18.1
MS2, n= 12	83.0±26.5	99.5±5.5	92.1±37.2	71.0±13.6
B40-8, n= 12	98.1±22.6	125.8±31.2	159.0±40.7	97.3±41.2

Los porcentajes de recuperación superiores a 100 se han considerado tal cual.

- Tiempos de elución

Se realizaron unos experimentos de tanteo con el fin de determinar si el tiempo de elución del filtro era un factor decisivo en la eficiencia del método para recuperar bacteriófagos. Se filtraron volúmenes de 10 ml de agua marina con MAR9 y B40-8 a través de membranas de 47 mm de acetato/nitrato de celulosa y se probó la elución de los mismos durante 5 min, 10 min, 15 min y 30 minutos. Se realizaron 3 experimentos para cada tiempo de elución y bacteriófago.

Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 3.16. La comparación de medias de los porcentajes de recuperación nos indica que no hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las recuperaciones dentro del mismo grupo de fagos a distintos tiempos de elución.

Tabla 3.16. Recuperación de fagos por el método de filtración-elución orbital de muestras marinas en función del tiempo de elución (promedio $\pm$ desviación estándar)				
Bacteriófagos	Tiempo de elución			
	<u>5 minutos</u>	<u>10 minutos</u>	<u>15 minutos</u>	<u>30 minutos</u>
MAR9, n= 12	32.3$\pm$24.3	50.3$\pm$32.9	43.8$\pm$2.0	55.3$\pm$12.2
B40-8, n= 12	13.7$\pm$3.6	20.5$\pm$5.0	20.3$\pm$3.4	23.2$\pm$12.9

- Elución con ultrasonidos

Una modificación en el proceso de elución, ensayada en nuestro laboratorio por J. Méndez para muestras de 1000 ml de agua potable, consiste en colocar el filtro con fagos adsorbidos troceado (4-8 trozos) dentro de un contenedor de vidrio con eluyente y someterlo a un baño limpiador por ultrasonidos a 200 W (Méndez, 1999).

Comparamos los porcentajes de recuperación de bacteriófagos naturales en muestras de 100 ml obtenidos después de concentrar por filtración y eluir según las dos variantes propuestas: elución orbital durante 6 minutos y elución por ultrasonidos durante 1 minuto. Cada una de las muestras de mar y río analizadas se sometió a los dos procesos de elución para poder comparar eficiencias y un resumen de los resultados que obtuvimos se muestra en la Tabla 3.17.

El análisis de la varianza de las eficiencias de recuperación muestra que no hay diferencias entre elución orbital y sonicación durante un minuto para ningún grupo de bacteriófagos.

Tabla 3.17. Porcentajes de recuperación en muestras naturales de 100 ml de mar y río filtradas y sometidas a dos procesos de elución: orbital y sonicación.

Fagos	Elución orbital		Elución por sonicación 1 min	
	<u>río</u>	<u>mar</u>	<u>río</u>	<u>mar</u>
Somáticos	31.4±14.1 (n=7)	-	39.3±16.7 (n=7)	-
F-específicos	68.0±23.9 (n=9)	45.1±39.8 (n=7)	56.2±17.0 (n=9)	34.6±25.2 (n=7)
de <i>Bact. fragilis</i> HSP40	53.1±44.7 (n=6)	22.0±18.1 (n=8)	42.4±31.8 (n=6)	28.4±27.8 (n=8)

Tabla 3.18. Recuperación de bacteriófagos naturales en muestras de 100 ml de agua residual (~23 NTU) filtradas y sometidas a 3 procesos de elución: orbital, sonicación 1 minuto y sonicación 3 minutos.

Fagos	Tipo de elución		
	orbital	sonicación 1 minuto	sonicación 3 minutos
Somáticos	10.4±3.0 (n=3)	29.7±3.9 (n=5)	23.3±7.3 (n=3)
F-específicos	16.9±11.8 (n=3)	44.7±3.9 (n=5)	27.5±0.4 (n=3)
de <i>Bact. fragilis</i> HSP40	51.5±42.0 (n=3)	138.4±41.1 (n=5)	76.5±17.0 (n=3)

^aLos valores en caja son significativamente diferentes al nivel del 5 % por análisis de la varianza.

También se aplicaron tres tipos de elución a membranas con fagos adsorbidos después de haber filtrado 100 ml de agua residual: elución orbital, baño de ultrasonidos 1 minuto y ultrasonidos 3 minutos. La Tabla 3.18 resume los resultados que obtuvimos. No se registraron diferencias significativas en la recuperación de bacteriófagos entre elución orbital y baño de ultrasonidos durante 3 minutos mientras que sí se observaron diferencias entre estos tipos de elución y la elución por ultrasonidos durante 1 minuto ($P < 0.05$). Así, los colifagos somáticos, los fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis*

HSP40 del agua residual adsorbidos a filtros de acetato/nitrato de celulosa de 0.22 μm parecían eluirse mejor al aplicar durante un minuto ultrasonidos que no por elución orbital.

Además, los fagos de *Bact. fragilis* se recuperaron mejor después de filtrar 100 ml de agua residual y eluir la membrana que los colifagos somáticos y los F-específicos ($P < 0.01$).

- Procesamiento de volúmenes superiores a 100 ml y/o muestras de elevada turbidez. Estudios preliminares.

Realizamos algunos ensayos con muestras de 500 ml de agua de mar de baja turbidez y bacteriófagos añadidos. Seguimos el mismo protocolo de concentración utilizado en los experimentos previos con muestras de 100 ml (filtración-elución orbital). Bajo estas condiciones de trabajo, el factor de concentración era de 250.

Tabla 3.19. Filtración-elución orbital de muestras de 500 ml de agua de mar.

Volumen	Fechas	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Desc. est.	% recuperado después de la filtración	
				MAR9	MS2
500 ml	Enero 1997	2-15 pfp / ml	n	6	3
			x	37.1	76.9
			sd	13.5	4.1
			max	54.3	81.0
			min	19.4	72.8

Est.: estadísticos descriptivos.

Turbidez aproximada de las muestras de agua de mar: 1.2 NTU.

En la recuperación de bacteriófagos después de la filtración de volúmenes de 500 ml, observamos que la eficiencia del método seguía siendo buena para concentrar el fago MS2 y disminuía para el fago MAR9 en aproximadamente un 20 % respecto al porcentaje de recuperación con muestras de 100 ml (Tabla 3.19).

La otra cara de la moneda es la concentración de muestras de elevada turbidez. En un par de pruebas con muestras de 500 ml de mar naturales (turbidez ≥ 10 NTU), obtuvimos un porcentaje de recuperación medio para colifagos somáticos del 18 %, aunque la recuperación de fagos F-específicos fue de 96 %; la eficiencia del método para los fagos de *Bact. fragilis* no pudo calcularse porque, aunque en el concentrado encontramos fagos, en la muestra directa no obtuvimos ninguna calva en 10 ml.

Los principales problemas en los que reparamos al intentar adaptar el método de concentración a volúmenes superiores a 100 ml y/o a muestras de turbidez > 10 NTU fueron:

- Dificultad de filtrar muestras turbias; disminución de la tasa de flujo y obstrucción del filtro. Con el propósito de clarificar la muestra y conseguir filtrar el volumen deseado a través del filtro de celulosa de 0.22 μm , iniciamos el estudio de prefiltros.

- Elución de los filtros; con el método de agitación orbital, los filtros continuaban “sucios”. J. Méndez, de nuestro grupo de trabajo, inició los estudios de elución con ultrasonidos.
- Contaminación en el concentrado; la flora acompañante dificultaba la lectura de las calvas de bacteriófagos en las placas que contenían el eluido de los filtros. Cambios en la metodología del cultivo de *Bact. fragilis* (aumento de la concentración de antibióticos) solucionaron parcialmente el problema de bacterias contaminantes. La opción de descontaminar el concentrado pasándolo a través de un filtro de PVDF 0.22 μm de baja adsorción de proteínas también se puso en práctica.

3.3.1.5 Filtros de nitrato de celulosa

(Ref: Seeley y Primrose, 1982; A. Gawler, com. pers. 1998)

Este método se probó para la filtración de 1000 ml de muestra, previamente acidificada, a través de un prefiltro (GF/F) y una membrana de nitrato de celulosa (de 47 mm y 0.45 μm de poro) y posterior elución con una solución a pH 9.0 conteniendo un 3% de extracto de carne en tampón glicina 0.15 M.

La primera observación fue la necesidad de eluir el prefiltro junto al filtro debido a que el prefiltro de microfibras de vidrio GF grado F retenía un porcentaje importante de fagos (del 35 % para colifagos somáticos al 95 % para fagos de *Bact. fragilis*).

Los resultados preliminares obtenidos al concentrar muestras de 1000 ml de agua de mar infectada con stocks de fagos fueron ($n = 3$): MAR9 = 43.3 ± 11.2 ; MS2 = 69.8 ± 26.6 ; B40-8 = 79.5 ± 29.1 (promedio de recuperación $\pm$ desviación estándar).

La elución de los filtros fue realizada con portafiltro y 2 jeringas. Se probó pasar el eluyente una vez, 3 veces y 5 veces a través del prefiltro y filtro y la tendencia fue a recuperar más fagos después del paso del eluyente por quinta vez a través de los filtros. El eluato siempre fue recogido en el sentido contrario al de la filtración. Cambios en la composición del eluyente (probamos el eluyente utilizado en el apartado anterior: 3 % Tween 80, 1 % extracto de carne, 0.5 M NaCl; pH 9.0) y/o cambios en el proceso de elución (esto es, sonicación durante 3 min) no mejoraban la eficiencia del método.

Por otro lado, el acondicionamiento de la muestra con MgCl_2 (concentración final 0.05 M) y filtración a pH neutro, evitando así el paso de acidificación, no parecía alterar la eficacia del método.

En el análisis de muestras naturales se consiguieron porcentajes de recuperación aceptables (Tabla 3.20). La media de recuperación de bacteriófagos en muestras relativamente turbias fue de 44.1 ± 13.1 para colifagos somáticos ($n = 8$), 25.9 ± 11.0 para fagos F-específicos ($n = 8$), 68.2 ± 27.0 para fagos de *Bact. fragilis* HSP40 ($n = 6$) y 78.5 ± 25.9 para fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 ($n = 6$). Cinco porcentajes de recuperación para fagos de *Bact. fragilis* fueron superiores a 100, aunque para el cálculo del promedio y desviación estándar estos valores han sido sustituidos por 100.

Tabla 3.20. Recuperaciones de colifagos somáticos en muestras naturales concentradas por filtración a través de membranas de nitrato de celulosa.

Muestra	Turbidez (NTU)	CF/100 ml	V filtrado (ml)	V final (ml)	% recuperación SOM
A	-	3.3×10^2	1000	15	61.4
B	9	NT	1000	15	47.0
C	44	NT	800	15	36.6
D	35	NT	500	15	47.4
E	35	1.1×10^5	550	15	56.5
F	42	2.8×10^3	500	15	49.1
G	38	2.1×10^3	800	15	33.7
H	35	1.1×10^5	500	15	21.0

CF: coliformes fecales; V:volumen; SOM. colifagos somáticos.

Noviembre 1998

Algunas de las muestras de elevada turbidez se pasaron a través de mallas de nailon de 11 μm antes de aplicar el método de concentración para eliminar parte del material en suspensión y evitar la colmatación prematura de los filtros de microfibras de vidrio y de nitrato de celulosa.

3.3.1.6 Prefiltros

- Prefiltro de fibra de vidrio Sartorius

La incorporación de los prefiltros de fibra de vidrio 1340047Q (Sartorius) al procedimiento de concentración por filtración-elución orbital, se realizó con el objetivo de preservar el filtro GSWP04700 (Millipore Corp.) de 0.22 μm y poder concentrar volúmenes superiores a 100 ml y/o muestras de turbidez > 10 NTU.

Iniciamos el estudio con agua residual de turbidez próxima a las 23 NTU. En el diseño experimental habíamos diferenciado tres grupos de trabajo: (i) "control GS", filtración de 100 ml de agua residual a través del filtro de acetato/nitrato de celulosa y posterior elución, (ii) "Prefiltro-prefiltrado-filtro GS", paso de la muestra a través del filtro de fibra de vidrio, recuperación del prefiltrado y filtración a través del filtro GS y (iii) "Prefiltro + filtro GS", paso de la muestra a través del prefiltro y filtro juntos en el mismo soporte.

La Tabla 3.21 muestra la retención de bacteriófagos en el prefiltro de fibra de vidrio y el porcentaje de fagos que conseguimos eluir. Los resultados parecen apuntar que el prefiltro utilizado, en las condiciones de trabajo señaladas, no retendría un porcentaje significativo de bacteriófagos indicadores presentes en el agua residual.

Tabla 3.21. Utilización de filtros de fibra de vidrio (1340047Q; Sartorius) para prefiltrar agua residual. Porcentajes de retención de bacteriófagos en los prefiltros (% R) y porcentaje de fagos liberados del prefiltro (% E) con un proceso de elución (eluyente: 1% extracto de carne, 0.5 mol/l NaCl, 3% T80; pH 9.0).

Fagos iniciales pfp/ml	FILTRACIÓN 100 ml agua residual (~23 NTU)					
	SOM		F-TOT		BfHSP	
	% R	% E	% R	% E	% R	% E
SOM 9200	0.0	1.7 ^a	-8.9	14.2 ^a	-38.4	2.1 ^a
	-7.3	1.1 ^b	4.9	10.0 ^b	11.9	1.1 ^b
	9.9	0.8 ^b	12.9	54.0 ^b	-72.5	2.0 ^b
F-TOT 114		0.6 ^c		10.3 ^c		0.6 ^c
		1.7 ^a		21.6 ^a		2.8 ^a
		0.9 ^b		13.6 ^b		1.3 ^b
BfHSP 38.6		0.7 ^c		1.2 ^c		1.5 ^c
Media	0.9	1.1	3.0	17.8	-33.0	1.6
sd	8.6	0.5	11.0	17.1	42.4	0.7

SOM: colifagos somáticos; F-TOT: fagos F-específicos totales; BfHSP: fagos de *Bact. fragilis* HSP40

sd: desviación estándar

Elución del prefiltro:

^aagitación vigorosa 2 min.

^bsonicación 1 min.

^csonicación 3 min.

Mayo 1997

Además, aunque los resultados no son concluyentes, la eficiencia en la elución de los prefiltros podría ordenarse, en función del método utilizado, de la siguiente forma:

más eficiente **agitación vigorosa 2 min* > sonicación 1 min > sonicación 3 min** menos eficiente

*problema de formación de espuma debido a las proteínas y al detergente que forman parte del eluyente.

Por otro lado, observamos que el paso de volúmenes de 1000 ml de agua de río (turbidez ≥ 14 NTU) con MS2 y B40-8 añadidos (concentración en la muestra de aproximadamente 20 pfp/ml para los grupos de colifagos somáticos, MS2 y B40-8) a través de un prefiltro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro y tamaño de poro intermedio, representaba unas pérdidas de bacteriófagos alrededor del 20% para cada grupo si dicho prefiltro no se sometía a un proceso de elución. En las pruebas de elución orbital de estos prefiltros de fibra de vidrio reparamos en que después de la agitación orbital, los prefiltros continuaban visualmente “sucios” y que se requería un proceso de elución más enérgico.

En cualquier caso, la utilización de prefiltros en aguas relativamente contaminadas presentaba el inconveniente de la dificultad de lectura de las calvas de bacteriófagos en el eluato del prefiltro. Este problema se acusaba más en el caso de los fagos de *Bact. fragilis* porque para su cuantificación no hacíamos diluciones y la flora acompañante suponía un impedimento importante a la visualización de las calvas.

Tabla 3.22. Porcentajes de recuperación de bacteriófagos después de la filtración de 100 ml de agua residual y posterior elución de: filtro de acetato/nitrato de celulosa (control GS), prefiltro de fibra de vidrio (Prefiltro), filtro de celulosa utilizado para concentrar la muestra prefiltrada (GS), prefiltro utilizado sobre el filtro de celulosa (P+F Pref.) y filtro de celulosa utilizado conjuntamente con el prefiltro anterior (P+F GS).

Filtración 100 ml agua residual. Porcentajes de recuperación					
Fagos	Control GS	Prefiltro	GS	P+F Pref.	P+F GS
Somáticos	26.8±10.9 (n=4)	1.1±0.5 (n=4)	20.3±6.9 (n=3)	1.1±0.6 (n=3)	20.5±10.4 (n=4)
F-específicos totales	37.8±10.6 (n=4)	22.1±21.3 (n=4)	29.6±17.5 (n=3)	12.1±10.3 (n=3)	29.1±15.8 (n=4)
de <i>Bact. fragilis</i> HSP40	95.1±29.5 (n=4)	1.4±0.7 (n=4)	96.4±66.4 (n=3)	1.8±0.8 (n=3)	101.7±71.6 (n=4)

Turbidez del agua residual ~ 23 NTU.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación medio, las eficiencias superiores a 100 se consideraron tal cual. Se indica la media (en negrita) y la desviación estándar (±).

Tabla 3.23. Filtración de 100 ml de agua residual (previo acondicionamiento de la muestra con MgCl₂). Porcentaje de bacteriófagos que no son retenidos en: filtro GS (control GS), prefiltro de fibra de vidrio (Prefiltro), filtro de celulosa utilizado para concentrar la muestra prefiltrada (GS), prefiltro y filtro GS juntos en el mismo soporte (P+F).

Filtración 100 ml agua residual (~23 NTU) Porcentaje bacteriófagos que pasan a través del filtro y prefiltro				
Fagos	Control GS	Prefiltro	GS	P+F
Somáticos	3.9±2.7 (n=3)	99.1±8.6 (n=3)	10.4±7.0 (n=3)	12.6±5.3 (n=3)
F-específicos totales	2.0±2.4 (n=3)	97.0±11.0 (n=3)	2.6±1.6 (n=3)	4.0±4.0 (n=3)
de <i>Bact. fragilis</i> HSP40	0.2±0.4 (n=3)	133.0±42.4 (n=3)	4.1±3.9 (n=3)	0.3±0.5 (n=3)

Para el cálculo del porcentaje de recuperación medio, las eficiencias superiores a 100 se consideraron tal cual. Se indica la media (en negrita) y la desviación estándar (±).

Se considera 100 % el título de bacteriófagos en la muestra directa, sin ningún tratamiento. Después de la filtración, se recoge el volumen de agua filtrado o prefiltrado y se enumeran los bacteriófagos que han pasado a través del prefiltro y/o filtro y el resultado se expresa como porcentaje de fagos respecto a la muestra directa.

- Flujo a través de los filtros y prefiltros en el esquema experimental de estos ensayos con agua residual:

Control GS	70-80 ml	53-60 minutos ^a
Prefiltro	100 ml	1-1.5 minutos
GS (después de prefiltrar)	100 ml	3-5 minutos
P+F	100 ml	4-6 minutos

^aProblema de colmatación del filtro con el material en suspensión y disuelto de la muestra.

La Tabla 3.22 muestra los resultados de recuperación de bacteriófagos por filtración de 100 ml de agua residual a través de filtros de celulosa y prefiltros de fibra de vidrio, con la posterior elución de los mismos, y la Tabla 3.23 muestra los porcentajes de bacteriófagos que pasaron a través de estos filtros y prefiltros y no fueron retenidos.

- Retención de fagos en prefiltro GF/F

Los ensayos de retención de bacteriófagos en el prefiltro de fibra de vidrio GF grado F (Whatman) tenían como objetivo determinar si era necesario eluir el prefiltro que se utiliza encima de un filtro de nitrato de celulosa de 0.45 μm en un procedimiento normalizado de trabajo para concentrar enterovirus y bacteriófagos en aguas de baño (protocolo facilitado por A. Gawler).

Comprobamos que B40-8 queda atrapado en el prefiltro bajo las condiciones de trabajo que normalmente se utilizan para concentrar virus con membranas de celulosa. De igual forma, los fagos F-específicos totales, seguidos por los colifagos somáticos en porcentaje, quedan retenidos en una proporción importante como para desechar el prefiltro sin eluir. La Tabla 3.24 muestra los resultados de varios experimentos de retención después de pasar 1000 ml de agua de mar (2.85 NTU) infectada con 20 ml de agua residual y stock de B40-8 a través de un prefiltro de fibra de vidrio GF grado F de 47 mm de diámetro.

Tabla 3.24. Utilización de prefiltro GF/F en agua de mar después de preparar la muestra para la concentración de virus (acidificación o adición de MgCl_2). Retención de bacteriófagos después de prefiltrar 1000 ml de muestra.

Tratamiento de la muestra	Porcentajes de retención		
	<u>SOM</u>	<u>F-TOT</u>	<u>B40-8</u>
Disminución del pH a 3.75-3.85	57.5	53.6	100
	39.5	77.2	100
Adición de MgCl_2 a 0.05 M	24.5	37.5	89.7
	18.2	40.9	91.7

Concentración inicial media de fagos: colifagos somáticos (SOM) 582 pfp/ml; fagos F-específicos totales (F-TOT) 15 pfp/ml; fagos de *Bact. fragilis* HSP40 160 pfp/ml.

Octubre 1998

- Prefiltros: Malla nylon 11 μm , AP25, polipropileno 10 μm , Whatman 1 y 6

La búsqueda de membranas que ayudaran a clarificar las muestras de agua para facilitar la posterior concentración de bacteriófagos por microfiltración, sin pérdidas importantes de tales microorganismos en el proceso de prefiltración, nos condujo al examen de distintos materiales. La Tabla 3.25 resume los resultados obtenidos en los ensayos de prefiltros con aguas de mar y río infectadas con stocks de bacteriófagos.

El paso de volúmenes de 1 litro de agua de mar (turbidez ≤ 2 NTU) a través de los prefiltros estudiados no ofreció ningún problema, siendo el tiempo de filtración igual o inferior a 4 minutos. Por el contrario, con las muestras de río (turbidez ≥ 31 NTU) tuvimos dificultades al intentar filtrar un litro a través de los prefiltros de 47 mm de diámetro con el sistema de filtración por vacío y matraz kitasato. La placa porosa de vidrio borosilicatado quedaba obstruida después de haber realizado algunos experimentos con prefiltros y agua de río de elevada turbidez, por lo que decidimos continuar el estudio de prefiltros con la rampa de acero inoxidable; la rejilla metálica que soporta los filtros era la solución al problema mecánico originado por la materia en suspensión del agua de río. Con el sistema de filtración por vacío no conseguíamos clarificar muestras de 1 litro de agua del río Llobregat, en un tiempo inferior a 12 minutos utilizando una membrana de 47 mm de diámetro.

Una de las observaciones de los resultados de la Tabla 3.25 es la gran desviación estándar de las medias de retención de fagos en los prefiltros. Probablemente esta dispersión de los datos se deba a la diferente calidad de las aguas utilizadas y a los problemas de homogeneización de las muestras iniciales y prefiltradas, pues la concentración de bacteriófagos diana oscilaba en torno a 40 pfp/ml.

El colifago somático MAR9 en agua de mar no parece quedar retenido por ninguno de los prefiltros utilizados; para agua de río no tenemos suficientes resultados pero podría quedar retenido en el papel Whatman 1 y en el prefiltro de polipropileno de 10 μm . Las relaciones obtenidas apuntan que MS2 suspendido en agua de mar atraviesa los prefiltros estudiados sin ser capturado. Se diría que un porcentaje de los fagos B40-8 en agua de mar queda atrapado en el prefiltro AP25 y en el papel Whatman 1.

De forma general, podemos decir que el caudal de agua a través de los prefiltros puede ordenarse de mayor a menor en relación con el prefiltro utilizado:

soporta mayor flujo	nailon 11 μm > AP25 > polipropileno 10 μm > Whatman 1 > Whatman 6	soporta menor flujo
---------------------------	---	---------------------------

Además, el agua prefiltrada después de la malla de nailon es la más turbia, mientras que el agua prefiltrada con papel Whatman N° 6 presenta la menor turbidez.

Tabla 3.25. Porcentaje de retención de distintos bacteriófagos suspendidos en agua marina y fluvial al pasar 1 litro de muestra (sin acondicionar) a través de prefiltros de 47 mm de diámetro.

PREFILTRO	% retención de distintos bacteriófagos en el prefiltro					
	MAR9		MS2		B40-8	φX174
	mar	río*	mar	río	mar	mar
Nailon 11 μm	16.1	-6.9	-20.0	0.0	21.0	-1.5
	-16.0	-36.0	8.8	17.6	-51.9	15.2
	-5.6	11.6	18.3	3.7		
	-28.6	10.5	-42.0			
	-41.5	-0.4	-3.4			
Media	-15.1	-4.2	-7.7	7.1	-15.5	6.9
desviación est.	22.0	19.4	24.0	9.3	51.5	11.8
AP25	-28.3	-5.2	-13.8		38.6	-15.9
	-22.5	0.0	-19.0		15.4	-14.3
	-16.7		-25.8			
	-44.0		-29.0			
	-35.6		-72.6			
Media	-29.4	-2.6	-32.0		27.0	-15.1
desviación est.	10.7	3.7	23.4		16.4	1.1
Polipropileno 10 μm	-16.6	-5.5	-8.4		-20.6	16.5
	-36.9	24.6	-40.5		16.1	-14.5
	14.9		-26.2			
	-5.6		10.7			
	-20.3		-10.4			
Media	-12.9	9.6	-15.0		-2.3	1.0
desviación est.	19.2	21.3	19.4		26.0	21.9
Whatman 1	-80.9	23.4	-18.3	-18.8	1.7	7.2
	-43.3	29.3	4.6		13.8	-16.0
	9.3		9.4			
Media	-38.3	26.4	-1.4	-18.8	7.8	-4.4
desviación est.	45.3		14.8		8.6	16.4
Whatman 6	-19.7		22.9			
	6.5		-11.6			
	-15.7		-2.6			
Media	-9.6		2.9			
desviación est.	14.1		17.9			

*En agua de río, además de MAR9 y/o MS2, también habían fagos salvajes.

- Turbidez de las muestras iniciales: agua de mar = ≤ 2 NTU; agua de río = ≥ 31 NTU.
- Concentración del bacteriófago objeto de estudio: 6 – 240 pfp/ml.
- Cálculo del porcentaje de retención: $100 - [(fagos \text{ que han pasado el prefiltro} / fagos \text{ iniciales en la muestra}) \times 100]$.
- Cada valor de retención constatado corresponde a un experimento independiente. La concentración de fagos, tanto antes como después de prefiltrar la muestra, se determinó a partir de 3, 5 ó 7 placas.

Mayo 1998

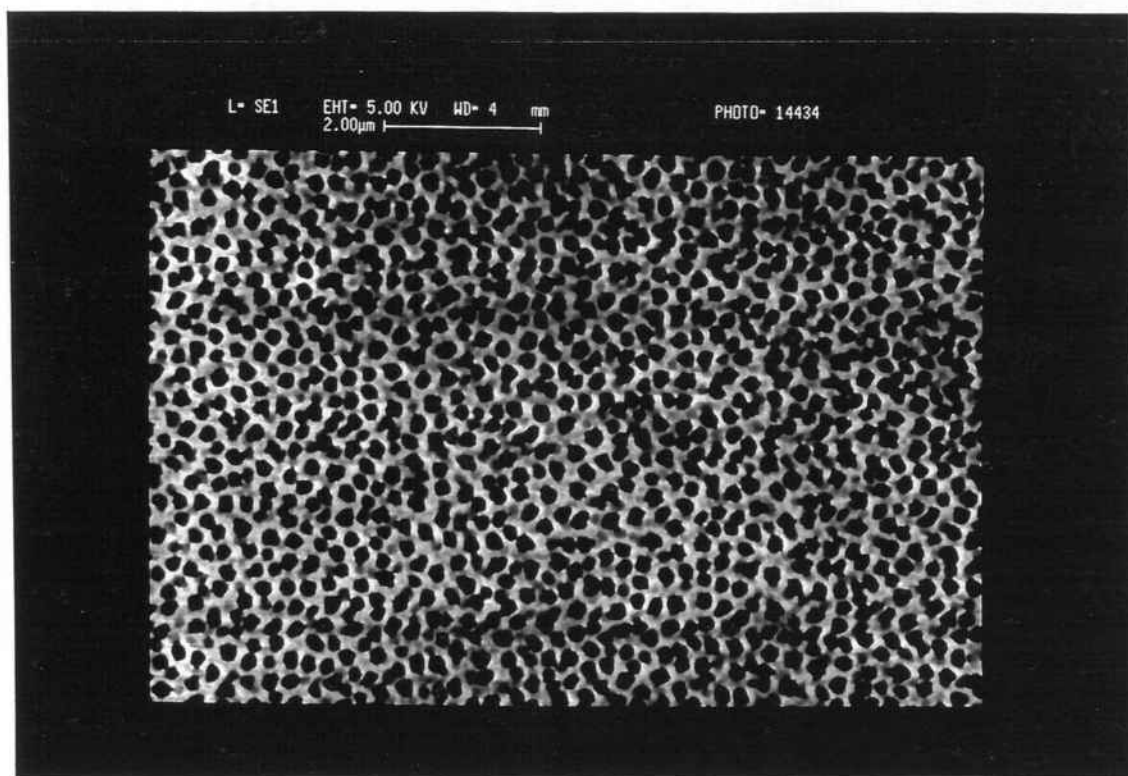
3.3.1.7 Membranas observadas al microscopio electrónico de barrido

En la Figura 3.16 presentamos las microfotografías obtenidas al observar membranas de diferentes materiales con el microscopio electrónico de barrido (M.E.S.)

NOTA: Este trabajo se ha realizado con la ayuda técnica de los *Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona*, y concretamente agradecer a Ramon su colaboración en este estudio (Marzo 1997).

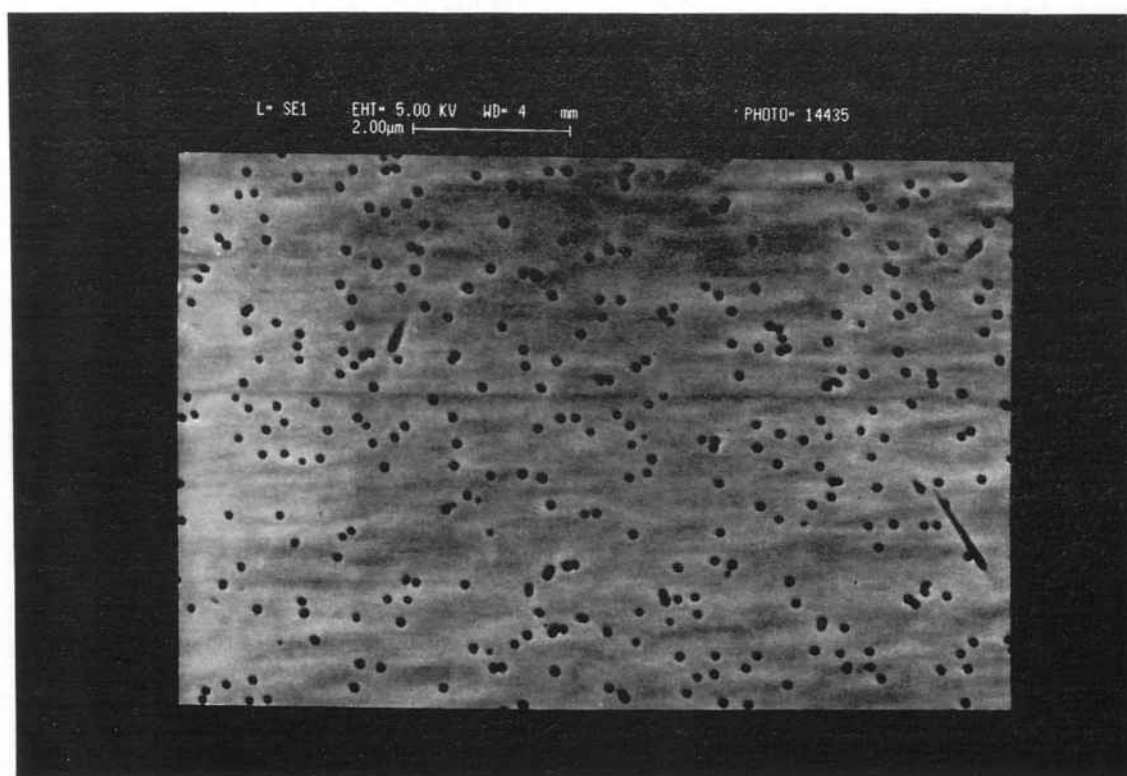
Figura 3.16. Fotografías de superficie de membranas obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (fotografías 1, 2, 3, 4 y 5).

Fotografía 1. Filtro inorgánico de óxido de aluminio de $0.2\ \mu\text{m}$

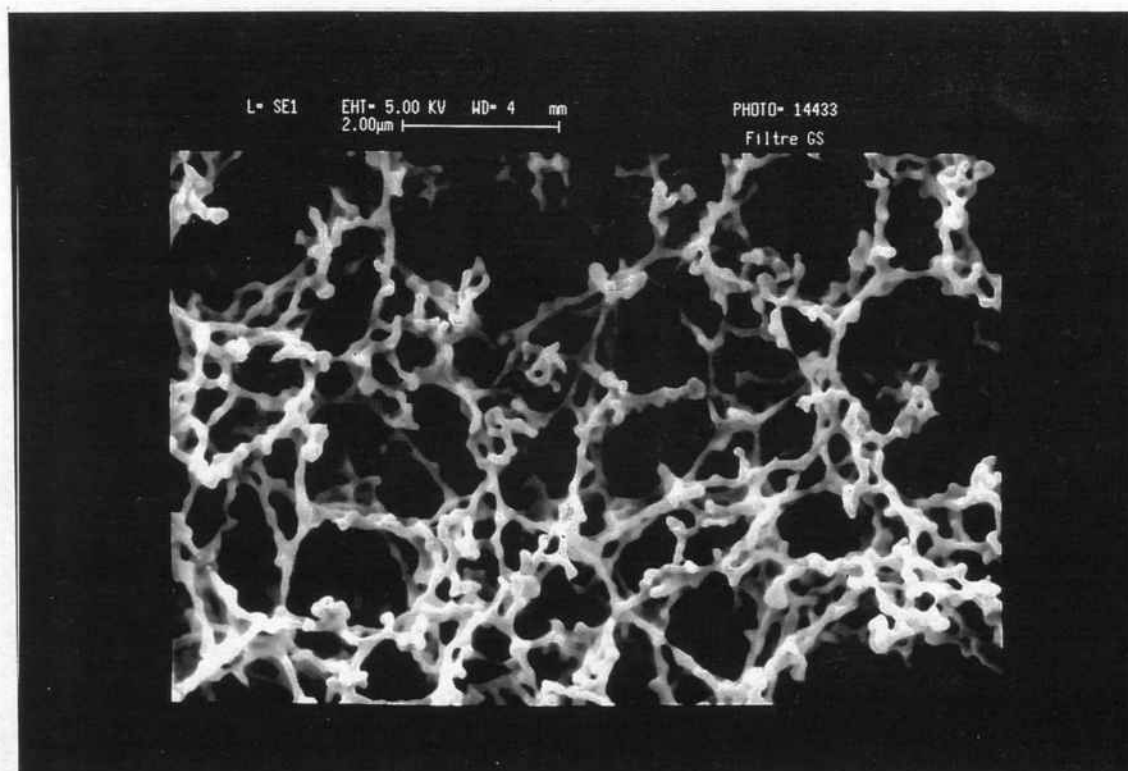


Continuación Figura 3.16 de imágenes obtenidas con el M.E.S.

Fotografía 2. Filtro de policarbonato de 0.1 μm

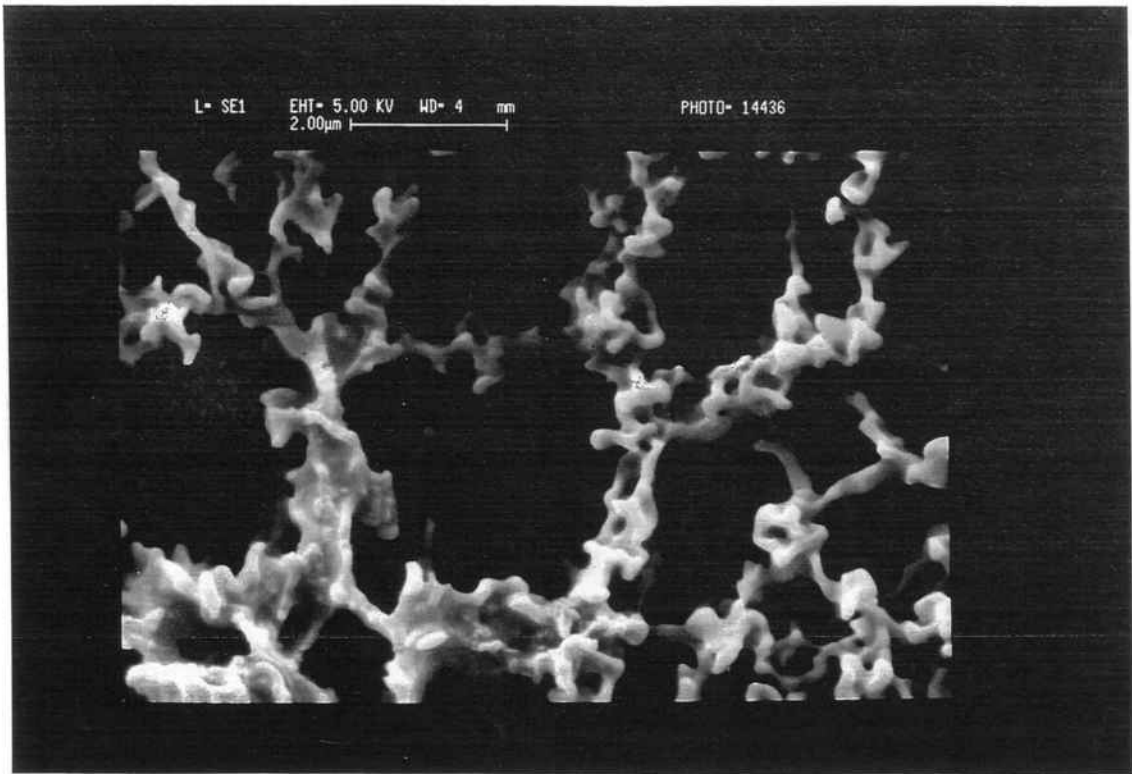


Fotografía 3. Filtro acetato/nitrato de celulosa de 0.22 μm



Continuación Figura 3.16 de imágenes obtenidas con el M.E.S.

Fotografía 4. Filtro de nitrato de celulosa de 0.45 μm



Fotografía 5. Filtro de fibra de vidrio



3.3.2 MÉTODOS DE FLOCULACIÓN

3.3.2.1 Floculación orgánica con extracto de carne

(Ref: Katzenelson *et al.*, 1976)

□ Floculación orgánica como método de concentración primario.

Los resultados obtenidos después de la floculación orgánica aplicada a muestras de un litro de ríos y salidas de plantas depuradoras se muestran en la Tabla 3.26.

Tabla 3.26. Floculación orgánica de muestras de agua dulce.

Experimentos	Cuantificación directa, pfp/ml			Desc. est.	% recuperado después de la floculación		
	SOM	F-TOT	BfHSP		SOM	F-TOT	BfHSP
V= 1000 ml Junio- Septiembre 1996	10 ¹ -10 ⁴	10 ¹ -10 ⁴	0-10 ²	n	36	35	27
				x	13.1	19.4	25.9
				sd	9.4	17.7	26.1
				max	37.7	75.3	100
				min	0	0.3	0

Est.: estadísticos descriptivos

SOM: colifagos somáticos; F-TOT: fagos F-específicos totales; BfHSP: fagos de *Bact. fragilis* HSP40

De 8 muestras negativas para fagos de *Bact. fragilis* por titulación directa (5 ml), 2 resultaron positivas tras concentración por floculación orgánica (volumen de concentrado analizado equivalente a 40 ml directos); sin embargo, 2 muestras positivas por análisis directo dieron resultados negativos después de la concentración. No se observó relación entre porcentaje de recuperación y número de bacteriófagos en la muestra inicial.

□ Floculación orgánica como método de reconcentración.

La aplicación de la floculación orgánica como método de reconcentración tras la elución de los filtros electropositivos con tampón glicina no brindó resultados satisfactorios.

En efecto, la eficiencia media del método de floculación orgánica fue de 12.9 ± 26.5 y 1.6 ± 2.2 para colifagos somáticos y fagos F-específicos respectivamente; no se pudieron calcular porcentajes de recuperación para fagos de *Bact. fragilis* HSP40. De 29 concentrados, 12 fueron positivos para colifagos somáticos, 3 para F-específicos y 1 para fagos de *Bact. fragilis* HSP40. Es curioso que el número de muestras positivas para fagos F-específicos disminuyó de 6 inicialmente en el análisis del tampón glicina a 3 después de la floculación.

Tabla 3.27. Concentración secundaria por floculación orgánica (F.O.) después de la elución de filtros electropositivos.

	% positivos en el tampón glicina			% positivos después de la F.O.		
	SOM	F-TOT	BfHSP	SOM	F-TOT	BfHSP
Mar	6/12	1/12	0/6	5/12	0/12	0/6
n= 12	50	8.3	0	41.7	0	0
Agua dulce*	7/17	5/17	1/17	7/17	3/17	1/17
n= 17	41.2	29.4	5.9	41.2	17.6	5.9

*Agua dulce: pantanos, ríos, ETAP.

SOM: colifagos somáticos; F-TOT: fagos F-específicos totales; BfHSP: fagos de *Bact. fragilis* HSP40

3.3.2.2 Precipitación de extracto de carne con sulfato amónico

(Ref: Shields y Farrah, 1986)

La Tabla 3.28 presenta los resultados globales obtenidos por floculación con sulfato amónico de muestras marinas de 100 ml sembradas con bacteriófagos de laboratorio y tratadas con un 10 % de extracto de carne.

Tabla 3.28. Agua de mar. Resultados globales.

Experimentos	Fechas	Virus de cada tipo en la muestra inicial	Est.	% recuperado después de la floculación		
				MAR9	MS2	B40-8
V= 100 ml n= 12	Abril-Mayo 1996	1-10 ³ pfp / ml	x	33.9	48.5	50.3
			sd	32.3	19.1	46.0
			max	97.4	70.8	100
			min	2.0	17.5	1.5

Est.: estadísticos descriptivos.

Para el fago B40-8, 5 resultados de 12 son superiores al 100%.

En un análisis de la eficiencia de recuperación del método teniendo en cuenta la concentración de bacteriófagos en la muestra inicial antes de flocular, observamos las diferencias que se presentan en la Tabla 3.29.

Las recuperaciones del fago MS2 son relativamente buenas independientemente de la concentración inicial en la muestra, mientras que la eficiencia del método disminuye notoriamente para MAR9 y B40-8 cuando la concentración inicial <5 pfp/ml. Observamos que la titulación de 0.5 ml de concentrado en una placa de 90 mm de diámetro interfiere con el crecimiento del césped bacteriano de los huéspedes *E. coli* CN13 y *Bact. fragilis* HSP40, mientras que la cepa de *S. typhimurium* WG49 crece sin problemas aparentes. Posiblemente la interferencia de altas concentraciones de extracto de carne y/o sulfato amónico con el crecimiento bacteriano afecte a la eficiencia de recuperación del método.

Tabla 3.29. Eficiencia del método de floculación con sulfato amónico a distintas concentraciones iniciales de bacteriófagos.

Bacteriófago	Concentración inicial (pfp/ml)	Experimentos	% recuperado después de la floculación ^a
MAR9	40-600	7	54.1 (± 27.6)
	3.4	5	5.5 (± 3.2)
MS2	30-960	7	43.8 (± 18.8)
	1.6	5	55.0 (± 19.6)
B40-8	20-100	7	83.3 (± 29.1) ^b
	4.4	5	4.2 (± 2.0)

^aentre paréntesis, la desviación estándar^bpara B40-8, 5 resultados de 7 son superiores a 100 %

3.3.2.3 Floculación por hidróxido de magnesio

(Ref: Schulze y Lenk, 1983)

Inicialmente realizamos la concentración con $Mg(OH)_2$ de muestras de 1 litro, siguiendo el procedimiento descrito por Schulze y Lenk (1983) básicamente sin modificaciones. Los resultados globales en agua de mar, río y agua de distribución con stocks de bacteriófagos se presentan de forma resumida en las Tablas 3.30, 3.31 y 3.32 respectivamente. Dichos resultados apuntan que, a concentraciones iniciales de 0.1 a 127 pfp de los bacteriófagos modelos por mililitro de muestra, la tasa de recuperación del método es independiente del número de bacteriófagos iniciales en la muestra y que la eficiencia del método es alta. De igual forma, experimentos de floculación con B56-1 (bacteriófago que infecta a *Bact. fragilis* RYC2056) en agua de mar presentaron una eficiencia de recuperación superior a 100. Sin embargo, estudios posteriores con $\phi X174$ (colifago somático de la familia *Microviridae*) mostraron la incapacidad de esta metodología para concentrar dicho bacteriófago (Tabla 3.33).

Tabla 3.30. Floculación por $Mg(OH)_2$ de agua de mar infectada con bacteriófagos.

Volumen	Fechas	pfp/ml iniciales			Desc. est.	% recuperado después de la floculación		
		MAR9	MS2	B40-8		MAR9	MS2	B40-8
1000 ml	Nov				n	13	15	18
	1996				x	95.7	87.6	100
	Abr	8.4-	2.1-	0.1-	sd	6.3	19.9	-
	1997	126.8	87.2	30.0	max	100	100	100
					min	83	34.5	100

Est.: estadísticos descriptivos.

Rango de turbidez de las muestras: 0.5-13 NTU.

pH de floculación = 8.6 ± 0.2 (excepto 2 muestras, a pH 9.11 y 9.22, que hacen bajar la media de recuperación del bacteriófago MS2).

Para MAR9, 8 resultados de 13 son superiores a 100%; para MS2, 7 resultados de 15 son superiores a 100%; para B40-8, los 18 resultados son superiores a 100%.

Tabla 3.31. Floculación por Mg(OH)₂ de agua de río infectada con bacteriófagos.

Volumen	Fechas	pfp/ml iniciales*			Desc. est.	% recuperado después de la floculación*		
		MAR9	MS2	B40-8		MAR9	MS2	B40-8
1000 ml	Febrero- Marzo 1997	3.0- 55.4	11.3- 40.5	0.6- 64.8	n	9	7	9
					x	81.5	41.3	100
					sd	25.4	26.7	-
					max	100	80.7	100
					min	34.9	12.3	100

Est.: estadísticos descriptivos.

*Bacteriófagos de laboratorio añadidos y fagos naturales que se encontraban en las muestras de río.

Rango de turbidez de las muestras: 1.1-60 NTU.

pH de floculación = 9.1 ± 0.2

Para MAR9, 3 resultados de 9 son superiores a 100%; para B40-8, los 9 resultados son superiores a 100%.

Tabla 3.32. Floculación por Mg(OH)₂ de agua de distribución infectada con fagos.

Volumen	Fechas	pfp/ml iniciales		Est.	% recuperado después de la floculación	
		MAR9	MS2		MAR9	MS2
1000 ml	Abril 1997	2.6-17.4	8.1-20.0	n	8	8
				x	84.4	70.7
				sd	17.5	22.7
				max	100	100
				min	56.9	37

Est.: estadísticos descriptivos.

pH de floculación = 8.8 ± 0.4

Para MAR9, 2 resultados de 8 son superiores a 100%; para MS2 un resultado de 8 es superior a 100%.

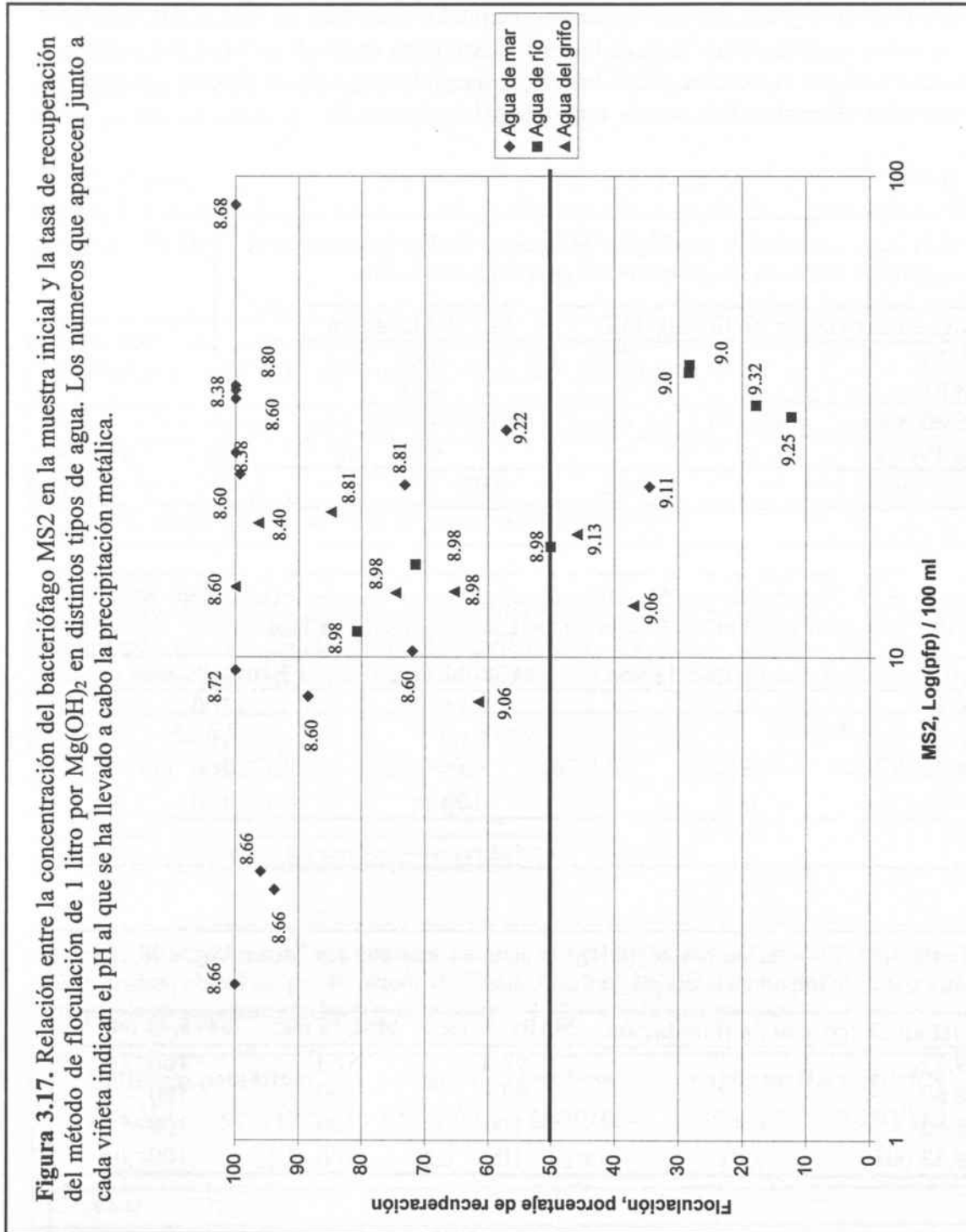
Tabla 3.33. Floculación por Mg(OH)₂ de muestras con el bacteriófago ϕ X174 añadido.

Volumen	Fechas	Muestras	pfp/ml iniciales	% recuperado después de la floculación
1000 ml	Marzo 1998	Mar, n= 3		2.2
		Río, n= 2	34-53	5.0
		Distribución, n= 2		7.4

pH de floculación = 8.6 ± 0.1

Una observación que destacamos fue la baja recuperación del fago F-RNA en agua de río (x = 41.3 %) en comparación con MAR9 y B40-8 (>80 %). De acuerdo con la bibliografía, esta baja eficiencia de recuperación podría ser debida a la sensibilidad de MS2 a pH alto. Un análisis más detallado de los resultados en relación con el protocolo de trabajo nos señala la importancia del pH en el proceso de floculación. Habíamos

fijado un volumen de 2 ml de NaOH 2M que se traducía en un pH durante el proceso de floculación de 8.6 ± 0.2 en agua de mar y un pH de floculación de 9 o superior en agua de río; estas diferencias de pH se explican por la capacidad tamponadora del agua de mar. En la Figura 3.17 podemos observar que las recuperaciones inferiores al 50% para MS2 se asocian a un pH durante el proceso de floculación igual o superior a 9.0. Posteriormente realizamos ensayos de floculación a pH entre 8.4 y 9.2 para comprobar las eficiencias de recuperación de MS2.



Variaciones metodológicas

- Efecto del pH durante la floculación en la recuperación de diferentes bacteriófagos.

En las Tablas 3.34, 3.35 y 3.36 se muestran las eficiencias del método de concentración en función del pH durante el proceso de floculación, con distintos tipos de agua y bacteriófagos añadidos. Los resultados que aparecen en cada una de las tablas mencionadas anteriormente corresponden a un mismo lote experimental. La valoración conjunta de todos los resultados de floculación por $Mg(OH)_2$ con MAR9, MS2 y B40-8 en relación con el pH al que se realiza la precipitación indican: (i) que el pH aceptable para la concentración de los bacteriófagos F-específicos de RNA es 8.6 ± 0.2 y (ii) que tanto los colifagos somáticos como los fagos que infectan a *Bact. fragilis* HSP40 son concentrados eficientemente en este rango de pH.

Tabla 3.34. Floculación por $Mg(OH)_2$ de agua de distribución con el bacteriófago MS2 añadido; importancia del pH de floculación.

pH en el proceso de floculación	% recuperación
9.13	45.9
8.81	84.8
8.60	100
8.40	96.3

9-4-97

Tabla 3.35. Floculación por $Mg(OH)_2$ de agua de mar con los bacteriófagos MS2 y B40-8; importancia del pH de floculación para la recuperación de fagos.

pH en el proceso de floculación	MS2, % rec.	B40-8, % rec.
9.11	34.5	100
8.81	73.2	100
8.60	99.3	100
8.38	100	100

15-4-97

Tabla 3.36. Floculación por $Mg(OH)_2$ de agua de mar con los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8; importancia del pH de floculación.

pH en el proceso de floculación	MAR9, % rec.	MS2, % rec.	B40-8, % rec.
9.22	93.3	57.1	100
8.80	92.1	100	100
8.60	100	100	100
8.38	100	100	100

17-4-97

- Comparación de la eficiencia de recuperación del floculado por centrifugación y por filtración.

El método de floculación por hidróxido de magnesio requiere la centrifugación de aproximadamente 200 ml de sedimento suelto para obtener un precipitado blanco que contiene sales, bacterias y virus. Nosotros realizamos algunos experimentos con el objetivo de evaluar la posibilidad de utilizar un filtro para retener los flóculos y facilitar el trabajo a aquellos laboratorios que no tienen centrifugas.

Los resultados de la Tabla 3.37 muestran que con los prefiltros de celulosa Millipore AW1904700 (3µm), AW0604700 (1.2 µm) y AW0304700 (0.6 µm) no conseguimos buenas recuperaciones de bacteriófagos, aunque la filtración del sedimento suelto a través de ellos era relativamente rápida (algo menos de 5 minutos).

Las Tablas 3.38 y 3.39 comparan los porcentajes de recuperación del método de floculación obtenidos por centrifugación y por filtración a través de un prefiltro de fibra de vidrio (1340047Q; Sartorius) para atrapar los flóculos.

Tabla 3.37. Utilización de prefiltros de celulosa para capturar los flóculos en el método de floculación por $Mg(OH)_2$; experimentos con agua de distribución.

% rec.	centrífuga	AW 3 µm	centrífuga	AW 1.2 µm	centrífuga	AW 0.6 µm
MAR9	100	30	-	-	91.2	17.1
MS2	-	-	70.0	20.4	-	-

Cada valor corresponde a la media de dos experimentos de floculación.

Tabla 3.38. Porcentajes de recuperación utilizando un prefiltro de fibra de vidrio Sartorius comparado con el método de centrifugación para atrapar los flóculos después de la sedimentación por $Mg(OH)_2$ de agua de distribución (MAR9, MS2) y río (B40-8).

MAR9		MS2		B40-8	
<u>filtración</u>	<u>centrífuga</u>	<u>filtración</u>	<u>centrífuga</u>	<u>filtración</u>	<u>centrífuga</u>
78.2	76.5	37.8	49.2	100	100

Cada valor corresponde a la media de dos experimentos de floculación.

Tabla 3.39. Análisis de una muestra natural de río. Comparación de los porcentajes de recuperación obtenidos por el método de floculación inorgánica aplicando la centrifugación y atrapando el sedimento suelto con un prefiltro de fibra de vidrio Sartorius.

Colifagos somáticos		Fagos F-específicos		Fagos de <i>Bact. fragilis</i>	
<u>filtración</u>	<u>centrífuga</u>	<u>filtración</u>	<u>centrífuga</u>	<u>filtración</u>	<u>centrífuga</u>
70.3	75.0	72.6	100	100	100

Los resultados anteriores parecen indicar que es posible concentrar el sedimento suelto que se obtiene durante el proceso de floculación por hidróxido de magnesio, en un prefiltro de fibra de vidrio de tamaño de poro intermedio. Los inconvenientes de esta alternativa a la centrifugación son principalmente: (i) la tasa de flujo a través del prefiltro de 47 mm de diámetro (más de 40 minutos para concentrar el sedimento resultante de la floculación de un litro) y (ii) el prefiltro despedazado formando parte del concentrado.

- Concentrado final suspendido en tampón de fagos.

Aunque el protocolo inicial de Schulze y Lenk (1983) proponía la utilización de caldo nutritivo tamponado para suspender el precipitado obtenido por centrifugación, nuestros experimentos los llevamos a cabo con tampón de fagos pH 7.0 (solución habitualmente utilizada para el mantenimiento de los fagos). Realizamos algunas pruebas en paralelo con TSB (pH 7.1) y con tampón de fagos para asegurarnos que los porcentajes de recuperación del método no se veían afectados por la utilización de uno u otro componente.

Como resultado de la floculación por hidróxido de magnesio de 1 litro de muestra obtenemos aproximadamente 30 ml (27-35 ml) de concentrado blanco y espeso. En este proceso los flóculos de hidróxido de magnesio no se resuelven pero no parecen alterar la formación y recuento de las calvas sobre las bacterias huéspedes. La posibilidad de clarificar este concentrado pastoso y conseguir una mejor homogeneización fue una idea atractiva sugerida por compañeros que colaboraban en el proyecto europeo del que formaba parte este trabajo. Al añadir HCl al concentrado, comprobamos que los flóculos se disuelven a pH ácido. A través de diferentes pruebas físicas con el concentrado obtenido por floculación de agua de mar y distribución (n=12) determinamos el pH al cual el precipitado blanco empieza a disolverse; este pH en ningún caso es superior a 4.5. Preparamos tubos para la titulación de concentrados de mar y distribución ajustados a diferentes pH (1 ml concentrado + 1 ml bacteria huésped + 2.5 ml agar blando) y añadimos 0.1 ml de un stock (800 pfp/ml) del bacteriófago MS2 a cada tubo (80 pfp/tubo). No encontramos diferencias en el número de calvas sobre las placas que contenían un mililitro de los concentrados ajustados a pH comprendidos entre 4 y 7.6 mientras que no hubo crecimiento de la bacteria huésped en la placa que contenía un concentrado ajustado a pH 0.14. A pesar de estos resultados, no consideramos apropiado un concentrado final a pH 4 debido a los problemas de supervivencia de los bacteriófagos a pH ácido.

Finalmente decidimos utilizar tampón de fagos a pH 6.0 para disolver el sedimento obtenido por centrifugación, porque el pH final del concentrado quedaba más próximo a la neutralidad. La Tabla 3.40 resume el pH final de varios concentrados suspendidos con tampón a pH 7.0 y a pH 6.0. En la Tabla 3.41 se muestran las recuperaciones de fagos F-específicos y de *Bact. fragilis* HSP40, tras la concentración de efluente de agua residual (salida EDAR Gavá), obtenidas con la variante del tampón de fagos a pH 6.0. La eficiencia del método parece verse disminuida para los fagos de *Bacteroides* respecto a las recuperaciones obtenidas en agua de río con B40-8 añadido, pero esta interpretación puede ser engañosa. En realidad, uno de los problemas que acusamos con la concentración de muestras relativamente polucionadas es la flora acompañante en el concentrado final que crece en las placas y dificulta enormemente la lectura de las calvas de los fagos de *Bact. fragilis*.

Tabla 3.40. pH en el precipitado final resultado de la floculación por hidróxido de magnesio suspendido en tampón de fagos pH 7.0 ó pH 6.0. Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

	AGUA MARINA		AGUA DULCE	
	pH floc.	pH final	pH floc.	pH final
T fagos pH 7.0	8.56 (± 0.13) n=12	7.26 (± 0.08) n=12	8.55 (± 0.12) n=10	7.68 (± 0.09) n=10
T fagos pH 6.0	8.53 (± 0.08) n=6	7.0 (± 0.08) n=6	8.55 (± 0.08) n=8	7.33 (± 0.33) n=8

T fagos pH 7.0= tampón de fagos a pH 7.0; T fagos pH 6.0= tampón de fagos a pH 6.0; pH floc.= pH al cual se lleva a cabo la floculación; pH final= pH en el concentrado final; n= número de experimentos.

Tabla 3.41. Concentración de 1000 ml de efluente de agua residual por hidróxido de magnesio. Suspensión del sedimento después de centrifugar, con tampón de fagos pH 6.0. Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

pfp/ml iniciales		% recuperado después de la floculación	
F-TOT	BfHSP	F-TOT	BfHSP
590	4.8	74.1 (± 16.7) n=6	67.3 (± 16.1) n=6

F-TOT = fagos F-específicos totales; BfHSP= fagos de *Bact. fragilis* HSP40; n= número de experimentos de floculación.

Supervivencia de bacteriófagos en el concentrado

La floculación por $Mg(OH)_2$ tiene una duración no inferior a 1 hora y a esta etapa se le ha de sumar el tiempo requerido para la detección y cuantificación de bacteriófagos en el concentrado final. Si este método se utilizara en laboratorios de rutina, podría ser un desahogo saber si los bacteriófagos sobreviven en el concentrado durante un día a 4°C o bien si es más conveniente guardar la muestra directamente sin concentrar hasta el día siguiente de su recepción. En el intento de dar respuesta a esta cuestión, hicimos el seguimiento de bacteriófagos naturales en muestras concentradas por floculación inorgánica y en muestras de agua sin concentrar. Los resultados de supervivencia en el concentrado final se presentan en las tablas 3.42 y 3.43, y los resultados en muestras de agua directa sin concentrar se muestran en las tablas 3.44 y 3.46.

De forma global, observamos que los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 se inactivan menos que el resto de grupos. La estabilidad de los bacteriófagos durante un día a 4°C, tanto en el concentrado como en la muestra directa, es superior para los fagos de *Bacteroides* seguida por los colifagos somáticos que precede a la de los fagos F-específicos totales y, finalmente, los fagos F-específicos de RNA son los que peor resisten a estas condiciones experimentales (Tabla 3.45).

Tabla 3.42. Supervivencia de bacteriófagos concentrados por floculación de $Mg(OH)_2$. Cuantificación de fagos en el concentrado el día 0 (día de la floculación), almacenamiento a $5\pm 3^\circ C$ y enumeración de fagos el día 1 (día siguiente a la concentración).

pfp/ml Muestra	BfHSP		F-TOT		F-RNA		SOM	
	día 0	día 1	día 0	día 1	día 0	día 1	día 0	día 1
Agua residual b	3364	4108.7 (+22.1%)						
Agua mar infectada a	74.3	66.7 (-10.2%)	995	795 (-20.1%)	965	730 (-24.4%)	23182	14100 (-39.2%)
Agua mar infectada b	24	32.4 (+35%)	280	165 (-41.1%)	205	44 (-78.5%)	6052	6290 (+3.9%)
Agua mar infectada c	103.3	93.8 (-9.2%)	836.7	633.3 (-24.3%)	620	390 (-37.1%)	26733	24667 (-7.7%)
Agua río b			1483.3	713.3 (-51.9%)	816.7	293.3 (-64.1%)	7967	6033 (-24.3%)
Agua río c	1.7	1 (-41.2%)	12.5	11.3 (-9.6%)	2.5	0.75 (-70%)	1080	854 (-20.9%)

BfHSP: fagos de *Bact. fragilis* HSP40; F-TOT: fagos F-específicos totales; SOM: colifagos somáticos.

Las muestras de agua de mar se infectaron con agua residual (aproximadamente 25 ml de agua residual por 1000 ml de agua de mar).

Cada valor constatado (pfp/ml) corresponde a la media de 5 placas.

Los números entre paréntesis indican el porcentaje de pérdida (-) o ganancia (+) respecto al título del día 0 y se ha calculado de la siguiente forma: $[(\text{fagos el día 1} / \text{fagos el día 0}) \times 100] - 100$.

Para cada grupo de bacteriófagos por separado, comparamos las medias de los porcentajes de pérdida en el concentrado y en la muestra directa almacenados a $4^\circ C$ durante un día y no obtuvimos diferencias significativas en ningún grupo ($P > 0.05$). Así, nuestros estudios de supervivencia de bacteriófagos durante 24 horas a $4^\circ C$ nos indican que da igual almacenar la muestra original directamente o ya procesada durante un día. En cualquier caso, podemos perder alrededor de un 35% de fagos F-específicos, las pérdidas de somáticos no superarán el 15% y los fagos de *Bact. fragilis* prácticamente permanecerán igual al guardar la muestra un día. En el seguimiento de los bacteriófagos en las muestras directas y concentradas durante varios días, hasta un máximo de 10 días, se observó la misma tendencia que el día 1 respecto al día 0 (Tablas 3.43 y 3.46).

Tabla 3.43. Análisis de supervivencia de bacteriófagos en el concentrado final obtenido por floculación inorgánica. Almacenamiento del floculado a 4° C durante varios días.

Muestra pfp/ml	Fagos de <i>Bact. fragilis</i> HSP40			
Efluente agua residual a	día 0/ 7.7	día 2/ 1	día 6/ 3	día 9/ 1
Efluente agua residual b	día 0/ 4.4	día 2/ 0	día 10/ 0	
Agua de mar infectada a	día 0/ 24.8	día 2/ 32	día 6/ 21.7	
Agua de mar infectada b	día 0/ 24	día 1/ 32.4	día 3/ 23	

Muestra pfp/ml	Fagos F-específicos totales		
Efluente agua residual a	día 2/ 2350	día 6/ 1480	día 9/ 1120
Efluente agua residual b	día 0/ 386.4	día 2/ 610	día 10/ 148
Agua de mar infectada a	día 2/ 455	día 6/ 379	día 9/ 233
Agua de mar infectada b	día 0/ 280	día 1/ 165	día 3/ 134

Muestra pfp/ml	Fagos F-RNA		
Efluente agua residual b	día 0/ 359.1	día 2/ 585	día 10/ 134.5
Agua de mar infectada b	día 0/ 205	día 1/ 44	día 3/ 38

Muestra pfp/ml	Colifagos somáticos			
Efluente agua residual a	día 0/ 20900	día 2/ 19000	día 6/ 11700	día 9/ 11900
Efluente agua residual b	día 0/ 6500	día 2/ 9800	día 10/ 7880	
Agua de mar infectada a	día 0/ 11500	día 2/ 24500	día 6/ 15000	día 9/ 12900
Agua de mar infectada b	día 0/ 6052.4	día 1/ 6290	día 3/ 5660	

Cada valor constatado (pfp/ml) corresponde a la media de 5 placas.

Octubre 1997

Tabla 3.44. Supervivencia de bacteriófagos indígenas en muestras de agua en el laboratorio. Cuantificación de fagos el día 0 (primer día), almacenamiento a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ y enumeración de fagos el día 1 (día siguiente).

pfp/ml Muestra	BfHSP		F-TOT		F-RNA		SOM	
	día 0	día 1	día 0	día 1	día 0	día 1	día 0	día 1
Efluente agua residual b	0	0.1 (+100%)	44.5	22.3 (-49.9%)	42	21.3 (-49.3%)	1270	1600 (+26%)
Agua mar infectada a	2.4	2.1 (-12.5%)	168.6	45.5 (-73.0%)	161.4	37 (-77.1%)	2145.5	1140 (-46.9%)
Agua mar infectada b	1.1	1.1 (0%)	60.5	27.5 (-54.5%)	50.5	13 (-74.3%)	630	677.5 (+7.5%)
Agua mar infectada c	3.6	4.1 (+13.9%)	71.3	66 (-7.4%)	45.3	48.7 (+7.5%)	2016.7	1533.3 (-24%)
Agua río b			138.8	70.4 (-49.3%)	122.5	61.2 (-50.0%)	306	242 (-20.9%)
Agua río c	0.1	0 (-100%)	0.4	0.4 (0%)	0	0.4 (100%)	42	36.8 (-12.4%)

BfHSP: fagos de *Bact. fragilis* HSP40; F-TOT: fagos F-específicos totales; SOM: colifagos somáticos.

Las muestras de agua de mar se infectaron con agua residual (aproximadamente 25 ml de agua residual por 1000 ml de agua de mar).

Cada valor constatado (pfp/ml) corresponde a la media de 10 placas.

Los números entre paréntesis indican el porcentaje de pérdida (-) o ganancia (+) respecto al título del día 0 y se ha calculado de la siguiente forma: $[(\text{fagos el día 1} / \text{fagos el día 0}) \times 100] - 100$.

Tabla 3.45. Estabilidad de bacteriófagos naturales durante un día a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ en el concentrado obtenido por floculación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y en las muestras de agua directamente sin concentrar. Medias de los porcentajes de pérdidas y/o ganancias del título de bacteriófagos del día 1 respecto al día 0. Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

Medias de ganancias / pérdidas de fagos	de <i>Bact.</i> <i>fragilis</i> HSP40	F-específicos	F-RNA	Somáticos
Concentrado	-0.70 (± 30.0) n=5	-29.40 (± 16.9) n=5	-54.82 (± 23.0) n=5	-17.64 (± 16.4) n=5
Directo	0.28 (± 71.3) n=5	-39.02 (± 28.8) n=6	-23.87 (± 67.9) n=6	-11.78 (± 25.6) n=6
Total	-0.21 (± 51.6) n=10	-34.65 (± 23.5) n=11	-37.94 (± 52.7) n=11	-14.45 (± 21.1) n=11

Los porcentajes de pérdidas (-) o ganancias (+) para cada caso (muestra) se calcularon de la siguiente forma: $[(\text{fagos el día 1} / \text{fagos el día 0}) \times 100] - 100$.

Tabla 3.46. Análisis de supervivencia de bacteriófagos naturales en muestras directas guardadas a 4°C en el laboratorio durante varios días.

Muestra pfp/ml	Fagos de <i>Bact. fragilis</i> HSP40		
Agua residual a	día 0/ 131.7	día 8/ 59.8	
Efluente agua residual a	día 0/ 0.2	día 10/ 0	
Agua residual b	día 0/ 64	día 6/ 113.4	día 7/ 105.7
Agua de mar infectada b	día 0/ 1.1	día 1/ 1.1	día 3/ 1.1

Muestra pfp/ml	Fagos F-específicos totales		
Agua residual a	día 0/ 3350	día 8/ 4490	
Efluente agua residual a	día 0/ 96	día 10/ 45	
Agua de río a	día 0/ 6.1	día 3/ 1.9	
Agua de mar infectada b	día 0/ 60.5	día 1/ 27.5	día 3/ 31

Muestra pfp/ml	Fagos F-RNA		
Agua residual a	día 0/ 2300	día 8/ 3770	
Efluente agua residual a	día 0/ 71.2	día 10/ 39.5	
Agua de río a	día 0/ 3.4	día 3/ 0.5	
Agua de mar infectada b	día 0/ 50.5	día 1/ 13	día 3/ 19

Muestra pfp/ml	Colifagos somáticos		
Efluente agua residual a	día 0/ 2260	día 10/ 2480	
Agua de río a	día 0/ 150.2	día 3/ 140	
Agua de mar infectada b	día 0/ 630	día 1/ 677.5	día 3/ 470

Cada valor constatado (pfp/ml) corresponde a la media de 10 placas.

Octubre 1997

Flora acompañante en los concentrados

La adición de bilis a los medios de cultivo de *Bact. fragilis*, aumentó el número de calvas por placa una media de 1.35 veces respecto al cultivo sin bilis. Sin embargo, la bilis aumentó los problemas de visualización de calvas en los concentrados debido a que éstas se presentaban más borrosas (y en algunos casos se producía dispersión de la calva, con solapamiento, dando lugar a una zona clara en forma de cometa); además, este aditivo tampoco inhibía el crecimiento de muchos microorganismos contaminantes.

La utilización de 100 µg/ml de ácido nalidíxico y 300 µg/ml de kanamicina monosulfato mejoró notablemente la lectura de las calvas en las placas de concentrado, a pesar de que aún permitían cierto crecimiento de flora acompañante. Los resultados se presentan en la Tabla 3.47.

Antibióticos: 100 µg/ml de ácido nalidíxico y 100 (ó 300 en el agar blando) µg/ml de kanamicina		BPRM		BPRM + 0.25 % bilis	
		número de calvas/placa (media)		número de calvas/placa (media)	
Aspecto de las calvas	SIN ANTIBIÓTICOS	ANTIBIÓTICOS	SIN ANTIBIÓTICOS	ANTIBIÓTICOS	
	Es difícil ver las calvas en los concentrados	Calvas nítidas, menos flora acompañante	Calvas menos claras que sin bilis, crecen contaminantes	Calvas turbias en los concentrados, es difícil contar	
muestra A directa	0, 0, 3	1	0, 2, 3	1.7	3
muestra A concentrada	60, 63, 73	65.3	55, 64, 73	64	115, 150, 96
muestra B concentrada			39, 38, 23, 36, 38	34.8	120.3
muestra C concentrada			37, 33, 34, 26, 23	30.6	71, 84, 95, 99, 100
muestra D concentrada			47, 30, 35, 48, 35	39	89.8
muestra E directa	1, 7, 10	6	9, 9, 10	9.3	10, 10, 11
muestra E concentrada	228, 278, 302	269.3	313, 324, 336	324.3	306, 362, 400
					356
					322, 344, 380, 438, 444
					385.6

Muestras: agua de río (A, B, C, D dopadas con agua residual y muestra E infectada con stock del bacteriófago B40-8); muestra concentrada: titulación de fagos en el concentrado obtenido por floculación de Mg(OH)₂
BPRM: "Bacteroides Phage Recovery Medium", medio de recuperación de fagos de *Bacteroides* (Anexo 2.C)

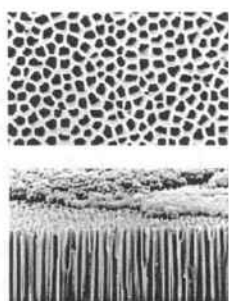
3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 MÉTODOS DE FILTRACIÓN

La estructura de las membranas la repasamos en el apartado de discusión de cada metodología de filtración por lo que no dedicaremos un apartado exclusivo para membranas al microscopio electrónico de barrido.

3.4.1.1 Filtros con baja actividad de unión a proteínas

3.4.1.1.1 Filtros inorgánicos ANODISC™



La imagen izquierda superior recuerda la estructura en forma de panal de abejas que presentan los filtros inorgánicos ANODISC™ de 0.2 μm vistos por la parte superior con el microscopio electrónico de barrido. La imagen izquierda inferior es una vista de la sección transversal de la membrana mostrando microsferas de látex de 0.23 μm retenidas en la superficie de la membrana. El grosor de la membrana es de aproximadamente 60 μm .

(Imágenes tomadas del catálogo de Anopore™, 1999)

Las membranas inorgánicas ANODISC™ están fabricadas de óxido de aluminio con una estructura de poro capilar uniforme, constituyen una superficie rígida y uniforme, permiten altas tasas de flujo y, en general, actuarían como filtros-pantalla (esto es, las partículas quedan retenidas en la superficie en vez de ser atrapadas a cierta profundidad dentro de la membrana). La porosidad de la superficie de los filtros de membrana de 0.2 μm de tamaño de poro es del 25-30 % y para los filtros de 0.1 μm es de un 40 %.

Los estudios de Tartera *et al.* (1992) habían mostrado que esta membrana inorgánica, tratada con extracto de carne, retenía la mayor parte de fagos de *Bacteroides fragilis* presentes en muestras de 10 ml de agua residual (>99%) y que los fagos retenidos podían recuperarse (>90%) por tratamiento con tampón glicina 0.25 M, pH 9.5. Más tarde, Lucena *et al.* (1995) examinan la conveniencia de estas membranas para concentrar fagos a partir de muestras de 1000 ml de diferentes tipos de agua. Las recuperaciones obtenidas para fagos de *Bact. fragilis* HSP40 en agua de bebida fueron alrededor del 50 %. La eficiencia del método para recuperar colifagos (procedentes de agua residual) añadidos a agua de bebida se acercaba al 30 %.

Nuestros ensayos se orientaron a la recuperación de los tres grupos de fagos (somáticos, F-RNA y de *Bact. fragilis*) a partir de volúmenes de 100 ml de agua de mar.

Los resultados preliminares de tanteo del método, más bajos de lo esperado para los colifagos MAR9 y MS2, nos hicieron pensar que podía haber un problema de inactivación de los fagos en el eluato. Decidimos probar si la neutralización del tampón glicina después de la elución del filtro mejoraba la eficiencia de recuperación de bacteriófagos. En realidad, los resultados empeoraron debido a la utilización de HCl 1 N. Pruebas con MAR9, MS2 y B40-8 diluidos en tampón de fagos, en agua de mar y en tampón glicina pH 9.5 durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente no dejaron entrever problemas de inactivación y/o agregación de dichos bacteriófagos en los medios acuosos utilizados durante el proceso de concentración (datos no mostrados).

Los resultados presentados ponen de relieve rápidamente que el fago MS2 no es recuperado después de la filtración a través de membranas inorgánicas ANODISC™, ya sean de tamaño de poro de 0.22 μm o de 0.1 μm , posiblemente debido a un problema de retención. Las mejores recuperaciones para MAR9 y B40-8 se obtienen indudablemente en agua de bebida embotellada, pero también es de destacar la eficiencia del método para B40-8 en agua de río y mar. Así, tenemos unos porcentajes de recuperación para B40-8 de 68.1 y 66.3 en río y mar, respectivamente, frente al 8.9 y 9.7 de fagos naturales de *Bact. fragilis* recuperados a partir de muestras de 1 litro obtenidos en estudios previos (Lucena *et al.*, 1995). En esta última observación debemos apuntar que el volumen procesado es un factor importante, pues el incremento de la cantidad de agua filtrada disminuye la eficiencia de concentración (Preston *et al.*, 1988; Tartera *et al.*, 1992; Sobsey, 1997). Por otro lado, los resultados con MAR9 en agua de río son comparables a los obtenidos por Lucena *et al.* (1995) en agua de bebida infectada con fagos somáticos del agua residual. La media de recuperación del colifago somático MAR9 en agua de mar no llega al 20 % pero mejora notablemente con la utilización de membranas de 0.1 μm . En efecto, las membranas de 0.1 μm recuperan mejor los tres bacteriófagos modelo que los filtros de 0.2 μm , hecho que nos invita a pensar en un aumento de la retención mecánica. De acuerdo con las observaciones de Tartera (1986), el fago B40-8 tendría una cabeza de 51 nm y una cola de 113 nm, que representaría una longitud de 0.16 μm y, según la orientación, podría quedar atrapado físicamente sobre el filtro o dentro del canal del poro. Este mecanismo físico no operaría con MS2, que hace unos 23 nm de diámetro (0.02 μm).

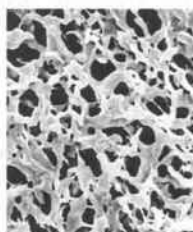
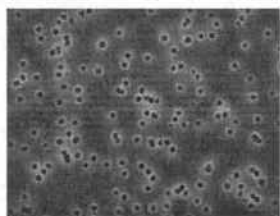
Lucena *et al.* (1995) obtienen mejores recuperaciones de B40-8 al utilizar membranas tratadas con extracto de carne en comparación a las eficiencias obtenidas con membranas no tratadas. Nuestros resultados, aunque no concluyentes, también apuntan que la adición de extracto de carne parece ser un factor importante para la retención de los tres bacteriófagos en la membrana. Sabemos que los aminoácidos que componen las proteínas pueden tener grupos no polares que carecen de afinidad para el agua y pueden servir de fuente de atracción para otros grupos no polares presentes en el ambiente (Mix, 1987). Algunos estudios sugieren que las interacciones hidrofóbicas son el principal factor en la adsorción de virus por microfiltración a pH alto mientras que las fuerzas electrostáticas son dominantes a pH bajo (Farrah, 1982). Otra posible función del extracto de carne en la membrana podría ser la reducción del tamaño de poro del filtro, favoreciendo la retención mecánica de los fagos de mayor tamaño. En cuanto a la elución, si sabemos que el número de bacteriófagos en la muestra es muy bajo, puede ser práctico filtrar un volumen adecuado (por ej. 1 litro) y colocar la membrana directamente en la placa sin eluir; por el contrario, si el número de bacteriófagos en la muestra es relativamente grande, el método parece más eficiente cuando se aplica elución con tampón glicina pH 9.5.

La eficiencia del método disminuye con el aumento de la turbidez de la muestra, tal y como señalan con anterioridad Lucena *et al.* (1995) y de acuerdo también con otros autores (Gerba *et al.*, 1978; Rose *et al.*, 1984; Sobsey y Glass, 1984; Borrego *et al.*, 1991). En este caso parece que la adsorción de los virus a la membrana se ve afectada por la presencia de otras macromoléculas presentes en las aguas naturales.

Otra observación que apuntamos es el número de muestras en que el porcentaje de recuperación de B40-8 es superior a 100 y puede ser atribuible a la disociación de agregados debido al proceso de filtración.

En resumen, la utilización de membranas inorgánicas ANODISC™ proporciona un método práctico, rápido y eficaz para concentrar fagos de *Bacteroides fragilis* en muestras ambientales (potables, ríos, mar) de 100 ml sin acondicionamiento previo. Aunque las recuperaciones de colifagos somáticos con membranas de 0.1 μm son aceptables, la incapacidad de los filtros inorgánicos para retener el colifago modelo de F-RNA, MS2, hacen que este método no sea escogido para el trabajo de campo.

3.4.1.1.2 Filtros de policarbonato y de PVDF



La fotografía de la izquierda corresponde a la superficie de una membrana Isopore y la imagen de la derecha es una fotomicrografía de una membrana Durapore de 0.22 μm .

(Imágenes tomadas del catálogo Millipore®: <http://www.millipore.com>. Consulta: 20/4/99)

Las membranas Isopore™ (Millipore Corp.) son filtros-pantalla fabricados en policarbonato translúcido mediante el procedimiento de “grabado de huellas” (*track etching*), presentan una superficie totalmente lisa y un diámetro de poro perfectamente definido y uniforme. El grosor de la membrana es de aproximadamente 10 μm , la porosidad de los filtros de 0.2 μm es del 14 % y de los filtros de 0.1 μm es del 24 %.

Las membranas Durapore® (Millipore Corp.), constituidas de di-fluoruro de polivinilideno (PVDF), no son quebradizas y no se rompen durante una manipulación normal. La tasa de adsorción inespecífica de proteínas de una membrana Durapore hidrófila es del orden de 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, unas cien veces menor que la de los ésteres de celulosa (Millipore Corp.).

Realizamos pruebas de retención de bacteriófagos con membranas de policarbonato de 0.2 μm y 0.1 μm de tamaño de poro (Isopore™, ref: GTTP04700 y VCTP) y con membranas de PVDF de 0.2 μm (Durapore®, ref: GVWP04700).

Seguimos el mismo protocolo de trabajo utilizado para la concentración de fagos con membranas inorgánicas de óxido de aluminio (apartado 3.2.2.1).

Comprobamos que al pasar 100 ml de agua de mar, tanto a través de los filtros de policarbonato como del filtro de PVDF, éstos retenían sólo del 0 al 10 % de los fagos MAR9, MS2 y B40-8 añadidos a concentraciones finales de 10^{-10^2} pfp/ml (datos no mostrados en el apartado de resultados).

En realidad, las membranas de policarbonato están fabricadas para garantizar una separación precisa por tamaño y su tasa de adsorción es mínima. De forma similar, Borrego *et al.* (1991) también constataron una deficiente adsorción y una pésima recuperación (0.5 %) de colifagos somáticos tras la filtración de 50 ml de efluente secundario de agua residual con membranas de policarbonato de 0.45 μ m (Nucleopore Corp.) tratadas con PEI (polietileneimina) para cargarlas positivamente. Sobsey y Glass (1984) utilizaron filtros de policarbonato de 0.2 μ m como prefiltros para eliminar sólidos en suspensión. En este caso los prefiltros de policarbonato fueron escogidos por su baja afinidad por compuestos orgánicos solubles y porque su composición química inerte no afectaría los niveles de orgánicos solubles en las muestras de agua.

Comprobada la baja adsorción de proteínas de los filtros de di-fluoruro de polivinilideno, Tartera *et al.* (1992) recomiendan la utilización de filtros de membrana PVDF sin tratamiento con extracto de carne para descontaminar muestras ambientales antes de la cuantificación de fagos de *Bacteroides fragilis* por el método de la doble capa de agar con BPRM.

Así, los filtros de policarbonato y de PVDF pueden ser útiles como prefiltros o para descontaminar muestras ambientales pero no son apropiados para la concentración de virus.

3.4.1.2 Filtros de celulosa modificados por precipitación “*in situ*” de hidróxidos férrico y aluminico.

La habilidad de los precipitados metálicos para adsorber virus del agua ha conducido a esfuerzos para utilizar dichos precipitados en sistemas de flujo a través. La formación de los flóculos “*in situ*” (dentro o alrededor de las fibras del filtro) evita el problema de atrapar los flóculos preformados con filtros que, o bien son demasiado porosos y no retienen los flóculos o los poros son demasiado pequeños y se obstruyen rápidamente (Farrah y Preston, 1985; Farrah *et al.*, 1991). La precipitación “*in situ*” de sales metálicas puede permitir la producción de filtros relativamente simples y baratos para recuperar virus del agua.

El método de concentración de virus a partir del agua con filtros de celulosa modificados por precipitación “*in situ*” de hidróxidos férrico y aluminico, había proporcionado unas recuperaciones del fago MS2 (añadido a una concentración de 10^5 pfp/ml de agua de bebida) de 68 ± 10 % en los trabajos de Farrah y Preston (1985). Estos autores habían obtenido las mejores tasas de adsorción y elución para el fago MS2 a partir de filtros de celulosa tratados con soluciones conteniendo 0.5 M de cloruro férrico y 0.5 M de cloruro de aluminio, y posterior pase por hidróxido sódico 1 N.

Aunque en nuestros experimentos aplicamos la modificación de los filtros de celulosa que había dado mejores resultados en el estudio de referencia, no conseguimos recuperaciones consistentes y aceptables para MAR9, MS2 y B40-8 añadidos a agua de mar natural. Farrah y Preston (1985) reportaron que las eficiencias de recuperación eran variables dependiendo del tipo de virus, pero las modificaciones que nosotros aplicamos al método (tratamiento de la membrana con extracto de carne o cambios en el pH de elución) tampoco aportaron resultados satisfactorios con MS2.

En el trabajo de referencia (Farrah y Preston, 1985), el cambio de pH de 7 a 9, en el tampón conteniendo virus para filtrar, resultaba en una reducción drástica de la adsorción de virus. La variación en la adsorción con los cambios de pH sugiere que las interacciones electrostáticas son un factor importante en la adsorción de virus a los filtros modificados. Es posible que la adsorción de los virus contenidos en el agua de mar a los filtros modificados sea poco eficiente debido a la interacción de las sales con la adsorción. En realidad, se sabe que ligeras diferencias en las concentraciones de sales, tiene profundos efectos sobre el comportamiento de los virus en el ambiente acuático (Gerba, 1987).

Se han estudiado otros procedimientos para incrementar la carga sobre tierra de diatomeas y filtros microporosos. Se han utilizado polímeros catiónicos o sales metálicas para modificar tierra de diatomeas (Brown *et al.*, 1974; Farrah *et al.*, 1991) y filtros microporosos (Sighn y Gerba, 1983; Preston *et al.*, 1988; Borrego *et al.*, 1991). Estos métodos aumentan la adsorción de los virus a estos materiales modificados, pero en ningún caso se ha probado la eficiencia para concentrar bacteriófagos en agua de mar.

En definitiva, junto a los bajos porcentajes de recuperación de bacteriófagos fecales en agua de mar, observamos que el método de concentración con filtros de celulosa modificados "*in situ*" presenta otros inconvenientes asociados a la elaboración manual de los filtros: (i) Dificultad para establecer controles de calidad rigurosos en la producción de los filtros, ya que diferentes lotes de filtros podrían presentar diferencias adsorptivas. Esto añade una elevada variabilidad en la recuperación de virus a partir del agua. (ii) Problema de definición de la estabilidad de los filtros modificados en el tiempo. Además, parece importante controlar el pH inicial de la muestra y la tasa de flujo durante la filtración, para garantizar una buena adsorción de los fagos al filtro.

Por todos los inconvenientes comentados más arriba, concluimos que el método de concentración de virus utilizando filtros de celulosa modificados por precipitación "*in situ*" de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ y $\text{Al}(\text{OH})_3$ no cumplía los requisitos del método que buscábamos (eficiencias de recuperación aceptables para los tres grupos de fagos, fácilmente aplicable en laboratorios de rutina,...) y abandonamos su estudio en este punto.

3.4.1.3 Filtros electropositivos Zeta Plus

En nuestro laboratorio se procesaban muestras ambientales concentradas con cartuchos filtrantes Zeta Plus® MK 100 (AMF Cuno, Meriden USA) para la detección de enterovirus y aprovechamos dicha metodología utilizada en análisis rutinarios para valorar su eficiencia en la concentración de bacteriófagos.

Los filtros en cartucho MK Zeta Plus® están compuestos de una mezcla de celulosa y fibras de vidrio combinadas con resina melamina. Estos cartuchos tienen una estructura de densidad graduada. Unos poros progresivamente más pequeños y más numerosos entre la superficie cargada interna y externa crean el efecto mecánico de captura. El cartucho, que presenta una carga neta positiva, adsorbe electrocinéticamente contaminantes coloidales mucho más pequeños que lo que se eliminaría por filtración mecánica solamente. Los filtros electropositivos 1 MDS (Virosorb®) están constituidos por fibra de vidrio con resina modificada en superficie, se suelen utilizar dos capas en el proceso de filtración y su coste económico es unas 6 veces superior a la de los filtros Zeta-Plus (Ma *et al.*, 1994).

La adsorción óptima de los virus a los filtros electronegativos se obtiene disminuyendo el pH a 3.5 y añadiendo cloruro de aluminio antes de la filtración. Los virus adsorbidos son eluidos a pH alcalino (Gerba *et al.*, 1978). En cualquier caso, los fagos pueden ser inactivados a pH 3.5 o como resultado de los cambios de pH (Seeley y Primrose, 1979; Sabatino y Maier, 1980). Los filtros electropositivos descritos por Sobsey y Jones (1979) y Sobsey y Glass (1980) presentan una ventaja sustancial sobre los filtros electronegativos, pues pueden adsorber virus en un amplio rango de pH sin adición de sales, por lo que el pretratamiento del agua antes de la filtración no es necesario.

La principal desventaja descrita es el bloqueo de los filtros electropositivos con el material orgánico en suspensión, disuelto y coloidal contenido en la muestra que limitan el volumen procesado y pueden interferir en la adsorción y elución de los virus al filtro. Además, el pH óptimo de adsorción se sitúa en 6.5, aunque también son eficientes hasta pH 8 (Sobsey y Glass, 1980; Lucena *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1994).

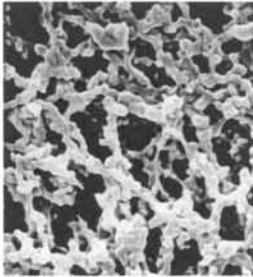
Sospechamos que las pésimas recuperaciones obtenidas en nuestros intentos de detectar bacteriófagos fecales en el eluato de filtros electropositivos se debieron a un problema de elución de los virus atrapados en dichos filtros en profundidad. Rose *et al.* (1984) reportaron una eficiencia superior de la solución al 3% de extracto de carne a pH 9.5 respecto al tampón glicina, tanto para la elución de colifagos como de virus animales del agua residual adsorbidos a filtros electropositivos o electronegativos, en concordancia con los resultados de otros autores (Farrah y Bitton, 1978; Goyal *et al.*, 1980). Jothikumar y Cliver (1997) obtuvieron buenas recuperaciones de colifagos a partir de agua de bebida y agua residual por adsorción a filtros 1 MDS y posterior elución con tampón fosfato urea-arginina, siendo la elución con este tampón mucho más eficiente que con la solución al 3 % de extracto de carne.

Diferentes autores han reportado resultados satisfactorios para la recuperación de bacteriófagos con filtros electropositivos (Goyal *et al.*, 1980; Rose *et al.*, 1984; Borrego

et al., 1991; Jothikumar y Cliver, 1997) pero en ningún caso han referido resultados de la concentración de fagos en agua de mar.

A pesar de lo prometedor que inicialmente parecía el método, nuestros resultados fueron determinantes para descartar la utilización de los filtros electropositivos en los estudios de campo.

3.4.1.4 Filtros de acetato/nitrato de celulosa



Membrana MF de ésteres mezclados de celulosa.

(Imagen tomada del catálogo Millipore®:

<http://www.millipore.com>. Consulta: 20/4/99)

Los filtros de membrana MF-Millipore utilizados en esta serie de experimentos están compuestos por mezclas de nitrato y acetato de celulosa, materiales inertes biológicamente. La estructura de esta membrana de ésteres mezclados de celulosa consiste en una lámina uniforme, rígida y continua de material polimérico. El tamaño de los poros se controla con precisión durante su fabricación. Los filtros GS de 0.22 μm presentan un 75% de porosidad. Tradicionalmente, este tipo de membranas se ha utilizado para análisis microbiológico por microfiltración y preparación de fluidos estériles.

El método de filtración en membrana y posterior elución orbital estudiado en esta sección parte del trabajo de Sinton *et al.* (1996), habiendo sido escogidos: (i) el filtro de acetato/nitrato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0.22 μm de tamaño de poro (GSWP; Millipore Corp.), (ii) la composición del eluyente que permitía una recuperación óptima de los colifagos F-RNA, F-DNA y somáticos (1% extracto de carne, 0.5 mol/l NaCl, 3% Tween80; pH 9.0) y (iii) un volumen de trabajo de 100 ml.

Las tasas de recuperación media por filtración de 100 ml y posterior elución orbital de bacteriófagos sembrados en muestras marinas fueron superiores al 55% (B40-8 > MS2 > MAR9). Recordamos que la eficiencia del método fue calculada a partir de las partículas formadoras de calvas en las placas que contenían cantidades variables de eluyente (en función de la concentración de bacteriófagos en la muestra inicial) y no se contabilizaron los fagos que inicialmente no se eluyeran y quedaran en el filtro, debido a los problemas de definición de calvas en las placas con filtros. Sinton *et al.* (1996) también refirieron en su trabajo este problema de supresión del huésped debajo del filtro. Las recuperaciones que obtuvimos en agua de mar para los colifagos F-RNA fueron superiores a las obtenidas en el trabajo de referencia (61.6% frente a 45.9%) mientras que para colifagos somáticos nuestros resultados no superaron la media

obtenida por Sinton *et al.* (58.9% frente a 100.2%). Aunque dichos autores utilizaron una cepa huésped diferente a la nuestra para la detección de fagos somáticos, esta diferencia en las medias de recuperación de fagos somáticos en agua de mar podría deberse al cloruro de sodio contenido en el eluyente que empleamos. A pesar de que Goyal *et al.* (1980) mostraron que la adición de NaCl al extracto de carne mejoraba las eficiencias de elución de varios fagos modelo, la composición más eficiente para colifagos somáticos probada por Sinton *et al.* presentaba un 3% de extracto de carne y un 3% de Tween 80, sin NaCl, después de haber observado una disminución de forma consistente en la recuperación de colifagos somáticos a concentraciones crecientes de NaCl en el eluyente. El porcentaje de recuperación global del método para los colifagos somáticos es menor que para los fagos F-específicos y de *Bact. fragilis* y otra razón que explicaría esta observación sería la diferencia en el nivel de adsorción de los fagos al filtro. Varios de nuestros estudios no concluidos (datos no presentados) sugieren que el porcentaje de fagos MAR9, y colifagos somáticos en general, que pasan a través del filtro GS es superior al porcentaje de F+ y fagos de *Bact. fragilis* que no quedan retenidos en la membrana de filtración. Pero, aún así, el porcentaje de colifagos somáticos retenido en el filtro es al menos tres veces superior al que encontramos en el eluido. En cuanto al bacteriófago B40-8, en nuestros experimentos se recuperaba mejor que los colifagos MAR9 y MS2 (82.9%), e incluso a concentraciones más altas en la muestra inicial los porcentajes de recuperación del método eran significativamente más altos. Estas recuperaciones por encima del 100% pueden haber sido debidas a la desagregación de los fagos B40-8, durante el paso de elución orbital, que a concentraciones altas tienen tendencia a unirse por las colas (Tartera, 1986; Lasobras, 1997; Puig-M, 1998).

El tratamiento de la muestra con 0.5 mol/l de cloruro de magnesio para favorecer la adsorción fágica al filtro (Sinton *et al.*, 1996) se traduce en el consumo de 101.65 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ por litro de muestra analizada, cantidad que considerábamos inusualmente alta, pues otros autores relacionan concentraciones de 5 mM a 50 mM (Seeley y Primrose, 1979; Goyal, 1987; Sobsey *et al.*, 1990; Alonso *et al.*, 1994). A tal respecto, nuestros resultados sugieren que la adición de cloruro de magnesio a las muestras de agua de mar antes de filtrar a diferentes concentraciones finales (0 M, 0.005 M, 0.05 M y 0.5 M) no modifica la eficiencia del método de filtración-elución orbital para recuperar los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8. Si bien numerosos estudios, referidos a agua dulce, establecen una relación directa entre la adición de iones magnesio a la muestra e incremento de las tasas de adsorción y recuperación de colifagos y/o virus animales a filtros electronegativos a pH neutro (Farrah, 1982; Sobsey y Glass, 1984; Sobsey *et al.*, 1990; Alonso *et al.*, 1994), posiblemente las sales contenidas en el agua de mar son una fuente de iones suficiente para favorecer las interacciones entre los bacteriófagos y la superficie adsorbente de los filtros de ésteres de celulosa (por ej. 1.35 g Mg^{2+} /l agua de mar; Margaleff, 1974).

El incremento en el tiempo de elución del filtro no parece mejorar la eficiencia del método. Sinton *et al.* no encontraron diferencias cuando aumentaron el tiempo de 6 min a 12 y 24 min. Nosotros tampoco encontramos diferencias significativas entre 5, 10, 15 y 30 minutos de elución de los bacteriófagos MAR9 y B40-8 adsorbidos a los filtros de ésteres de celulosa.

La elución con ultrasonidos se presenta como una alternativa al proceso de elución orbital (Méndez, 1999). Este protocolo de sonicación es recomendado por la CIRSEE (Piriou, 1996) para las medidas de biofilm; también se ha evaluado como proceso para desadsorber bacterias a partir de carbón activado granular (Camper *et al.*, 1985). En nuestro trabajo, la comparación de los dos métodos de elución en muestras naturales marinas y fluviales de 100 ml no resaltó diferencias de recuperación en ninguno de los tres grupos de bacteriófagos estudiado. Por el contrario, en agua residual los porcentajes de recuperación fueron significativamente mayores tras elución por sonicación durante 1 minuto en comparación a la elución orbital tanto para colifagos somáticos, como fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40. Parece ser que los sólidos en suspensión y materia orgánica soluble del agua residual retenidos en el filtro interferirían con la eficiencia de la elución orbital del filtro. La acción de fregado físico asociada con la rotación epicíclica del filtro no sería suficiente para desadsorber los fagos retenidos en la membrana tras la filtración de 100 ml de agua de elevada turbidez siendo más adecuado un proceso más agresivo como la agitación vigorosa o una elución con ultrasonidos. En realidad, el estudio de la elución en baño limpiador con ultrasonidos fue iniciado en nuestro grupo investigador, cuando J. Méndez observó una baja recuperación del bacteriófago MAR9 tras filtración de muestras de 1000 ml de agua potable y posterior elución orbital, comprobando asimismo que el problema no era que los fagos pasaran a través de la membrana sino que quedaban retenidos más estrechamente en el seno del filtro cuando se filtraban volúmenes de 1000 ml.

Realizamos algunos ensayos donde la filtración de volúmenes de 1000 ml con membranas de 47 mm de diámetro rendía porcentajes de recuperación para MAR9 y otros colifagos somáticos, tanto en mar como en río, menores o igual al 20 % cuando utilizábamos el método de elución orbital. En cambio, para los fagos de *Bact. fragilis* y fagos F-específicos en agua de río, aunque la tasa de eficiencia disminuía al incrementar el volumen filtrado a 1 litro, las recuperaciones seguían siendo aceptables (>35%) e incluso buenas (>65 %) para los fagos F-específicos (datos no mostrados en el apartado de resultados de laboratorio). Adoptamos la técnica de ultrasonidos para la elución de fagos adsorbidos por filtración de 1000 ml de muestras naturales de agua de mar prefiltradas a través de una malla de nailon de 11 μ m de poro. El porcentaje medio de recuperación del método calculado a partir del número de colifagos somáticos en la muestra inicial y en el concentrado final fue de 30.6 ($n=5$, $sd=5.8$; rango de colifagos en las muestras inicialmente: 5-20 pfp/ml).

Después de estos ensayos preliminares con volúmenes superiores a 100 ml, en nuestro grupo de estudio se siguió perfeccionando el método con volúmenes de 1000 ml y culmina en el trabajo de validación del método para agua de bebida, según la normativa ISO/WD 10705-3:1996 (Méndez, 1999) y en la memoria de tesis doctoral que este mismo autor está preparando. Actualmente (1998-2000), diversos laboratorios de salud pública, tanto en el ámbito nacional como internacional, participan en proyectos de I+D en colaboración con la UB, donde se analizan bacteriófagos en aguas potables por el método de filtración-elución con ultrasonidos.

En el ámbito de las aguas recreativas, durante el año 1997 continuamos con el protocolo de filtración-elución orbital de muestras de 100 ml para comprobar su aplicabilidad sobre el terreno.

En los ensayos de laboratorio hemos comprobado que el método permite la concentración de colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 a partir de volúmenes de 100 ml de agua de mar y río con unos porcentajes de recuperación superiores al 50 %, similares a los obtenidos por otros autores con técnicas de filtración en membrana microporosa (Seeley y Primrose, 1979; Preston *et al.*, 1988; Sobsey *et al.*, 1990; Borrego *et al.*, 1991; Alonso *et al.*, 1994; Lucena *et al.*, 1995; Sinton *et al.*, 1996). El factor de concentración del método de trabajo propuesto es 50 porque el proceso de elución orbital utiliza solo 2 ml de eluyente; así, para el estudio de bacteriófagos no se requeriría un paso de reconcentración. Se trata de un método relativamente sencillo, que precisa poco tiempo para el procesamiento de la muestra (menos de 20 minutos). Consideramos que el método podría ser adecuado para utilizar en pequeños laboratorios con equipo para análisis bacteriológico por filtración en membrana. La desventaja del método es el rango limitado de turbidez y tamaño de la muestra que puede ser procesada, pues el material en suspensión en la aguas naturales obstruye los filtros. Una posible solución al problema de colmatación prematura de los filtros es la utilización de prefiltros, que se discute más adelante en este capítulo. Otro problema con el que nos encontramos al analizar muestras naturales relativamente polucionadas (*E. coli* $\geq$ 500 cfu/100 ml) fue el de la interferencia de la flora acompañante en la lectura de las calvas en las placas de concentrado, sobretudo para los fagos de *Bact. fragilis*. En algunos casos, esta dificultad la solventamos pasando el concentrado a través de una unidad de filtración GV (Millex-GV, Millipore Corp.) que presenta una baja tasa de adsorción a proteínas (filtro de PVDF).

En cualquier caso, el método de filtración-elución orbital para concentrar bacteriófagos a partir de muestras de 100 ml de aguas recreativas del litoral catalán, parece prometedor.

3.4.1.5 Filtros de nitrato de celulosa

A raíz de una propuesta formulada en una de las reuniones de participantes en el proyecto europeo de "Bacteriófagos en aguas de baño" (Mayo 1998), se decidió probar este método basado en la filtración de la muestra condicionada a pH ácido (3.8). Así, esta tanda de ensayos se realizó cronológicamente más tarde que el resto de pruebas presentadas en este capítulo, porque no formaban parte de la primera fase experimental orientada a testar diferentes métodos.

La metodología utilizada en este apartado (3.2.2.5) es similar a la que describimos en la sección de filtros de acetato/nitrato de celulosa (3.2.2.4), estribando la diferencia más importante en el eluyente y tipo de elución.

Sinton *et al.* (1996) concentraron 100 ml de agua de bebida dopada y cuantificaron fagos F-RNA, fagos F-DNA y colifagos somáticos; salvo para los fagos F-DNA, no encontraron diferencias significativas entre las recuperaciones utilizando filtros de 0.22 μ m de tamaño de poro comparado con los filtros de 0.45 μ m. En realidad, la composición de los dos tipos de filtros que utilizaron dichos autores –nitrato de celulosa (0.45 μ m) y mezcla nitrato/acetato de celulosa (0.22 μ m)– es similar, y se considera poco probable que la composición influya en la tasa de recuperación de fagos (Sinton *et al.*, 1996).

Tal y como discutiremos en el siguiente apartado de prefiltros, la membrana GF/F (Whatman) debe eluirse junto al filtro de nitrato de celulosa para recuperar un porcentaje importante de los fagos presentes en la muestra inicial. Los datos de eficiencias de recuperación que mostramos en el apartado de resultados (3.3.1.5) están calculados después de la elución del prefiltro y filtro conjuntamente.

En cuanto a las condiciones de adsorción, tanto la disminución del pH de la muestra a 3.8 ± 0.5 como la adición de MgCl_2 a una concentración final de 0.05 M, resultaron eficientes para la concentración de fagos indicadores presentes en muestras naturales de mar.

La elución de los virus fue llevada a cabo por alteración de las cargas electrostáticas (eluyente a pH 9.0) y por intercambio de los virus por ciertas proteínas (solución al 3% de extracto de carne en tampón glicina 0.15 M). De hecho, Seeley y Primrose (1979) reportaron como eluyente más eficiente de fagos el extracto de carne al 3% (w/v) pH 8.5. Además, la mayor parte de estudios han indicado que el extracto de carne es el eluyente de virus más efectivo (Goyal *et al.*, 1980; Rose *et al.*, 1984; Guttman-Bass *et al.*, 1985), aunque también se han reportado altas eficiencias con tampón fosfato urea-arginina (Jothikumar *et al.*, 1990; Jothikumar y Cliver, 1997).

En nuestros resultados, las eficiencias de recuperación de bacteriófagos por concentración de muestras marinas relativamente turbias oscilaron entre 21.0 y 61.4% para colifagos somáticos, entre 10.5 y 42.5% para fagos F-específicos totales, entre 33.3 y 122.9% para fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y entre 41.1 y 239.9 para fagos de *Bact. fragilis* RYC2056. Las medias de recuperación de fagos F-específicos totales en muestras naturales fueron inferiores a las medias obtenidas con muestras de agua de mar (<3 NTU) dopadas con MS2; esta tendencia también se observó con los fagos de *Bact. fragilis* HSP40, aunque no tan acusadamente como con los fagos F-específicos totales.

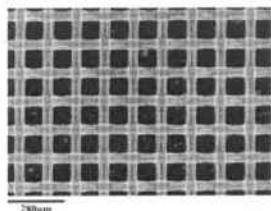
Con esta metodología, Gawler (com. pers.) obtuvo recuperaciones medias para la concentración de MS2 en agua de mar natural de 39.1%. De forma parecida, Seeley y Primrose (1979) concentraron 4 litros de agua de estanque y obtuvieron recuperaciones del 21% para ϕX174 y 32% para MS2; también concentraron otros fagos (P22, $\phi 80$, T7, T2, ZJ/2 y Lc) con eficiencias que oscilaron entre el 18 y el 80 %.

De nuevo, el problema con el que topamos en el intento de concentrar 1000 ml de muestras de elevada turbidez fue el rápido bloqueo de los filtros y la lenta tasa de flujo a través de dichos filtros. Esta limitación de las técnicas de filtración ha sido reportada en numerosas ocasiones (Gerba *et al.*, 1978; Seeley y Primrose, 1979, 1982; Sobsey y Glass, 1984; Sobsey *et al.*, 1990; Lucena *et al.*, 1995; Sinton *et al.*, 1996).

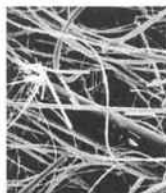
Los porcentajes de recuperación de bacteriófagos observados en este estudio son comparables a los obtenidos por otros autores con técnicas de microfiltración similares (Seeley y Primrose, 1979; Rose *et al.*, 1984; Sobsey *et al.*, 1990; Sinton *et al.*, 1996; Jothikumar y Cliver, 1997). Consideramos que el procedimiento de trabajo con los filtros de nitrato de celulosa (47 mm diámetro, 0.45 μm tamaño de poro) investigado en este apartado es apropiado para la concentración de colifagos somáticos, fagos F-específicos totales y de RNA y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y RYC2056, a partir de volúmenes de 1000 ml de agua marina de baja turbidez. Pero, dado que el trabajo con membranas de acetato/nitrato de celulosa discutido en el apartado anterior (3.4.1.4) fue

cronológicamente anterior y revisado con más rigurosidad en nuestro estudio, optamos por continuar los trabajos de campo con el método anterior.

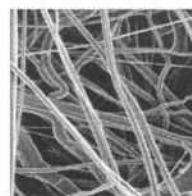
3.4.1.6 Prefiltros



Malla de nylon



Prefiltro de fibra de vidrio



Prefiltro de polipropileno

(Imágenes tomadas del catálogo Millipore®: <http://www.millipore.com>. Consulta: 20/4/99)

La materia en suspensión que se encuentra en las aguas naturales obstruye la mayor parte de materiales adsorbentes utilizados en los procesos de concentración de virus. Los tamaños de poro de los filtros utilizados habitualmente son de $1\text{ }\mu\text{m}$ para los tipos en profundidad, incluyendo los filtros electropositivos, o $0.45\text{ }\mu\text{m}$ para los tipos de membrana. Si bien la prefiltración permite el procesamiento de mayores volúmenes de agua, es probable que la eficiencia de recuperación de virus se vea disminuida debido a varias razones. Primera, los virus pueden quedar retenidos en los prefiltros por adsorción directa, que a su vez puede ser reducida por tratamiento de los filtros con detergente o soluciones proteicas (Homma *et al.*, 1973; Fields y Metcalf, 1975). Segunda, los virus pueden quedar retenidos físicamente si están asociados a material particulado (Wellings *et al.*, 1976). Tercera, las partículas víricas pueden estar adsorbidas a sólidos que quedan atrapados en el prefiltro. Éste podría ser un factor importante cuando el agua contiene partículas arcillosas que unen virus ávidamente (Seeley y Primrose, 1982).

Si la prefiltración es inevitable, los prefiltros deberían ser eluidos, a menos que no retengan ningún virus libre. Normalmente no se considera una elución separada de los prefiltros, pero la aplicación de métodos utilizados habitualmente para la elución de virus asociados a sólidos podrían ser aplicables a los prefiltros (Seeley y Primrose, 1982).

Una aproximación realizada ha sido la utilización de una serie de filtros adsorbentes de tamaño de poro decreciente, y elución de todos los filtros después de la adsorción (Sobsey *et al.*, 1973; Farrah *et al.*, 1976; Hill *et al.*, 1976). La utilización de varios filtros adsorbentes presenta la desventaja de la necesidad de un mayor volumen de eluyente para la elución de los virus adsorbidos. Esto a su vez repercute en los factores de concentración, que disminuyen, y en mayores problemas cuando se plantea la reconcentración. Además, la utilización de varios filtros adsorbentes tiene la desventaja adicional de aumentar el coste de cada muestra de agua.

En los ensayos de prefiltración de 100 ml de efluente de agua residual (≈ 23 NTU), realizados para preservar el filtro de $0.22\ \mu\text{m}$ de acetato/nitrato de celulosa, el filtro de fibra de vidrio Sartorius 1340047Q resultó adecuado. El porcentaje de fagos indicadores retenidos en el prefiltro no superó en ningún caso el 12%. Estos virus retenidos podían recuperarse con el mismo eluyente utilizado para la elución de las membranas mezcla de acetato/nitrato de celulosa (1% extracto de carne, $0.5\ \text{mol/l}$ NaCl, 3% Tween 80; pH 9.0), recuperándose mayor número de fagos F-específicos totales que colifagos somáticos o fagos de *Bact. fragilis* HSP40. Sin embargo, este prefiltro no sería tan conveniente para clarificar volúmenes de 1 litro de muestras naturales (principalmente de río) sin pérdidas de bacteriófagos en el paso de prefiltrado (pruebas no concluidas).

El filtro de microfibra de vidrio GF/F (Whatman) debe someterse a elución después de prefiltrar la muestra de agua. En nuestro estudio con volúmenes de 1 litro de agua de mar dopada con agua residual, de los fagos en la muestra inicial quedaban retenidos en el prefiltro entre el 90 y el 100% de fagos de *Bact. fragilis* HSP40, entre el 38 y el 77% de fagos F-específicos totales y entre el 18 y el 58% de colifagos somáticos.

Prefiltramos volúmenes de 1 litro de mar y río dopados con stocks de bacteriófagos, a través de membranas de diferentes materiales (Tabla 3.25). Observamos una gran variabilidad entre los porcentajes de retención de un mismo fago y un mismo material, en diferentes experimentos. Además, en numerosas ocasiones, la concentración media del bacteriófago después de prefiltrar resultaba mayor que antes de prefiltrar, con lo que obteníamos un porcentaje de retención negativo. La diferente calidad de las aguas utilizadas en los experimentos junto a los problemas de homogeneización de las muestras iniciales y prefiltradas pueden ser la respuesta a la dispersión de los datos. No creemos que todos los resultados de retención negativos se deban meramente a una desagregación de los fagos al pasar por el prefiltro. Probablemente la variabilidad sería menor si se hubiera trabajado con concentraciones más altas de bacteriófagos, como por ej. 10^5 pfp/ml, pero por otro lado, éstas no son las concentraciones de bacteriófagos habituales en aguas de baño. Compañeros de nuestro grupo de investigación realizaron pruebas paralelas de prefiltración con agua de mar y stock de poliovirus 1 añadido. Observaron que el prefiltro AP25 (Millipore) retenía mayor porcentaje de virus que los otros filtros y decidieron que tanto la malla de nailon de $11\ \mu\text{m}$ como el papel Whatman 1 eran adecuados para clarificar la muestra en el proceso de concentración de virus de muestras naturales (L. Mocé, com. pers.). A modo de resumen, a continuación apuntamos las impresiones después de los ensayos de prefiltración con diferentes materiales.

Prefiltro	Caudal	Retención fagos	Precio
Nailon $11\ \mu\text{m}$ (Millipore)	++	++	+
AP25 (Millipore)	++	+	++
Polipropileno $10\ \mu\text{m}$ (Millipore)	+	+	+
Papel Whatman 1	+	+	++
Papel Whatman 6	-	+	++

-: no reúne las condiciones requeridas; +: cumple los requisitos mínimos; ++: es adecuado.

A partir de estos estudios, utilizamos frecuentemente la malla de nailon para prefiltrar la muestra antes de la microfiltración. A pesar de que la malla de nailon de 11 μm permite procesar volúmenes mayores que el resto de prefiltros investigados, el filtrado resultante es aún turbio y puede bloquear los filtros posteriores.

3.4.2 MÉTODOS DE FLOCULACIÓN

3.4.2.1 Floculación orgánica con extracto de carne

La aplicación de un método de concentración adecuado para virus animales y bacterianos simplificaría los procesos de ensayo considerablemente. Por dicho motivo, aprovechamos las muestras que se concentraban para enterovirus en nuestro laboratorio y cuantificamos bacteriófagos en las muestras iniciales y en los concentrados obtenidos por floculación orgánica para valorar la eficiencia del método.

En nuestro estudio, la floculación a pH 3.5-4.0 de muestras de 1 litro de ríos y plantas depuradoras tratadas con un 3% de extracto de carne, rindió unas recuperaciones medias de bacteriófagos entre 13 y 26%, siendo la más alta para fagos de *Bact. fragilis*.

La floculación orgánica aplicada al tampón glicina después de la elución de filtros electropositivos, no se presentó como un método óptimo de reconcentración en nuestros experimentos. El porcentaje de recuperación de colifagos somáticos presentes en el tampón glicina inicial fue del 13% tras la floculación orgánica, eficiencia similar a la obtenida con la aplicación de la floculación orgánica como método de concentración primario. Sin embargo, los fagos F-específicos totales prácticamente no se recuperaron. Incluso, parecía que los fagos F-específicos fueran más sensibles a los cambios de pH en tampón glicina que en agua de río (en ambos casos con un 3% de extracto de carne añadido). No pudimos calcular la eficiencia de concentración de los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 debido a los bajos números presentes en las aguas analizadas.

El bajo número de muestras positivas que encontramos después de la floculación orgánica de la solución de glicina podría ser explicado parcialmente por el hecho de no haber procesado el volumen completo de concentrado (30-40 ml).

La flora acompañante en las muestras de río concentradas fue un problema para la titulación de los fagos, sobretudo para los de *Bact. fragilis*. Araujo *et al.* (1993) también señalaron este problema de visualización de las calvas de los fagos de *Bact. fragilis* cuando se evaluaban muestras ambientales, tanto de aguas como de sedimentos. Estos autores estudiaron varios tratamientos para descontaminar las muestras y consiguieron las máximas recuperaciones por filtración a través de membranas de PVDF. Es por ello que nuestros resultados de bacteriófagos corresponden a la muestra concentrada por floculación orgánica y filtrada a través de dichos filtros de baja adsorción de proteínas (Millex®-GV, Millipore). Aún así, con una unidad de filtración de 25 mm de diámetro y 0.22 μm de tamaño de poro, el volumen que podíamos procesar oscilaba entre 1 y 5 ml, dependiendo de la contaminación.

La floculación orgánica con extracto de carne se ha venido utilizando desde que Katzenelson *et al.* publicaran este procedimiento en 1976 como segundo paso de concentración para la detección de virus animales en agua. Numerosos científicos han señalado la sensibilidad de muchos bacteriófagos a pH extremos y consideran que la floculación orgánica a pH 3.5 es inadecuada para la reconcentración de bacteriófagos. Por ejemplo, Seeley y Primrose (1979) obtuvieron un 39 % de recuperación para ϕ X174 y un 26 % para P22 pero no consiguieron recuperar ni un 1 % de fagos MS2 por floculación a pH 3.9 de 50 ml al 3 % (w/v) de extracto de carne; Shields y Farrah (1986) no recuperaron MS2, ϕ X174 ni T3 por floculación a pH 3.5, aunque obtuvieron un 12 % de colifagos somáticos a partir de efluente de agua residual (comparable al 13 % que nosotros hemos obtenido); Armon *et al.* (1988) no recuperaron f2, Q β , C3 ni C3000-1 (eficiencias de 0.5 a 5%) después de aplicar la floculación orgánica como concentración secundaria de agua de distribución. Jothikumar y Cliver (1997) reportaron una eficiencia de recuperación media de ϕ X174, tras floculación orgánica de 50 ml de una solución al 3% de extracto de carne, de 3.9%. Además, diferentes trabajos han mostrado que la concentración de virus por floculación orgánica puede variar entre virus similares (Morris y Waite, 1980; Hurst *et al.*, 1984).

Tanto nuestros resultados como la bibliografía consultada advierten que la floculación orgánica no es el método más apropiado para la eficiente concentración de los tres grupos de bacteriófagos indicadores de contaminación fecal y/o humana.

3.4.2.2 Precipitación de extracto de carne con sulfato amónico

La habilidad del sulfato amónico para precipitar proteínas ya había sido reconocida y estudiada en la década de los sesenta (Kauzman, 1959; Dixon y Webb, 1961; Hatefi y Hanstein, 1969) pero su potencial en la reconcentración de virus a partir de muestras ambientales se ha investigado en los años 80 (Shields y Farrah, 1986; Payment y Trudel, 1987; Armon *et al.*, 1988; Bosch *et al.*, 1988). En el presente trabajo utilizamos la floculación con sulfato amónico como un proceso de concentración directa de muestras de 100 ml que proporcionó, en general, recuperaciones satisfactorias de los fagos MAR9, MS2 y B40-8 añadidos al agua de mar. A pesar de ello, la eficiencia del método parecía disminuir cuando las concentraciones de MAR9 y B40-8 en la muestra inicial eran <5 pfp/ml. Esta observación no la atribuimos tanto a una deficiencia del método para concentrar virus como a un problema de interferencia del extracto de carne y/o sales en el crecimiento de las bacterias huéspedes en el proceso de la detección de fagos en el concentrado. Es posible que la supresión del huésped se deba a la mayor fuerza isotónica de la mezcla del concentrado con la bacteria huésped. Sinton *et al.* (1996) notaron un efecto similar de supresión con colifagos que eran titulados con el eluyente que tenía una mayor concentración de NaCl, indicando que, en los métodos donde el concentrado o eluyente es mezclado directamente con el huésped, se requiere un compromiso entre la eficiencia de elución y la tolerancia del huésped al tipo y concentración de eluyente.

Nuestros resultados parecen apuntar que la morfología de los bacteriófagos no afecta a la recuperación del método. De igual forma, Shields y Farrah (1986) obtuvieron unas recuperaciones del 100 % para los fagos MS2, ϕ X174 y T3 después de flocular con sulfato amónico 20 ml de extracto de carne al 10 % con 10^7 pfp de cada bacteriófago. El

método de floculación por sulfato amónico como proceso de concentración directo también ha sido aplicado con éxito por Bosch *et al.* (1988) en muestras de 600 ml para la concentración de rotavirus en distintos tipos de agua y enterovirus en agua residual. Shields y Farrah (1986) consiguieron, por floculación con sulfato amónico como reconcentración después de la elución de filtros electropositivos, recuperaciones de colifagos somáticos indígenas superiores al 80 % en efluente de agua residual y en agua de lagos. Esta eficiencia está ligeramente por encima a la que nosotros obtenemos en agua de mar.

El método de floculación por sulfato amónico aparece como un método eficiente, tanto para la concentración de virus entéricos humanos como para bacteriófagos pues evita los cambios drásticos de pH. Además, el método es simple y efectivo para la recuperación de bacteriófagos somáticos, F-RNA y de *Bact. fragilis*. No se observan pérdidas sustanciales de la recuperación de virus en la concentración de muestras de agua residual comparado con el agua destilada o agua del grifo (Bosch *et al.*, 1988; Shields y Farrah, 1986). Así, esta metodología es aplicable a distintos tipos de agua, comprobando en este trabajo que funciona también con agua marina. Es adecuado para concentración directa de volúmenes de muestra de tamaño medio (máximo 1 litro) y es una alternativa atractiva a la floculación orgánica, como reconcentración después de la elución de los filtros con extracto de carne, para la recuperación de enterovirus y bacteriófagos.

No continuamos nuestros estudios con el método de floculación en extracto de carne con sulfato amónico principalmente porque no consideramos práctico en laboratorios de análisis de rutina, triplicar el volumen a concentrar para después centrifugarlo todo y porque para muestras muy poco contaminadas se requieren muchas placas, pues no es conveniente añadir más de 0.5 ml de concentrado por placa.

3.4.2.3 Floculación por hidróxido de magnesio

Los virus en solución pueden ser recuperados por adsorción a precipitados insolubles de iones metálicos. En particular, se ha encontrado que las sales insolubles de aluminio, calcio y magnesio adsorben eficientemente una gran variedad de virus (Farrah y Preston, 1985). Estos flóculos y precipitados son recogidos por centrifugación o por filtración. Estas técnicas de floculación generalmente se limitan a la concentración de pequeños volúmenes de agua o como segunda concentración de virus en eluatos obtenidos después de la primera concentración por filtración de grandes volúmenes.

Cookson (1974) mostró que la adsorción a hidróxido de aluminio podía ser debida a la unión de los virus a grupos OH^- de los complejos hidroxometal, y también sugirió fuerzas electrostáticas similares a aquellas observadas en los procesos de intercambio iónico, como un mecanismo adicional de unión. En realidad, en los procesos de coagulación-floculación intervienen complejos mecanismos físicos que son revisados en el estudio de Thomas *et al.* (1999).

Parece ser que las sales de magnesio crean un ambiente más favorecedor para los mecanismos de adsorción de los fagos a sus células huésped que las sales de aluminio

(Seeley y Primrose, 1979; Schulze y Lenk, 1983). En el proceso de precipitación inorgánica por $Mg(OH)_2$, el cloruro de magnesio añadido al agua a pH alcalino forma un flóculo cargado positivamente que atrapa a los virus en la solución acuosa (Vilagines *et al.*, 1982). El K_2HPO_4 que añaden Schulze y Lenk (1983), pero que no utilizan Vilagines *et al.* (1982), sólo tendría una función tamponadora (D. Panyella, com. pers.).

En la publicación que ha servido de referencia para nuestro trabajo, los autores (Schulze y Lenk, 1983) concentraron colifagos T2, T4, T6 y fagos salvajes añadidos a partir de 1 y 5 litros de agua de bebida, con unas eficiencias de recuperación que oscilaron entre el 60 y el 90 %.

Nuestros ensayos fueron realizados básicamente con MAR9, MS2 y B40-8, y comprobamos que el método era muy eficiente para la concentración de dichos bacteriófagos a partir de muestras de 1 litro de agua de mar, con porcentajes medios de recuperación superiores a 87 para los tres fagos. La eficiencia del método se mostró independiente de la turbidez de la muestra inicial.

Posteriormente confirmamos que el fago $\phi X174$ no se recuperaba, a partir de ningún tipo de agua, en el proceso de concentración utilizando la técnica de floculación por $Mg(OH)_2$. Pruebas de supervivencia de $\phi X174$ en tampón de fagos a pH 7.1, 8.6 y 9.3 hasta 2 horas, no revelaron problemas de inactivación del fago a pH al cual se lleva a cabo la floculación (datos no mostrados). Aunque no consideramos oportuno continuar con la investigación de por qué no encontrábamos el fago $\phi X174$ en el concentrado, una posible explicación es que el fago se adsorbiera a los flóculos pero después quedara afectada su capacidad infectiva, tal y como describieron Vilagines *et al.* (1982) con poliovirus 1. Estos autores observaron que poliovirus 1 se absorbía con una eficiencia del 100 % al precipitado de $Mg(OH)_2$ preparado tanto "*in situ*" como formado previamente pero, aunque fueron capaces de recuperar el 90 % de los virus adsorbidos a los flóculos formados con anterioridad, obtuvieron resultados negativos en la infección de células BGM cuando utilizaron el concentrado de $Mg(OH)_2$ formado "*in situ*". Ensayos posteriores sugirieron que los virus contenidos en los precipitados formados "*in situ*" eran capaces de unirse a las membranas celulares pero no podían penetrar en el interior de las células. En cualquier caso, el resultado negativo obtenido con la concentración de $\phi X174$ no tiene más trascendencia en nuestro estudio pues, como veremos más tarde, el análisis de muestras naturales proporcionó porcentajes de recuperación para colifagos somáticos entorno al 50 %. La evidencia empírica junto al hecho de que los fagos somáticos más abundantes en el agua residual son los *Myoviridae* seguidos de los *Siphoviridae*, constituyendo los *Microviridae* sólo una pequeña fracción del total de fagos en el ambiente (Muniesa *et al.*, 1999), justifican que continuáramos trabajando con el método de floculación por $Mg(OH)_2$.

Las pruebas de concentración de bacteriófagos añadidos a un litro de agua de río, pusieron de manifiesto la sensibilidad del fago MS2 a pH alcalino (Tabla 3.31). En efecto, comprobamos que las floculaciones realizadas a pH superiores a 9.0 brindaban eficiencias de recuperación para MS2 inferiores al 50 % (Figura 3.17). Si bien Schulze y Lenk (1983) realizaban la precipitación inorgánica en agua de bebida a pH próximo a 9, Jothikumar y Cliver (1997) reconcentraban el eluato de tampón fosfato urea-arginina a pH 9.0 para la detección de colifagos, y Vilagines *et al.* (1982) formaban los flóculos de $Mg(OH)_2$ a pH 11.5 para la concentración de poliovirus 1, nosotros probamos que los

flóculos formados a pH 8.3 también adsorbían a los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8 eficientemente. Realizados diferentes experimentos de precipitación inorgánica a pH comprendidos entre 8.38 y 9.22 con agua de distribución y agua de mar, concluimos que el pH óptimo de floculación para una eficiente recuperación de los tres bacteriófagos en el mismo concentrado se fijaba en 8.6 ± 0.2 .

Consideramos la opción de atrapar los flóculos con fagos adsorbidos en filtros para evitar la utilización de centrifuga. Los filtros de membrana reforzada de ésteres mezclados de celulosa (tipo AW, Millipore Corp.) de 3, 1.2 y 0.6 μm de tamaño de poro nominal no retuvieron eficientemente los flóculos. Encontramos que un prefiltro de fibra de vidrio (1340047Q, Sartorius) retenía los flóculos, recuperándose después de la concentración entre el 38 y >100 % de los fagos añadidos a la muestra inicial. El principal inconveniente de esta alternativa a la centrifugación es la baja tasa de flujo a través del prefiltro debido a la rápida obturación de los poros.

Schulze y Lenk (1983) reportaron que los flóculos de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ no se resuelven al suspenderlos (después de la centrifugación) en caldo nutritivo tamponado. En nuestro estudio observamos que con tampón de fagos ajustado a pH 7.0, el concentrado continuaba presentando un aspecto "pastoso" que, en cualquier caso, no afectaba la formación de calvas y recuento de fagos sobre las bacterias huéspedes correspondientes. La utilización de tampón de fagos ajustado a pH 6.0 para resuspender el precipitado después de la centrifugación de los flóculos de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ no suponía una mejora en la visualización macroscópica del concentrado pero, el pH de la suspensión final conteniendo fagos quedaba más próximo a 7.0 que cuando se utilizaba tampón de fagos ajustado a pH 7 (Tabla 3.40). Vilagines *et al.* usaron tampón citrato-fosfato pH 6.5 (McIlvaine, 1921) para solubilizar y neutralizar el pellet conteniendo flóculos de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ con virus adsorbidos. Jothikumar y Cliver (1997) reconcentran el eluato de tampón fosfato urea-arginina (pH 9.0) por adición de cloruro de magnesio, centrifugación y disolución del pellet en tampón McIlvaine a pH 5.0 y, curiosamente, reportan recuperaciones medias para ϕX174 de 95.4.

Con el propósito de optimizar el método de floculación que nosotros describimos, debería probarse si la resuspensión del pellet con tampón McIlvaine ofrece recuperaciones satisfactorias de MAR9, MS2 y B40-8 tras concentración de agua de mar, río y distribución.

Si la utilización de flóculos de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ formados previamente aportara resultados satisfactorios en la concentración de fagos, tal y como describieron Vilagines *et al.* (1982) para poliovirus, el proceso de concentración podría realizarse en un corto período de tiempo (poco más de 10 minutos), en comparación a la hora aproximada que requiere la concentración por floculación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ "*in situ*".

Tal y como ya se ha discutido en el apartado de resultados (3.3.2.3), es posible guardar la muestra tanto directamente como concentrada durante 1 día a 4°C, con la garantía de que los fagos de *Bact. fragilis* van a permanecer constantes en número, que los fagos somáticos pueden sufrir una reducción alrededor del 15 % y que seguramente se detectarían un 35 % menos de fagos F-específicos respecto al primer día.

El problema de las muestras concentradas son las bacterias, que también son recuperadas junto a los microorganismos de interés, e interfieren en los métodos de

detección. Así, la flora acompañante en las placas con el césped de la bacteria huésped específica, puede llegar a crecer encima de las áreas claras o calvas dificultando y confundiendo la lectura e interpretación de los resultados. El problema se acusa más en el análisis de fagos de *Bact. fragilis* debido a que el ciclo replicativo de *Bacteroides* es más lento que el de *E. coli* (90 minutos frente a 20 minutos aproximadamente) (Tartera, 1986; A-Puig, 1998). Nuestros ensayos de titulación de concentrados obtenidos por floculación de muestras relativamente polucionadas (río) mostraron que la adición de bilis (a una concentración final de 0.25 M) a los medios de cultivo no inhibía el crecimiento de las bacterias contaminantes, mientras que la utilización de antibióticos en los medios (100 µg/ml ácido nalidíxico, 100 µg/ml kanamicina), triplicando la cantidad de kanamicina en el agar blando, mejoraba notoriamente la visualización de las calvas.

En definitiva, los resultados de la concentración por $Mg(OH)_2$ de muestras de 1 litro de agua de mar, río y distribución infectadas con stocks de los bacteriófagos MAR9, MS2 y B40-8, se consideraron suficientemente buenos como para proceder al ensayo del método con muestras naturales. El método ha mostrado ser fiable en términos de sensibilidad o eficiencia de recuperación, válido en un amplio rango de turbideces. Además, se trata de un método simple, económico, no requiere equipo especializado y parece factible para los estudios de campo.

3.5 CONCLUSIONES

1. Los métodos de concentración de virus en aguas más sencillos y populares son los basados en la filtración (adsorción-elución) con diferentes soportes y los de floculación con diferentes floculantes.
2. En la elección de un método de filtración eficiente para la concentración de bacteriófagos deben considerarse los siguientes factores: utilización o no de prefiltros, tipo de filtro adsorbente (material, carga neta de la superficie, tamaño de poro), condiciones de adsorción (pH, iones), tasa de flujo, volumen máximo y mínimo que puede procesarse, eluyente (composición, pH) y necesidad o no de reconcentración.
3. En un método de precipitación-floculación para fagos deben observarse los siguientes aspectos: tipo de coagulante-floculante, condiciones de floculación (pH, temperatura, tiempo), recuperación del precipitado (malla, centrifugación, filtración) y disolución del flóculo (composición del tampón, pH).
4. Las pruebas de filtración con membranas inorgánicas de óxido de aluminio (Anodisc™) de 0.22 μm de porosidad y 47 mm de diámetro resultaron satisfactorias para la recuperación del fago B40-8 (fago que infecta a *Bact. fragilis* HSP40). Los porcentajes de recuperación de B40-8 a partir de 100 ml de agua de mar, río y agua embotellada fueron superiores al 50%. La eficiencia media de recuperación del fago somático MAR9 (fago de la familia *Myoviridae*) fue del 40% con membranas de 0.1 μm de tamaño de poro, pero con las membranas de 0.22 μm se recuperaban <30 % de los colifagos somáticos añadidos. Este método no era eficiente para la concentración del fago MS2 (fago F-específico de RNA).
5. Los ensayos con filtros de celulosa modificados por precipitación “*in situ*” de hidróxidos férrico y aluminico no proporcionaron recuperaciones aceptables para ninguno de los tres grupos de bacteriófagos analizados en agua de mar.
6. Los cartuchos filtrantes electropositivos Zeta-Plus® MK 100 no fueron convenientes para concentrar bacteriófagos a partir de grandes volúmenes (≥ 75 litros) de agua de mar y río.
7. El método de filtración-elución orbital con membranas mezcla de acetato/nitrato de celulosa de 0.22 μm de porosidad y 47 mm de diámetro, permitió la eficiente concentración de bacteriófagos modelos a partir de 100 ml de diferentes tipos de muestras, siendo el factor de concentración 50. El colifago somático MAR9 fue recuperado a partir de agua de mar con una eficiencia media del 58.9%; la tasa de recuperación en agua de río fue inferior. El rendimiento del método en agua de mar para los bacteriófagos MS2 y B40-8 fue de 61.6 y 82.9% respectivamente, mientras que las recuperaciones en río fueron superiores al 97% para ambos fagos. Se probaron diferentes modificaciones del protocolo inicial y finalmente fue escogido como método de filtración para continuar su estudio con muestras naturales.

8. La utilización de una membrana de nitrato de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro junto a un prefiltro de microfibras de vidrio GF/F, previo acondicionamiento de la muestra, permitió la concentración de bacteriófagos a partir de volúmenes de 1 litro de agua de mar con eficiencias medias superiores al 40%, tanto con stocks de bacteriófagos como con fagos naturales. Este método se presenta como una opción válida para la concentración de bacteriófagos a partir de muestras de 1 litro de agua de baja turbidez.
9. Los prefiltros evitarían la obturación prematura de los poros de las membranas utilizadas en los procesos de microfiltración. El prefiltro de microfibras de vidrio GF/F fue uno de los que debía eluirse junto al filtro, ya que adsorbía una proporción importante de los fagos contenidos en la muestra de agua. La malla de nailon de 11 μm y 47 mm de diámetro soportaba un mayor flujo a través que el prefiltro AP25 de fibra de vidrio. Además, esta malla no parecía retener una proporción significativa de bacteriófagos después de la filtración de muestras de 1 litro. La aplicación de mallas de nailon de 11 μm para clarificar la muestra de agua antes de concentrar sería una solución parcial a los problemas de colmatación de los filtros.
10. La floculación orgánica con extracto de carne a pH 3.5, no fue apropiada para la concentración de los tres grupos de bacteriófagos a partir de muestras naturales o como método de reconcentración. La sensibilidad de algunos fagos a pH <4.0 es el principal factor que hace que este método no sea adecuado para recuperar bacteriófagos naturales.
11. En el método de precipitación de extracto de carne con sulfato amónico, la floculación tiene lugar a pH neutro (7.0). La concentración de los fagos MAR9, MS2 y B40-8 a partir de muestras de 100 ml de agua de mar se mostró satisfactoria, con recuperaciones medias de 34, 49 y 50% respectivamente. Aunque el método es simple, consideramos que era poco práctico para utilizarlo de forma rutinaria (tiempo requerido próximo a 1 hora, aumento x3 del volumen a concentrar, no adecuado a concentraciones iniciales <5 pfp/ml de colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis*).
12. La floculación inorgánica de hidróxido de magnesio aplicada para concentrar muestras de 1 litro de agua de mar, produjo recuperaciones medias superiores al 87% para MAR9, MS2 y B40-8. Resultados similares se consiguieron al concentrar agua de río y agua de distribución. El método se mostró efectivo en un amplio rango de turbideces (incluso agua residual), independientemente de la concentración inicial de fagos. Dada la simplicidad del método y las óptimas recuperaciones – después de aplicadas algunas modificaciones – de los tres grupos de fagos en diferentes tipos de muestras, el método de floculación por $\text{Mg}(\text{OH})_2$ fue escogido para estudiarlo en más detalle con muestras naturales.
13. Así, los dos métodos escogidos para su posterior estudio en los trabajos de campo eran simples, no requerían equipo especializado y permitían recuperaciones óptimas de colifagos somáticos, fagos F-específicos de RNA y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 a partir de diferentes tipos de aguas. Los procedimientos de trabajo que finalmente se aplicaron en los ensayos de campo posteriores se especifican a continuación.

Método de filtración-elución orbital de muestras de agua de 100 ml para la concentración de bacteriófagos:

- Homogeneizar la muestra y seleccionar 100 ml de agua a temperatura ambiente. Guardar una alícuota para la cuantificación de bacteriófagos de la muestra directa.
- Acondicionar la muestra con $MgCl_2$ a una concentración final de 0.05M. (añadir 1.5 ml de la solución $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.14 M) Homogeneizar y dejar reposar un par de minutos.
- Emplazar la membrana GSWP04700 (Millipore) en la rejilla metálica con ayuda de unas pinzas. Colocar el embudo portafiltro asegurándose de que no hay pérdidas.
- Filtrar la muestra (tasa de flujo aproximado: 100 ml/3 minutos).
- Eluir los bacteriófagos retenidos en la membrana con el eluyente (1% extracto de carne, 0.5 mol/l NaCl, 3% Tween 80; pH 9.0 ± 0.1)
 - Dispensar 2 ml de eluyente en una placa de petri estéril de 55 mm de diámetro.
 - Coger el filtro con unas pinzas, previamente esterilizadas por flameado, y emplazarlo boca abajo en la placa de petri que contiene el eluyente.
 - Colocar la placa en un agitador orbital, a 60 r.p.m. durante 6 minutos.
 - Ajustar el pH a 7.0 ± 0.1 con HCl 0.1 N si no se titula de inmediato y guardar dicho concentrado a $5 \pm 3^\circ C$ para ser analizado más tarde, dentro de la misma jornada de trabajo.
- Cuantificar los bacteriófagos en el concentrado por el método de la doble capa de agar.

Método de floculación por $Mg(OH)_2$ de muestras de agua de 1000 ml para la concentración de bacteriófagos:

- Homogeneizar la muestra a temperatura ambiente. Tomar una alícuota de 1000 ml y dispensarla en una botella estéril que contendrá una varilla magnética. Tomar otra alícuota (55 ml) para contar los fagos en la muestra inicial.
- Añadir 10 ml de cloruro magnesio 1 M.
- Ir añadiendo en gotas, a la vez que se agita magnéticamente, 3.5 ml de hidrogenofosfato dipotásico 1M.
- Añadir en gotas mientras se agita, hidróxido sódico 2 N hasta ajustar el pH a 8.6 ± 0.2
- Agitar la muestra despacio (300 r.p.m.) otros 15 minutos, a temperatura ambiente.
- Dejar que los flóculos sedimenten durante 30-40 minutos, a temperatura ambiente.
- Eliminar (sifonar) con cuidado el sobrenadante (sin mover la botella).

- Concentrar el sedimento suelto (aproximadamente 250 ml) con una centrifugación a 2000 g durante 15 minutos a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ (rotor JA-10, 3000 r.p.m.).
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
- Resuspender y homogeneizar el sedimento con 20-30 ml de “tampón de fagos” a pH 6.0 ± 0.2 , a temperatura ambiente.
- Medir el volumen final (30-40 ml) y contar el número de bacteriófagos en el concentrado por el método de la doble capa de agar.

Capítulo IV: CONCENTRACIÓN E INTRODUCCIÓN A LA ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

Después de la valoración de diferentes métodos de concentración en el laboratorio con muestras controladas (Capítulo 3), se seleccionaron dos técnicas para la recuperación de bacteriófagos de ambientes acuáticos naturales:

- Filtración de 100 ml - elución orbital (adaptada de Sinton *et al.*, 1996) y
- Floculación de 1000 ml por $Mg(OH)_2$ (adaptada de Schulze y Lenk, 1983).

En este capítulo dividimos el estudio en dos bloques experimentales, que se corresponden fundamentalmente con dos monitorizaciones representativas:

- Campaña 1997: muestras marinas y fluviales.
- Campaña 98-99: playas marinas

- ➔ El objetivo principal de la campaña 97 fue probar los métodos de concentración de bacteriófagos en el campo con muestras continentales y marinas más o menos contaminadas fecalmente.
- ➔ El estudio ecológico realizado en 1998 estaba dirigido a la obtención de datos de bacterias indicadoras y bacteriófagos fecales en playas marinas aptas para el baño.

A continuación presentamos los *Objetivos*, *Material y métodos*, *Resultados* y *Discusión* de cada uno de los bloques experimentales señalados.

4.1 OBJETIVOS CAMPAÑA 1997

- ❑ Aplicabilidad de los métodos escogidos de filtración y floculación para concentrar bacteriófagos a partir de muestras ambientales. Determinación de las eficiencias de recuperación de colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* en muestras de mar y río con distintos grados de polución.
- ❑ Primera aproximación a la obtención de información sobre la ecología de los bacteriófagos. Relaciones entre fagos e indicadores bacterianos.
- ❑ Transferencia del método de concentración que se escoja a otros laboratorios europeos y sesiones formativas para su aprendizaje.

PLAN DE TRABAJO 97

⇒ Campaña 1997

1. Control interno de los materiales de trabajo.

- ➔ Preparación y control de esterilidad de los medios de cultivo y reactivos.
- ➔ Control de calidad de las cepas huésped.
- ➔ Viabilidad de los cultivos de trabajo.

- Enumeración y cartas de control de los materiales de referencia.
 - Control de calidad de las soluciones utilizadas en la concentración.
2. Muestreo de aguas de mar y río con distintos grados de polución. Detección y cuantificación de bacteriófagos.
- Muestras concentradas por filtración de 100 ml; filtración-elución orbital.
 - Muestras concentradas por floculación de 1000 ml; floculación por $Mg(OH)_2$
3. Metodología de concentración. Obtención de porcentajes de recuperación para colifagos somáticos, fagos F-específicos totales y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 a través de la enumeración de fagos antes y después de concentrar.
- Valoración de la eficiencia de los métodos de filtración y de floculación.
 - El método en estudio, ¿funciona para los tres grupos de fagos?
 - ¿Hay diferencias de recuperación entre las muestras de mar y río?
 - La eficiencia del método objeto de estudio, ¿se ve afectada por la concentración del fago diana en la muestra inicial?
 - ¿La eficiencia del método está influenciada por la calidad del agua?
 - ¿Hay diferencias de recuperación entre los métodos de filtración y floculación?
4. Ecología de bacteriófagos: niveles de bacteriófagos indicadores en muestras ambientales.
- Importancia de la concentración en muestras poco polucionadas.
 - Correlaciones bivariadas entre diferentes parámetros microbiológicos en
 - mar
 - río
 - todas las muestras
 - muestras poco polucionadas
 - Diagramas de cajas. Representación de los datos microbiológicos en muestras con distintos niveles de contaminación, atendiendo al criterio enterococos fecales (EF).
 - Curvas COR. Análisis de sensibilidad de la presencia de bacteriófagos para detectar contaminación.
- ⇒ **Transferencia del método** a laboratorios europeos. Necesidad de una técnica común de concentración de bacteriófagos para análisis de aguas de baño europeas (continentales y marinas).
- Elección del método (¿filtración o floculación?)
 - Recuperaciones obtenidas por otros laboratorios europeos.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS 97

Programa experimental

- Recogida de muestras de playas marinas y ríos del Área Metropolitana de Barcelona a lo largo del año (ISO 5667-2, 1982). Transporte de las muestras al laboratorio en contenedores estériles y refrigerados (ISO 5667-3, 1985). Procesamiento de las muestras el mismo día de su recepción.
- Análisis de las muestras directas:
 - ✓ *Parámetros físico-químicos*: pH, turbidez, salinidad (APHA, 1995).
 - ✓ *Bacteriología*: *Escherichia coli* y enterococos fecales por el método de microplacas (AFNOR NFT 90-433 y NFT 90-432, respectivamente), esporas de clostridios sulfito-reductores con agar SPS (Handford, 1974).
 - ✓ *Cuantificación de bacteriófagos*: Colifagos somáticos, fagos F-específicos totales y fagos de *Bact. fragilis* HSP40; 10 ml directos para cada grupo de fagos (1 ml/placa), según normativas ISO 10705.
- Concentración de las muestras de mar y río. Unas muestras fueron concentradas por filtración (n = 30), otras por floculación (n = 24) y otras se sometieron a los dos procedimientos para poder comparar las tasas de eficiencia de ambos métodos (n = 28).
 - Filtración de 100 ml y posterior elución orbital, según protocolo modificado de Sinton y col. (1996). En general, se realizaron entre 3 y 4 procesos de filtración por muestra para obtener suficiente volumen de concentrado y titular los tres grupos de bacteriófagos. Para poder cuantificar fagos en las muestras naturales (dados los bajos números que encontramos en los estudios preliminares del apartado 3.1.1.2), se repartieron los volúmenes de muestra concentrada en proporción inversa a la concentración teórica de cada grupo de fagos. Además se varió el volumen analizado para cada grupo en función de la polución de la muestra directa. Así, el concentrado analizado equivalía a un volumen de muestra directa que oscilaba para los colifagos somáticos entre 15 y 75 ml, para los fagos F-específicos totales entre 50 y 100 ml y para los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 entre 75 y 200 ml.
 - Floculación de 1000 ml por hidróxido de magnesio, según protocolo modificado a partir de Schulze y Lenk (1983). Se realizó una floculación de 1000 ml por muestra y el concentrado, de aproximadamente 30 ml, se repartió para el análisis de fagos. El volumen aproximado de muestra directa al que equivalía el volumen de concentrado analizado era de 333 ml para los fagos de *Bact. fragilis* HSP40, oscilaba entre 16 y 166 ml para colifagos somáticos y entre 166 y 333 ml para fagos F-específicos totales.

Concepto de curvas COR (ROC Curves)

COR es un acrónimo de Características Operativas de Receptores (o Respuestas), y viene de los primeros tiempos del radar y otras estrategias de imágenes, cuando los intérpretes tenían que distinguir “señales” causadas por los aeroplanos del “ruido” causado por otras fuentes.

Conceptos básicos:

Sensibilidad

- Tasa de verdaderos positivos.
- Capacidad de una prueba (pe. “fagos somáticos”) para detectar la alteración “contaminación” cuando está presente.

Especificidad

- Tasa de verdaderos negativos.
- Capacidad de identificar correctamente la ausencia de la alteración “contaminación”.

Prevalencia

- Tasa de probabilidad de “contaminación” antes de la prueba.
- Alteración que queremos detectar con una prueba diagnóstica: “contaminación” de las aguas de baño.
- Como patrón (como “verdad”) tomamos la normativa para aguas de baño:
Escherichia coli 100 cfp/100 ml (o bien enterococos fecales 33 cfp/100 ml)
- Prueba: pe. fagos somáticos (vamos a someter a “examen” esta prueba, para ver si es una “buena” prueba para detectar contaminación).

		Alteración (“contaminación”)	
		presente (>100 CFU/100 ml <i>E.coli</i>)	ausente (≤100 CFU/100 ml <i>E. coli</i>)
Prueba	+	VP a b	FP
	-	FN c d	VN

VP: verdaderos positivos.
FN: falsos negativos.
FP: falso positivos.
VN: verdaderos negativos.

Sensibilidad: $a / (a+c)$
Especificidad: $d / (b+d)$
Prevalencia: $(a+c)/(a+b+c+d)$

Definición e interpretación de una curva COR

Una curva COR es simplemente un gráfico de los pares de tasas VP (sensibilidad) y tasas FP (100 % - especificidad o tasa VN) que corresponden a cada punto de corte posible para el resultado de la prueba. El punto en una curva COR que está más cercano al ángulo superior izquierdo es el “mejor” corte en términos de hacer la menor cantidad de equivocaciones cuando la prevalencia está en, o alrededor del, 50 % (esto es, su uso minimiza la suma de falsos positivos más falsos negativos). Esta estrategia puede ser usada para comparar la utilidad de dos pruebas diferentes (pe. diferentes tipos de fagos o indicadores) para el mismo trastorno objetivo (“contaminación”). Se trata de trazar las curvas COR: la que está situada más al “noroeste” es la más exacta.

4.3 RESULTADOS 97

4.3.1 CONTROL DE LOS MATERIALES DE TRABAJO UTILIZADOS DURANTE LOS ANÁLISIS DE 1997.

(Formularios y resultados en Anexo 4)

Todos los materiales utilizados durante los análisis de muestras ambientales fueron preparados según la normativa ISO respectiva para cada uno de los métodos empleados. Los controles se llevaron a cabo a cuatro niveles y se especifican en los apartados 4.3.1.1 a 4.3.1.4.

4.3.1.1 Preparación y control de esterilidad de los medios.

Empleamos varios lotes preparados a lo largo de esta fase experimental. Todos los productos finalmente utilizados conformaron los criterios de calidad (Anexo 4.A)

4.3.1.2 Control de calidad de las cepas huésped

Siempre antes de la preparación de un cultivo de trabajo, controlamos la calidad de las cepas huésped. Simplificando, para *E. coli* WG5 las colonias crecidas en placas agar McConkey fueron lac+, para *S. typhimurium* WG49 las colonias crecidas en dichas placas fueron lac+ y presentaron sensibilidad a la Kanamicina y resistencia al Ácido nalidíxico. La tinción Gram de *Bact. fragilis* fue negativa y se presentaron como bacilos. La evaluación de las cepas fue correcta (Anexo 4.B).

4.3.1.3 Viabilidad de los cultivos de trabajo.

En el Anexo 4.C presentamos los formularios más convenientes para controlar y validar los cultivos de trabajo de *E. coli* WG5, *S. typhimurium* WG49 y *Bact. fragilis* HSP40. Algunas curvas de crecimiento de la evolución de estos cultivos inóculo se muestran en las gráficas incluidas en el capítulo 2 de material y métodos generales de esta memoria.

4.3.1.4. Enumeración y cartas de control de los materiales de referencia utilizados.

En el Anexo 4.D se representan las cartas de control con los resultados utilizados para calcular los límites del control. Los valores del promedio, límites de advertencia y límites de acción así obtenidos para cada lote de bacteriófago de referencia se utilizaron para verificar los controles positivos realizados en cada sesión de análisis de bacteriófagos garantizando de esta forma la calidad de los resultados.

4.3.2 MUESTRAS ANALIZADAS EN LA CAMPAÑA 1997.

La tabla que presentamos a continuación es un resumen de las muestras analizadas durante el periodo objeto de estudio.

Tabla 4.1. Resumen de las muestras analizadas durante la temporada 1997.

Método		<i>E. coli</i> /100 ml					Total
concentración		<10	10-99	100-2000	>2000	ND*	
Filtración 100 ml	río	2	2	3	13 ^a	0	20
	mar	3	1	13 ^b	16 ^c	4 ^d	37
Floculación 1000 ml	río	3	3	5	11	0	22
	mar	7	4	16	8	0	35
Comunes filtración y floculación	río	1	2	3	7	0	13
	mar	2	1	10	2	0	15
TOTAL	río	4	3	5	17	0	29
	mar	8	4	19	22	4	57

*ND: no determinado, muestra donde *E. coli* no ha sido analizada y no nos atrevemos a ubicar dicha muestra dentro de uno de los cuatro grupos anteriores.

^{a,b,c,d} Ver texto para explicación.

El número de resultados de recuperación de bacteriófagos para el método de filtración es superior a 57 (número de muestras analizadas) debido a las repeticiones de filtración realizadas dentro de una misma muestra. Dentro del grupo "a" de la Tabla 4.1, tres muestras se analizaron por triplicado, es decir se realizaron tres filtraciones por grupo de bacteriófago y por tanto disponemos de tres resultados de recuperación para cada una de estas muestras por fago (podemos considerar que se trata de submuestras dentro de una misma muestra). De forma parecida, en los grupos "b", "c" y "d" se realizaron varias repeticiones de filtración en algunas muestras. Para el resto de las muestras no mencionadas, se realizó un único experimento de concentración por grupo de bacteriófago y se constata un único resultado de recuperación por muestra y bacteriófago. En el siguiente esquema se resumen las repeticiones efectuadas:

Grupo	muestras	repeticiones de filtración/grupo de fago*
a (río >2000)	3	3
b (mar 100-2000)	2	3-4
	1	2
c (mar >2000)	5	3-4
	7	2
d (mar)	2	3-4

* número de porcentajes de recuperación que pueden calcularse para cada grupo de fagos por muestra.

4.3.3 METODOLOGÍA DE CONCENTRACIÓN:

- ⇒ FILTRACIÓN DE 100 ml, filtración-elución orbital
- ⇒ FLOCULACIÓN DE 1000 ml, floculación por $Mg(OH)_2$

4.3.3.1 Valoración de la eficiencia de los métodos, para cada grupo de bacteriófagos, a través de la enumeración de fagos antes y después de concentrar.

- Problemas de imprecisión en el cálculo de los porcentajes de recuperación:
- Muestras altamente polucionadas: Es manifiesta una dificultad de lectura de calvas en las placas de concentrado debida a la flora acompañante. Este problema se acusa más para los fagos de *Bact. fragilis* seguidos por los fagos F-específicos. Por ello, es importante el tiempo de incubación de las placas (a 37°C) y el tiempo transcurrido desde la incubación a la lectura (a temperatura ambiente) para los tres grupos de fagos.
- Muestras con bajos recuentos: La baja precisión en la enumeración, debido a un componente aleatorio, hace que a menudo la eficiencia de recuperación obtenida sea inferior a la esperada. En ocasiones se detectan fagos en la muestra directa, mientras que este mismo grupo de fagos está ausente en el concentrado (según caso, no se analiza el volumen completo de concentrado). Esto puede explicarse en parte a una distribución no uniforme de los microorganismos en un volumen dado de muestra ambiental.
- Criterios que hemos utilizado para valorar la recuperación de bacteriófagos:
- 1. Se calcula la eficiencia de concentración sólo para aquellas muestras en las que se han detectado fagos tanto directamente como en el concentrado. Los porcentajes de recuperación superiores a 100, se consideran tal cual, sin modificar.
- 2. Si en la muestra directa, el grupo de fagos diana no se detecta, pero éste sí que se consigue cuantificar en el concentrado, el porcentaje de recuperación del método se considera 100 %. Los porcentajes de recuperación superiores a 100 se sustituyen por 100. Con esta interpretación el número de casos (n) es superior al que considera el criterio 1.

En ambos supuestos quedan excluidos aquellos casos que resultaron positivos en la muestra directa y negativos en el concentrado, o cuando no se detectaron bacteriófagos ni antes ni después de concentrar.

Los diagramas de caja presentados en la Figura 4.1 muestran la distribución de los porcentajes de recuperación de colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 obtenidos al concentrar muestras naturales de mar y río por filtración-elución orbital y por floculación de $Mg(OH)_2$. Los porcentajes superiores a 100 se han considerado tal cual, mientras que no se han contabilizado los casos en que en el directo no se pudo cuantificar el número de fagos. En la representación de las recuperaciones por filtración se han incluido los porcentajes de recuperación que pertenecían a submuestras de una misma muestra.

Figura 4.1. Eficiencias de recuperación de colifagos somáticos (SOM), fagos F-específicos (F-TOT) y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 (BFB) a partir de muestras naturales por filtración-elución orbital y por floculación de hidróxido de magnesio.

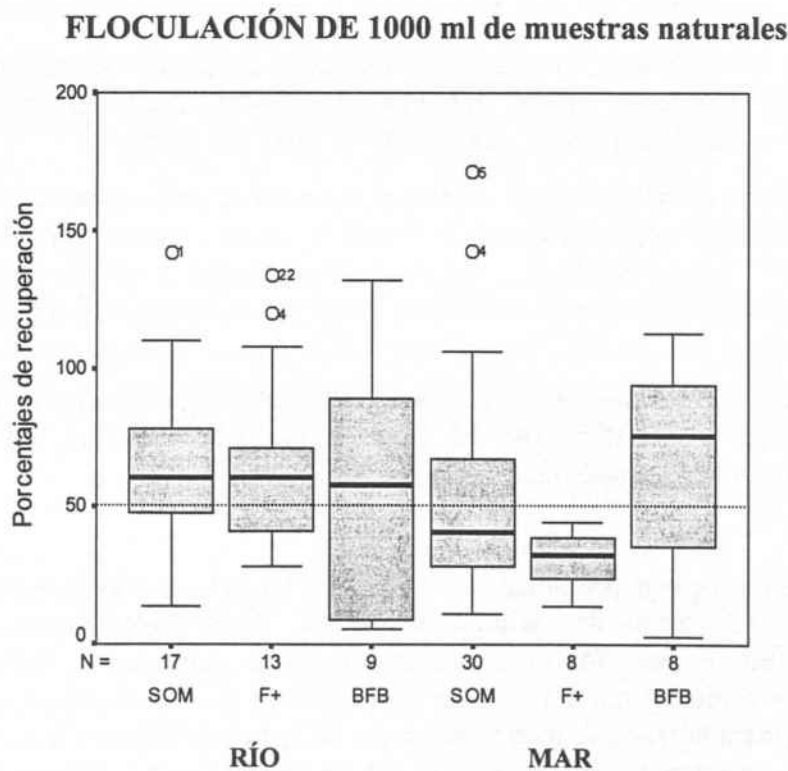
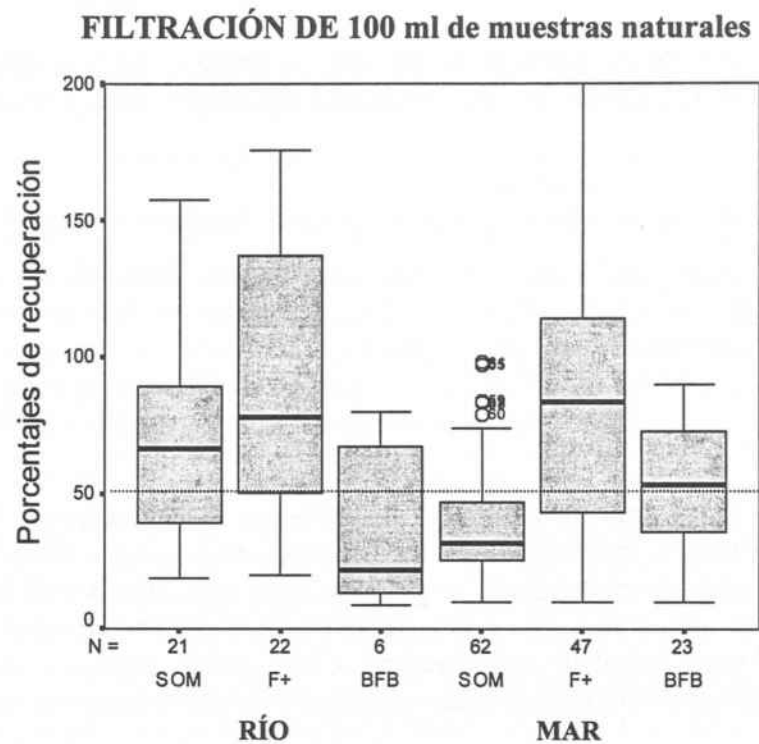


Tabla 4.2. Estadísticos descriptivos de los resultados de recuperación de bacteriófagos por filtración de 100 ml de muestras naturales. Se han tenido en cuenta todos los porcentajes de recuperación que se han podido calcular.

MAR	n	Mínimo	Máximo	Media	Desv. est.
SOM	62	10	98	38.2	20.2
F-TOT	47	10	373	90.9	72.8
BfHSP	23	10	90	51.2	25.6
RÍO					
SOM	21	19	157	72.7	42.5
F-TOT	22	20	176	88.2	48.1
BfHSP	6	9	80	35.5	30.3

Tabla 4.3. Resultados de recuperación de bacteriófagos por filtración de 100 ml de muestras naturales. Los diferentes experimentos de filtración realizados sobre una misma muestra se han resumido con la media de recuperación, de forma que para cada muestra y grupo de bacteriófagos sólo se ha considerado un resultado de eficiencia. El primer valor que aparece en la columna "media" corresponde al valor promedio calculado según criterio 1 y el segundo valor corresponde al promedio calculado según criterio 2. En el resto de parámetros estadísticos, se constatan los resultados siguiendo el criterio 1. (Ver texto para explicación de criterio 1 y criterio 2).

MAR	n	Mínimo	Máximo	Media	Desv. est.
SOM	36	10	98	42.3 - 43.8	23.5
F-TOT	24	13	294	85.2 - 74.8	68.8
BfHSP	10	15	79	49.8 - 68.6	22.5
RÍO					
SOM	15	19	102	54.5 - 59.6	26.1
F-TOT	16	20	136	64.9 - 62.1	32.4
BfHSP	6	9	80	35.5 - 67.8	30.3

Tabla 4.4. Resultados de recuperación de bacteriófagos por floculación de 1000 ml de muestras naturales. El primer valor que aparece en la columna "media" corresponde al valor promedio calculado según criterio 1 y el segundo valor corresponde al promedio calculado según criterio 2. En el resto de parámetros estadísticos, se constatan los resultados siguiendo el criterio 1. (Ver texto para explicación de criterio 1 y criterio 2).

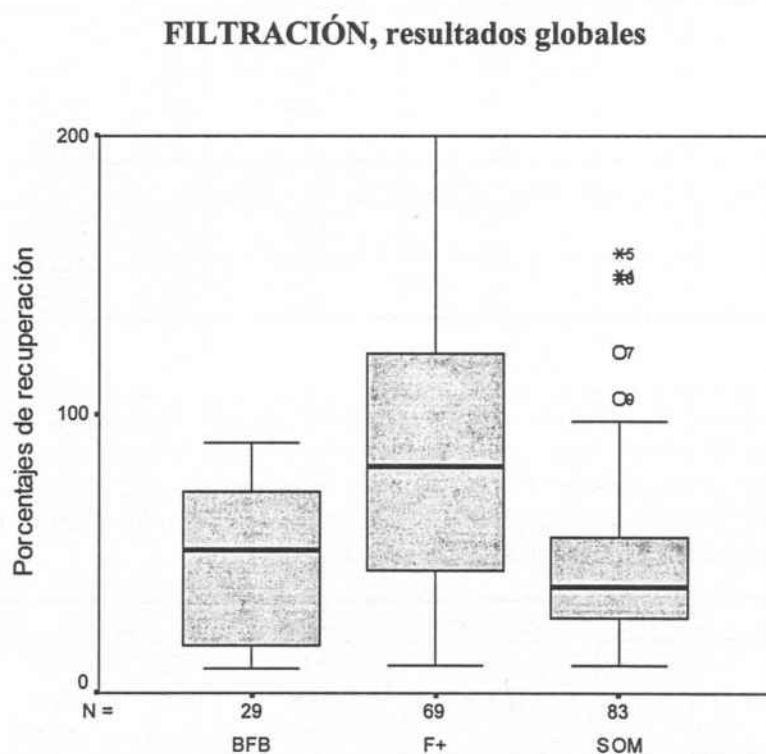
MAR	n	Mínimo	Máximo	Media	Desv. est.
SOM	30	11	171	52.9 - 54.8	39.0
F-TOT	8	14	44	30.8 - 74.9	10.5
BfHSP	8	3	113	65.9 - 81.0	40.5
RÍO					
SOM	17	14	142	66.0 - 69.5	33.6
F-TOT	13	28	134	66.2 - 68.6	29.1
BfHSP	9	5	132	55.3 - 67.9	52.9

Las Tablas 4.2 y 4.3 resumen los resultados de recuperación de bacteriófagos por filtración según los criterios definidos anteriormente para el cálculo de la eficiencia del método. De igual forma, la Tabla 4.4 resume los porcentajes de recuperación de bacteriófagos por floculación.

4.3.3.2 El método objeto de estudio, ¿funciona de forma equivalente para colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40?

Considerando los resultados globales de recuperación por filtración aplicada a muestras naturales, el análisis de la varianza de un factor señala diferencias significativas entre grupos de bacteriófagos ($F= 17.776$; $P= 0.000$). Tal y como observamos en la Figura 4.2, con el método de filtración los fagos F-específicos se recuperan mejor que los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 cuyo porcentaje de recuperación medio es similar al que muestran los colifagos somáticos (medias de 90.9, 47.9 y 46.9 respectivamente).

Figura 4.2. Recuperación de bacteriófagos por filtración de 100 ml a partir de muestras naturales. Comparación de las eficiencias de concentración entre los tres grupos de fagos candidatos a microorganismos modelo.



A diferencia de lo que ocurrió con el método de filtración, en la floculación no se detectaron diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de los diferentes grupos de bacteriófagos (medias de 57.6 ± 37.6 , 52.7 ± 32.6 y 60.3 ± 44.6 para colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40).

respectivamente; el valor después del símbolo “±” es la desviación estándar de la serie de datos utilizados para calcular la media). La Tabla 4.8 muestra los resultados globales de filtración y floculación para cada grupo de bacteriófagos por separado.

4.3.3.3 ¿Hay diferencias de recuperación entre las muestras de mar y río?

Comprobamos que los dos métodos objeto de estudio eran aplicables tanto a aguas marinas como a aguas continentales, para los tres grupos de bacteriófagos y con tasas de recuperación equiparables. Con los datos de filtración, contrastamos resultados de eficiencias en mar y en río para cada uno de los fagos por separado. De igual forma, los porcentajes de recuperación obtenidos por floculación en mar y en río se compararon y se aplicó análisis de la varianza de un factor. El resumen de los resultados de comparación entre mar y río se presenta en la Tabla 4.5. Los estadísticos descriptivos son los que se muestran en la Tabla 4.2 para la filtración y en la Tabla 4.4 (considerando la media de la primera columna) para la floculación.

Tabla 4.5. Resumen de los resultados obtenidos por comparación de medias y tablas de ANOVA de un factor para reconocer posibles diferencias en los porcentajes de recuperación entre mar y río. Concentración de muestras naturales por filtración y por floculación.

Comparación de los % de recuperación	FILTRACIÓN	FLOCULACIÓN
	<u>MAR Y RÍO</u>	<u>MAR Y RÍO</u>
SOM	$F= 24.703, P= 0.000$ río > mar	no hay diferencias
F-TOT	no hay diferencias	$F= 7.775, P= 0.012$ río > mar
BfHSP	no hay diferencias	no hay diferencias

4.3.3.4 La eficiencia del método objeto de estudio, ¿se ve afectada por la concentración del fago diana en la muestra inicial?

Las figuras 4.3 y 4.4 resumen los resultados de recuperación por filtración para colifagos somáticos y fagos F-específicos y de *Bact. fragilis* en función del número de dichos bacteriófagos en las muestras analizadas antes de concentrar. De forma análoga, las figuras 4.5 y 4.6 muestran los porcentajes de recuperación por floculación de bacteriófagos en función de la concentración en la muestra inicial. Estas gráficas no ponen de relieve diferencias en la eficiencia de los métodos debidas a las pfp en 100 ml de muestra directa. La Tabla 4.6 agrupa las muestras que presentan un porcentaje de recuperación igual o superior a 50.

Figura 4.3. Resultados de la recuperación por filtración de colifagos somáticos en función de la concentración de estos fagos en la muestra inicial antes de concentrar.

Muestras naturales, filtración 100 ml

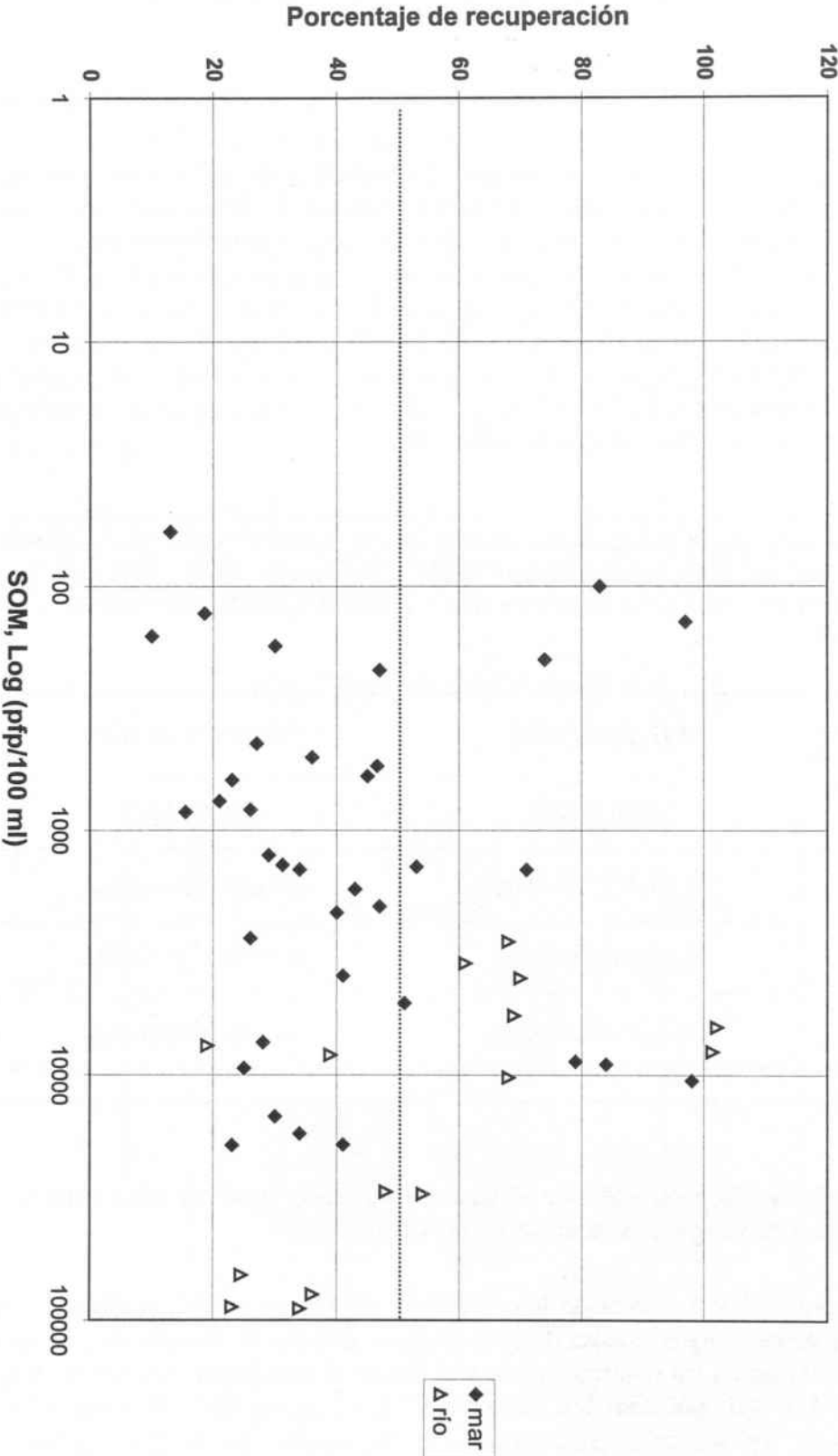


Figura 4.4. Resultados de la recuperación por filtración de bacteriófagos F-específicos totales y de *Bact. fragilis* HSP40 en función de la concentración de dichos bacteriófagos en la muestra inicial antes de concentrar.

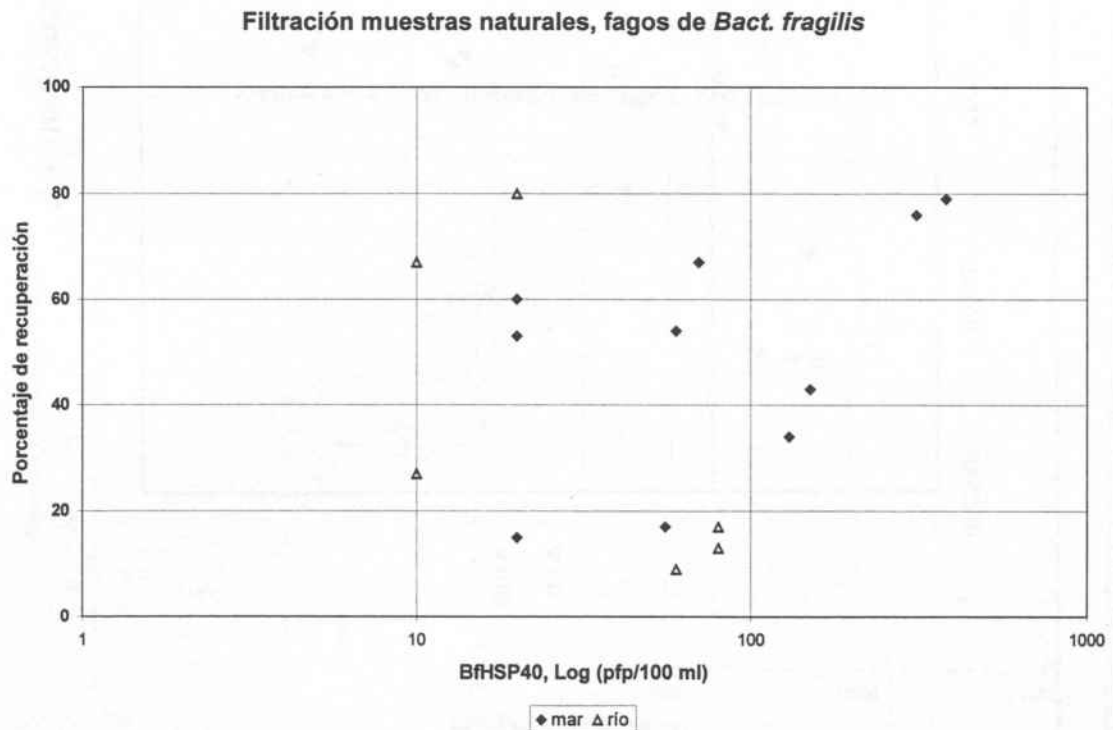
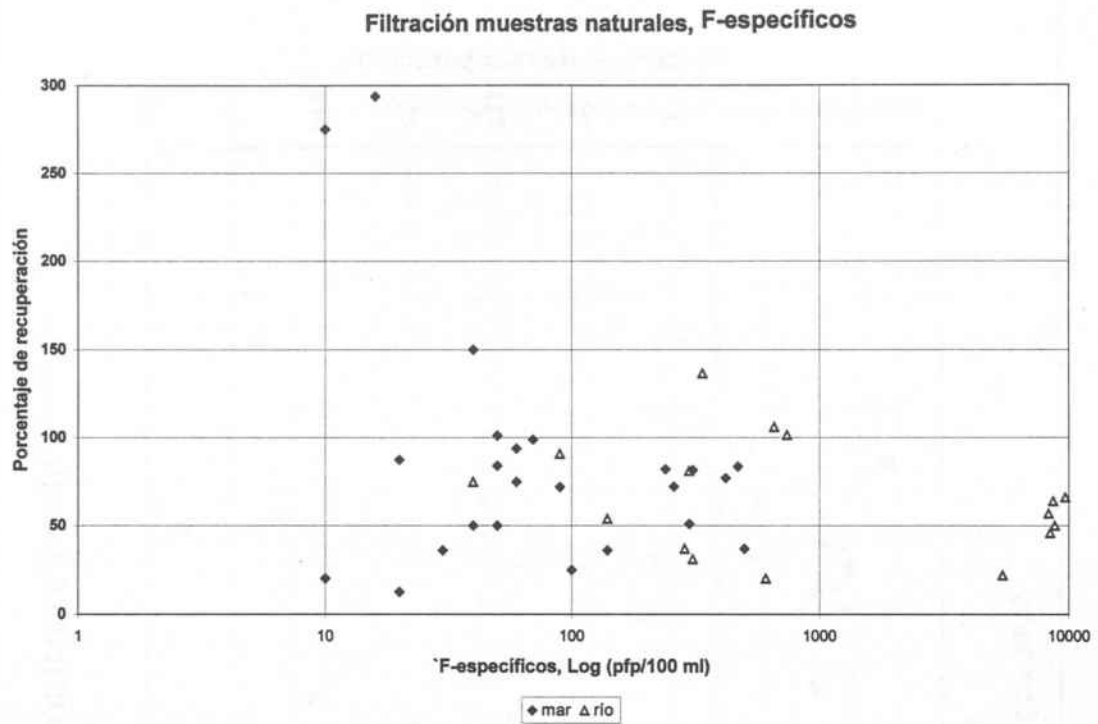


Figura 4.5. Resultados de la recuperación por floculación de colifagos somáticos en función de la concentración de éstos en la muestra inicial antes de concentrar.

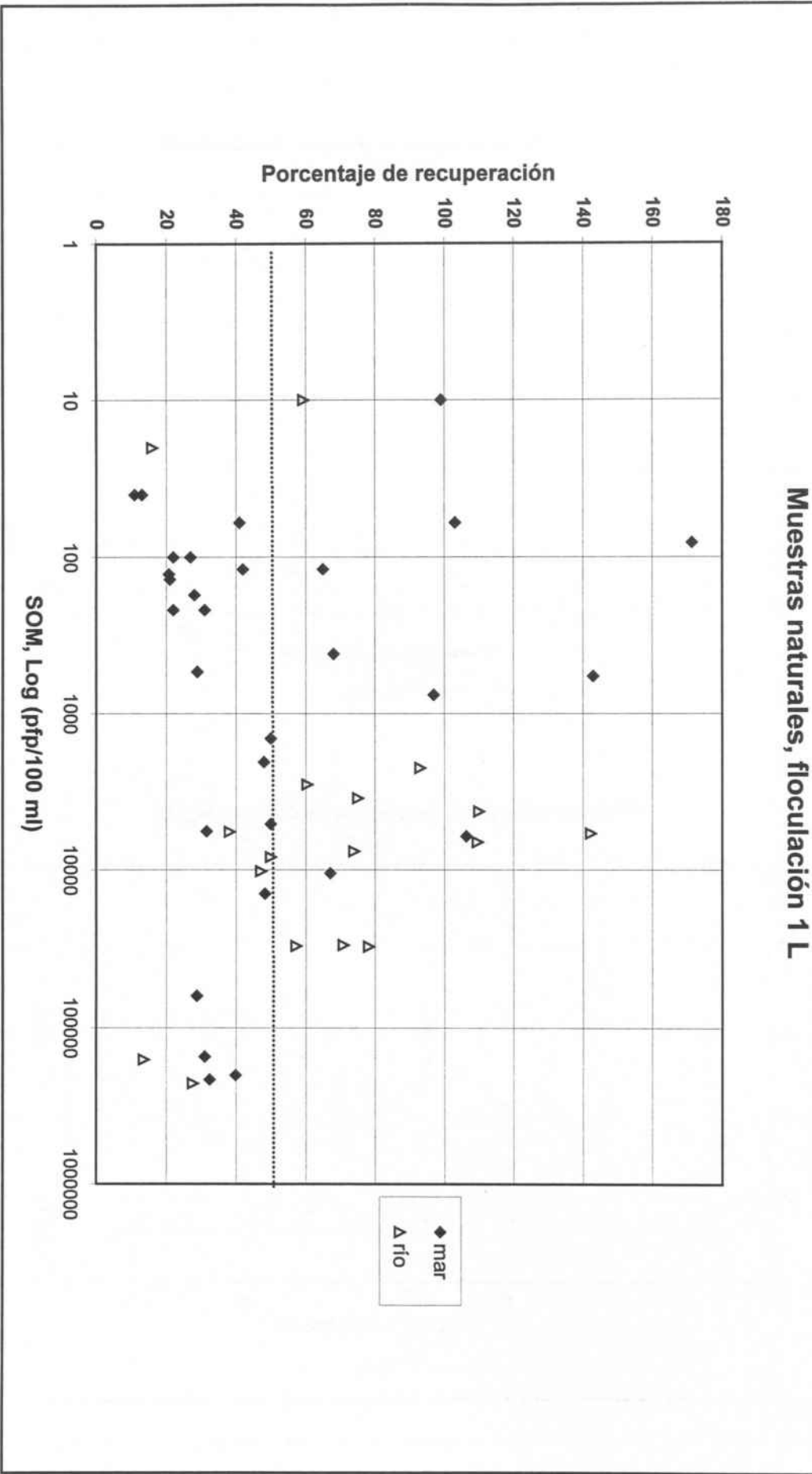


Figura 4.6. Resultados de la recuperación por floculación de bacteriófagos F-específicos totales y de *Bact. fragilis* HSP40 en función de la concentración de dichos bacteriófagos en la muestra inicial antes de concentrar.

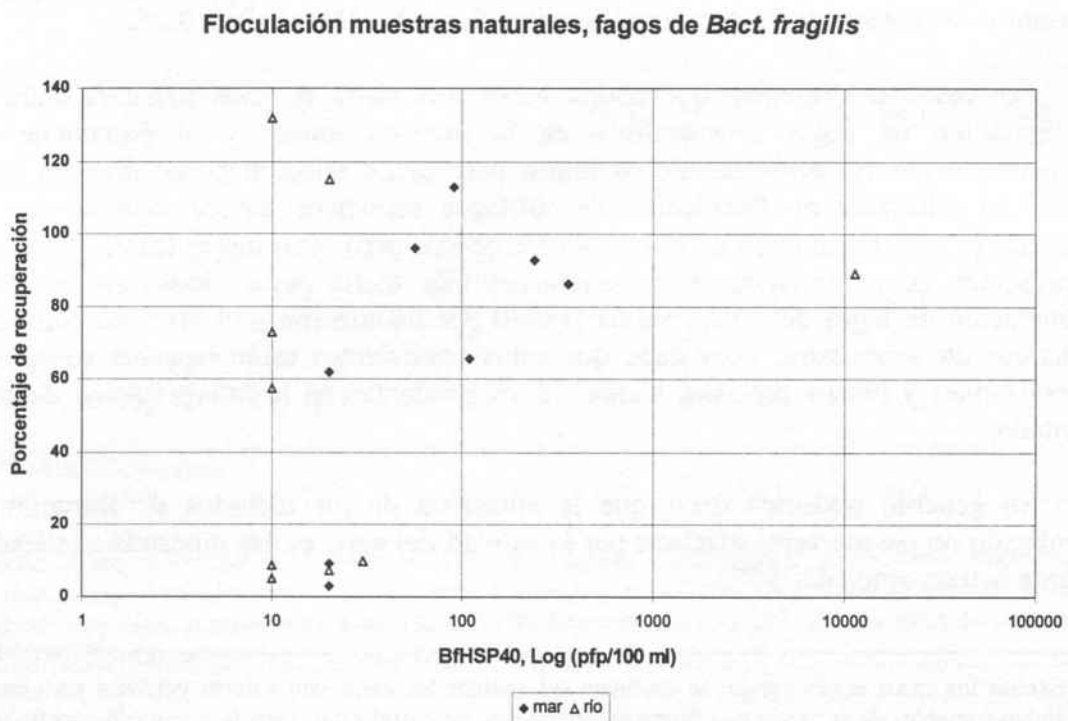
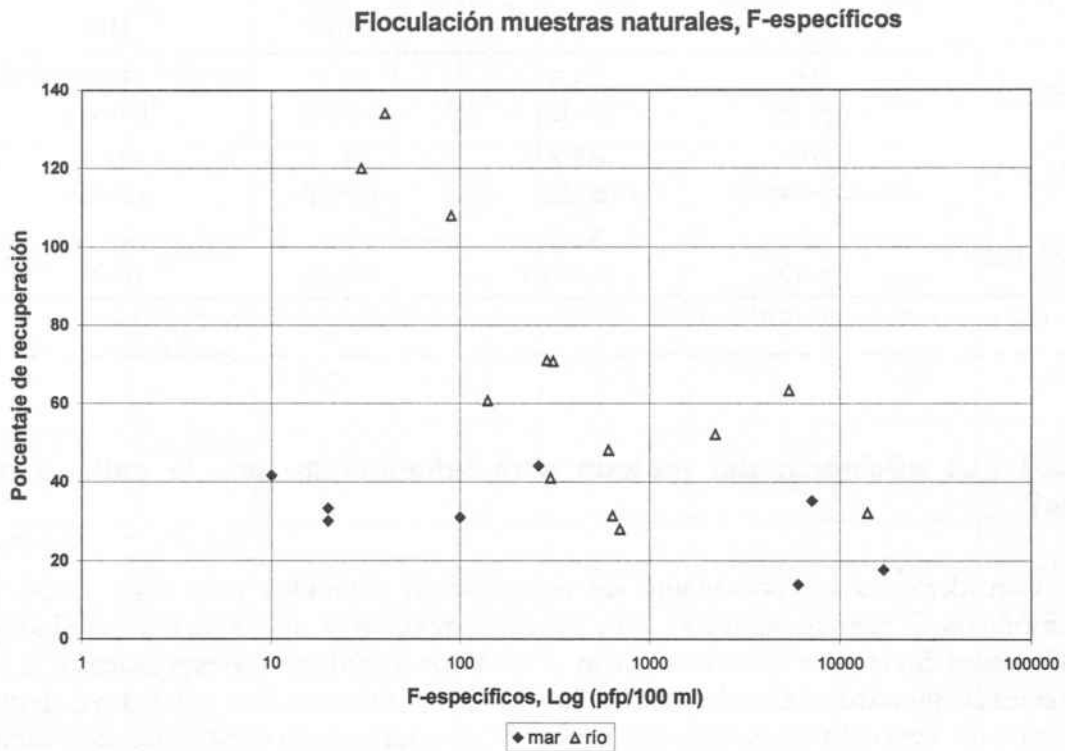


Tabla 4.6. Porcentaje de resultados superiores al 50 % de eficiencia de concentración por filtración y por floculación, según se trate de muestras marinas o fluviales.

	Porcentaje de muestras con eficiencia de recuperación $\geq 50\%$			
	<u>FILTRACIÓN</u>		<u>FLOCULACIÓN</u>	
	Mar	Río	Mar	Río
SOM	25 (n= 36)	53.3 (n= 15)	36.7 (n= 30)	70.6 (n= 17)
F-TOT	75 (n= 24)	68.8 (n= 16)	0 (n= 8)	61.5 (n=13)
BfHSP	60 (n= 10)	33.3 (n= 6)	75 (n= 8)	55.6 (n= 9)

En este caso, n es el número de muestras para las que se dispone de resultado de recuperación.

4.3.3.5 ¿La eficiencia del método está influenciada por la calidad del agua?

Consideramos los porcentajes de recuperación obtenidos para cada grupo de bacteriófagos y método aplicado para su concentración y aplicamos el análisis de correlaciones bivariadas en relación con el resto de variables correspondientes a los diferentes parámetros analizados dentro de una misma muestra. Los valores por debajo del límite de detección no los hemos incluido en el cálculo de la correlación de Pearson y los casos se han excluido según pareja⁽¹⁾; se ha seleccionado la prueba de significación bilateral. En la Tabla 4.7 presentamos un resumen de las correlaciones llevadas a cabo y señalamos los valores que fueron significativos al nivel 0.01 o al nivel 0.05.

Los resultados apuntan que podría haber una cierta relación negativa entre la concentración de fagos F-específicos en la muestra inicial y el porcentaje de recuperación por filtración de dichos fagos, pero dicha relación no se muestra muy fuerte. La eficiencia de floculación de colifagos somáticos parece mejorar con el aumento de la concentración de *E. coli* y enterococos pero estas dependencias tampoco se presentan como decisivas. Una correlación más fuerte parece mostrarse entre la recuperación de fagos de *Bact. fragilis* HSP40 por floculación y el nivel de colifagos somáticos en la muestra, pero dado que estos coeficientes están basados en menos observaciones y menos precisas, hemos de ser prudentes en la interpretación de este resultado.

En general, podemos decir que la eficiencia de los métodos de filtración y floculación no parece verse afectada por la calidad del agua de las muestras analizadas durante la temporada de 1997.

(1) Excluir los casos según pareja: se excluyen del análisis los casos con valores perdidos para una o ambas variables de la pareja que forma un coeficiente de correlación. Debido a que cada coeficiente está basado en todos los casos que tienen códigos válidos para esa pareja concreta de variables, en cada cálculo se utiliza la mayor cantidad de información disponible.

Tabla 4.7. Correlaciones entre los porcentajes de recuperación (%recup.) por filtración o por floculación de los diferentes grupos de bacteriófagos y las variables de calidad y definición de las muestras analizadas.

		FILTRACIÓN (% recup.)			FLOCULACIÓN (%recup.)		
		SOM	F-TOT	BfHSP	SOM	F-TOT	BfHSP
E.coli	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	0.366 0.039 32	NO	NO
LOGEcoli	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
EF	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
LOGEF	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	0.412 0.030 28	NO	NO
CP	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
LOGCP	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Turbidez	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
pH	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Salinidad	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SOMd	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	0.738 0.001 16
LOGSOMd	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	0.755 0.001 16
F-TOTd	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
LOGFd	C. Pearson Sig. n	NO	-0.330 0.038 40	NO	NO	NO	NO
BfHSPd	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO
LOGBfHSD	C. Pearson Sig. n	NO	NO	NO	NO	NO	NO

SOMd: colifagos somáticos titulados en la muestra directa sin concentrar; LOGSOMd: logaritmo de colifagos somáticos directos; F-TOTd: fagos F-específicos titulados en la muestra directa; LOGFd: logaritmo de fagos F-específicos directos; BfHSPd: fagos de *Bact. fragilis* HSP40 antes de concentrar; LOGBfHSD: logaritmo de fagos de *Bact. fragilis* directos.

4.3.3.6 ¿Hay diferencias de recuperación entre los métodos de filtración y floculación?

Se han comparado las medias de recuperación global entre filtración y floculación para cada grupo de bacteriófagos por separado; el análisis de la varianza de un factor señala diferencias estadísticamente significativas entre filtración y floculación para fagos F-específicos ($F= 6.291$, $p= 0.014$), a favor de la filtración, mientras que no advierte diferencias para colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40. La Tabla 4.8 resume los resultados globales de filtración y floculación.

Tabla 4.8. Porcentajes de recuperación globales por filtración y por floculación.

% recuperación		FILTRACIÓN	FLOCULACIÓN
SOM	n	83	47
	media	47.0	57.7
	desv. est.	31.2	37.6
F-TOT	n	69	21
	media	90.0	52.7
	desv.est.	65.6	32.6
BfHSP	n	29	17
	media	47.9	60.3
	desv. est.	26.9	44.6

La comparación de los valores enmarcados resulta en diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

Otra forma de examinar la eficacia de ambos métodos es tomando sólo los resultados obtenidos tras concentrar muestras que presentaban niveles de *E. coli* <100 cfp/100 ml.

Tabla 4.9. Niveles de bacteriófagos antes de concentrar (directo) y después de concentrar por filtración o por floculación en muestras con *E. coli* <100 cfp/100 ml.

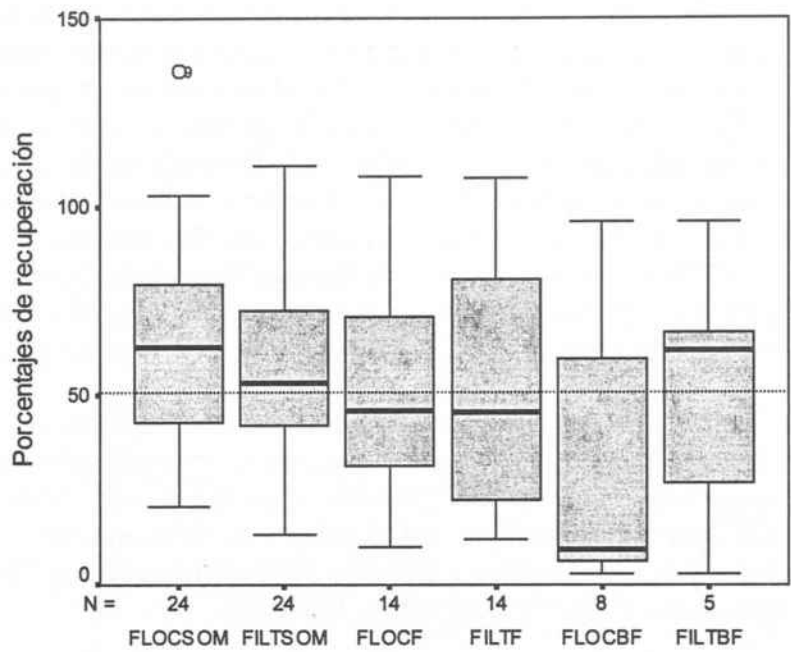
n = 8		<i>E. coli</i> <100 cfp/100 ml				
% positivos		SOM	F-TOT		BfHSP	
Directo	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0
Filtración	6/8	75	2/8	25	0/8	0
n= 17		<i>E. coli</i> <100 cfp/100 ml				
% positivos		SOM	F-TOT		BfHSP	
Directo	8/17	47	1/17	5.8	0/17	0
Floculación	17/17	100	6/17	35.3	3/17	17.6

En la Tabla 4.9 observamos que con el método de floculación se obtienen más muestras positivas para todos los bacteriófagos estudiados que con la filtración en muestras poco polucionadas.

No obstante estos resultados, volvimos a comparar las eficiencias de filtración y floculación, pero en esta ocasión considerando sólo aquellas muestras que fueron sometidas a ambos métodos de concentración. De esta forma, la calidad de las muestras sobre las que se aplican los métodos es la misma y las diferencias en los porcentajes de recuperación se deberían al método en sí y no a otros factores. La Figura 4.7 es un resumen gráfico de los resultados de filtración y floculación sobre las mismas muestras; se trata de 15 muestras de mar y 13 de río, aunque el número de recuperaciones que se han podido calcular es menor a 28 para todos los grupos de bacteriófagos. En estas muestras, la comparación de medias y tablas ANOVA no denotan diferencias entre floculación en mar y en río, ni entre filtración en mar y en río, para ningún grupo de fagos. Ya que para cada muestra y fago se dispone de dos valores, el porcentaje de recuperación de filtración y la recuperación de floculación, se ha aplicado la prueba t de muestras relacionadas y no se han evidenciado diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos para ningún grupo de bacteriófago indicador.

Por lo que se refiere a la sensibilidad de los métodos, en la Tabla 4.10 se muestran los porcentajes de muestras positivas para cada grupo de bacteriófagos antes y después de concentrar las mismas muestras por filtración y por floculación. Podemos observar que la floculación aporta más positivos que el método de filtración, pero se ha de tener en cuenta que el volumen equivalente a muestra directa analizado por floculación para cada bacteriófago es mayor que en el caso de la filtración.

Figura 4.7. Floculación por $Mg(OH)_2$ de 1000 ml y filtración-elución orbital de 100 ml, métodos aplicados sobre la misma muestra.



FLOCSOM: recuperación de colifagos somáticos por floculación; FILTSOM: recuperación de colifagos somáticos por filtración; FLOCF: recuperación de fagos F-totales por floculación; FILTF: recuperación de fagos F-totales por filtración; FLOCBF: recuperación de fagos de *Bact. fragilis* por floculación; FILTBF: recuperación de fagos de *Bact. fragilis* por filtración.

Tabla 4.10. Resumen de los resultados positivos para bacteriófagos de aquellas muestras que fueron concentradas por filtración y por floculación.

% positivos n= 15	AGUA DE MAR (<i>E. coli</i> 0-10700 cfp/100 ml)		
	DIRECTO	FILTRACIÓN	FLOCULACIÓN
SOM	93.3	100	100
F-TOT	26.7	60	80
BfHSP	20	26.7	60
% positivos n= 13	AGUA DE RÍO (<i>E. coli</i> 0-37000 cfp/100 ml)		
	DIRECTO	FILTRACIÓN	FLOCULACIÓN
SOM	76.9	91.7	100
F-TOT	76.9	76.9	84.6
BfHSP	46.2	63.6	69.2

4.3.4. PRIMERA APROXIMACIÓN A LA ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS.

4.3.4.1 Importancia de la concentración de bacteriófagos

La necesidad de concentrar se pone en evidencia con las muestras menos polucionadas. En la Tabla 4.11 se han dividido las aguas analizadas durante la campaña 97 en tres calidades diferentes, atendiendo a los niveles de *E. coli*, y se puede comprobar que el porcentaje de muestras positivas para cada grupo de bacteriófagos aumenta tras la concentración.

Tabla 4.11. Bacteriófagos fecales detectados antes y después de concentrar muestras ambientales (mar y río) con distintos niveles de *Escherichia coli*.

positivos n= 19	<i>E. coli</i> <100 cfp/100 ml	
	Sin concentrar	Después de concentrar
SOM	9/19 (47.4 %)	100 %
F-TOT	1/19 (5.3 %)	6/19 (31.6 %)
BfHSP	0/19 (0 %)	3/19 (15.8 %)
positivos n= 22	<i>E. coli</i> 100-2000 cfp/100 ml	
	Sin concentrar	Después de concentrar
SOM	100 %	100 %
F-TOT	9/22 (40.9 %)	20/22 (90.9 %)
BfHSP	5/22 (22.7 %)	10/22 (45.5 %)
positivos n= 37	<i>E. coli</i> >2000 cfp/100 ml	
	Sin concentrar	Después de concentrar
SOM	100 %	100 %
F-TOT	36/37 (97.3 %)	100 %
BfHSP	26/37 (70.3 %)	29/37 (78.4 %)

Tabla 4.12. Bacteriófagos fecales detectados antes y después de concentrar muestras ambientales (mar y río) con niveles de EF <33 cfp/100 ml.

positivos n= 27	EF <33 cfp/100 ml	
	Sin concentrar	Después de concentrar
SOM	17/27 (63.0 %)	100 %
F-TOT	1/27 (3.7 %)	13/27 (48.1 %)
BfHSP	0/27 (0 %)	5/27 (18.5 %)

La Tabla 4.12 considera las muestras con menos de 33 estreptococos fecales en 100 ml y repite la misma idea anterior de que el número de positivos para fagos aumenta después de la concentración.

4.3.4.2 Correlaciones bivariadas

Las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk ponen de manifiesto que los datos microbiológicos correspondientes a muestras marinas y a muestras fluviales transformados a logaritmo en base 10 siguen una distribución normal. Los valores 0 (por debajo del límite de detección del/os método/s) no se han considerado para el cálculo de logaritmos. El análisis de correlaciones bivariadas en muestras marinas y fluviales señala correlaciones significativas al nivel 0.01 entre los logaritmos de casi todos los parámetros microbiológicos; la Tabla 4.13 resume las intersecciones que ofrecen correlaciones significativas.

Tabla 4.13. Correlaciones bivariadas significativas al nivel 0.01 entre parámetros microbiológicos en las muestras marinas, fluviales y en el conjunto global (mar y río) de muestras analizadas durante la campaña 97. Las excepciones se señalan en las casillas correspondientes.

	EF	CP	SOM	F-TOT	BfHSP
EC	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ (río p= 0.049)
EF		SÍ	SÍ	SÍ	SÍ (río p= 0.022; global mar y río c. débil p= 0.048)
CP			SÍ	SÍ	sólo correlación significativa en río
SOM				SÍ	SÍ
F-TOT					SÍ

El pH se correlaciona negativamente con todas las variables microbiológicas. La turbidez no parece relacionarse con bacterias y fagos indicadores en las muestras de mar mientras que en muestras fluviales se correlaciona significativamente y en positivo con bacterias y bacteriófagos, a excepción de los fagos de *Bact. fragilis* HSP40.

Este análisis grotesco agrupando todos los datos en una única tabla (mar y río) o en dos tablas (mar por un lado y río por otro), no sería el más apropiado para establecer relaciones entre parámetros microbiológicos en aguas recreativas porque las correlaciones se ven exageradas y están cercanas a las del agua residual debido a que muchas muestras se corresponderían con aguas polucionadas no aptas para el baño. Un

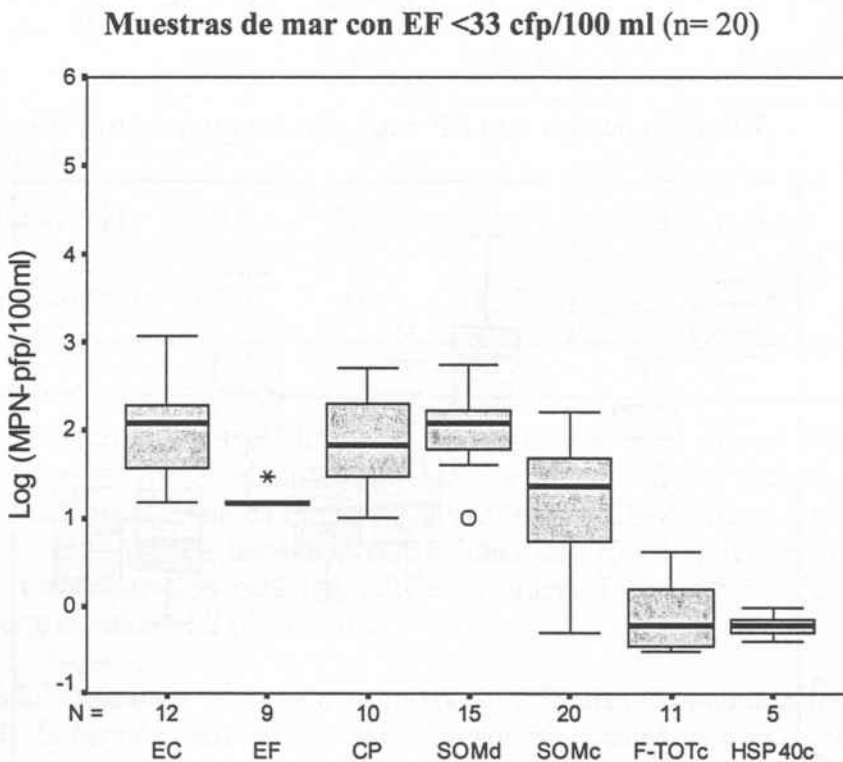
estudio más conveniente sería dividir los resultados en función de las distintas calidades de agua.

Cuando seleccionamos las muestras con niveles de EF <33 cfp/100 ml (n=27), comprobamos que los datos no siguen una distribución normal. Al aplicar la Rho de Spearman (prueba no paramétrica) sobre estas muestras no aparecen relaciones significativas. Así parece ser que en muestras poco polucionadas, los parámetros microbiológicos no se correlacionan entre sí ni con los parámetros físico-químicos.

4.3.4.3 Diagramas de cajas

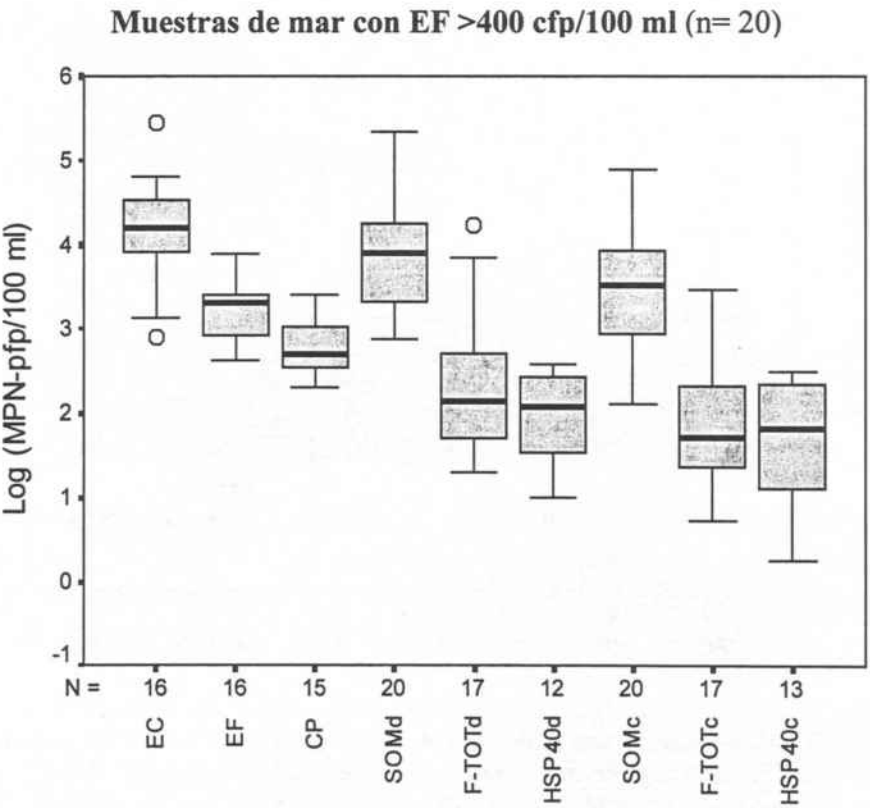
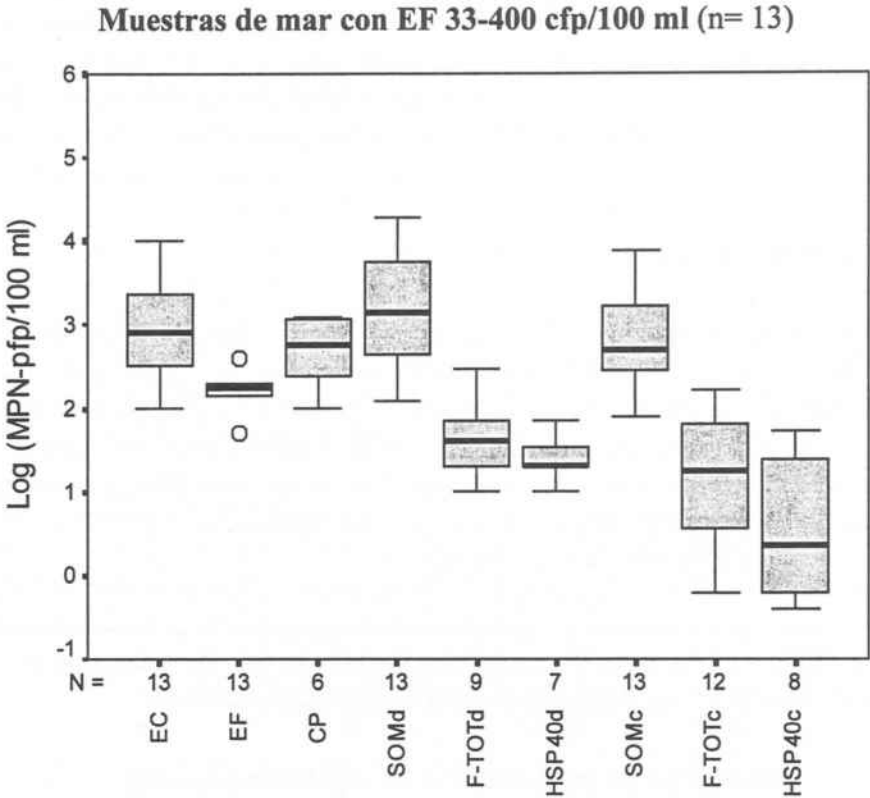
La representación en diagramas de cajas es una forma rápida de observar e interpretar los niveles de microorganismos que podemos encontrar en muestras ambientales. Así, la Figura 4.8 muestra un resumen de los resultados que obtuvimos al explorar los datos obtenidos en agua de mar, independientemente del método utilizado para la concentración de las muestras. Las muestras se han dividido en tres grupos para su estudio, en función de los niveles de enterococos fecales: ① EF <33 cfp/100 ml; ② EF 33-400 cfp/100 ml; ③ EF >400 cfp/100 ml.

Figura 4.8. Muestras de mar agrupadas según los niveles de enterococos fecales. Resultados de los diferentes parámetros microbiológicos analizados.



EC: *E. coli*; EF: enterococos fecales; CP: esporas de clostridios; SOMd: colifagos somáticos directos; SOMc: colifagos después de concentrar; F-TOTd: fagos F-TOT directos; F-TOTc: fagos F-TOT después de concentrar; HSP40d: fagos de *Bact. fragilis* HSP40 directos; HSP40c: fagos de *Bact. fragilis* HSP40 después de concentrar.

Continuación Figura 4.8, muestras de mar agrupadas según los niveles de enterococos fecales.



4.3.4.4 Curvas COR

Las curvas COR reportan el análisis de la asociación entre sensibilidad y especificidad de la presencia de fagos en relación a los valores de contaminación bacteriológica (Sackett *et al.*, 1992; Maiello *et al.*, 1997).

Las muestras sometidas a análisis de curvas COR fueron las playas marinas analizadas en la campaña 97 que presentaban niveles de *E. coli* <2000 cfp/100 ml (n=31). Utilizamos los colifagos somáticos, fagos F-específicos totales y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 como pruebas independientes para detectar la alteración "contaminación". Consideramos dos "patrones" diferentes, en análisis independientes: *E. coli* (alteración presente cuando *E. coli* >100 cfp/100 ml, alteración ausente cuando *E. coli* ≤100 cfp/100 ml) y estreptococos fecales (alteración presente cuando EF >33 cfp/100 ml, alteración ausente cuando EF ≤33 cfp/100 ml). El resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Resultados de sensibilidad y especificidad de los puntos de corte óptimos decididos después de la representación gráfica de las 6 curvas COR, correspondientes a cada uno de los grupos de fagos con un parámetro bacteriológico de contaminación.

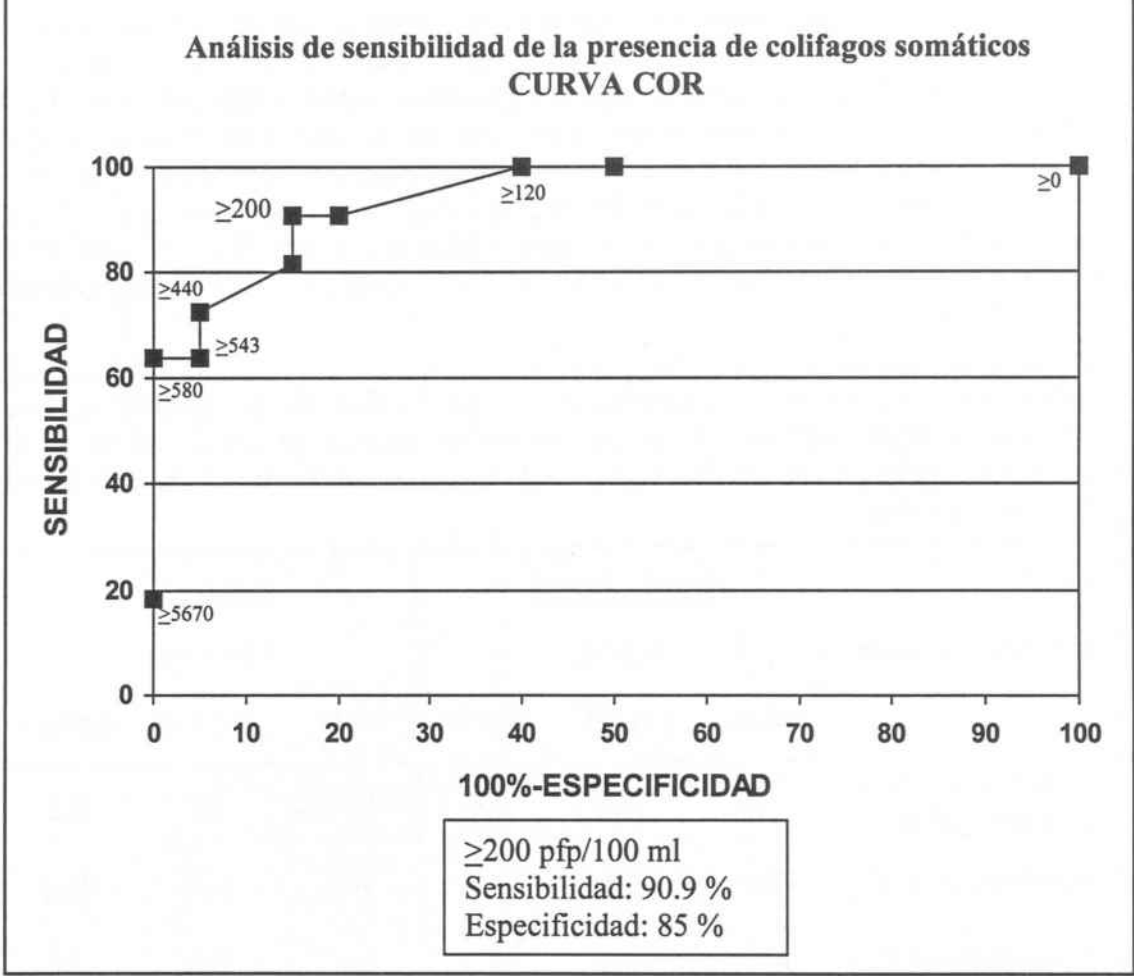
n= 31	<u>Patrón <i>E. coli</i></u>			<u>Patrón EF</u>		
Prevalencia alteración	54.8 %			35.5 %		
	SOM	F-TOT	BfHSP	SOM	F-TOT	BfHSP
Punto de corte ≥ x pfp/100 ml	440	1.2	0.6	200	1.8	0.6
Sensibilidad (%)	70.6	70.6	35.3	90.9	81.8	45.5
Especificidad (%)	92.9	92.9	85.7	85	85	85

Si consideramos que una playa está contaminada cuando *E. coli* >100 cfp/100 ml podemos utilizar la prueba colifagos somáticos para "diagnosticar" esta alteración: si los niveles de colifagos somáticos son ≥440 pfp/100 ml podemos decir que la playa está contaminada. Esta prueba tiene una sensibilidad del 70.6% y una especificidad del 92.9%. De forma parecida podemos utilizar la prueba F-específicos totales, siendo el punto de corte el valor ≥1.2 pfp/100 ml.

Cuando utilizamos el patrón estreptococos fecales (contaminación si EF >33 cfp/100 ml), la mejor prueba parece ser la de colifagos somáticos en el punto de corte ≥200 pfp/100 ml, con una sensibilidad de 90.9% y una especificidad de 85%; la Figura 4.9 representa dicha curva COR.

La prueba fagos de *Bact. fragilis* HSP40 es específica con relación a la ausencia de contaminación pero no es suficientemente sensible debido al bajo número de muestras positivas.

Figura 4.9. Curva COR en la que se representa la sensibilidad (tasa de verdaderos positivos) y el 100%-especificidad (tasa de falsos positivos) de la presencia de colifagos somáticos para detectar “contaminación” utilizando como patrón los EF (alteración presente cuando EF >33 cfp/100 ml).



4.4 DISCUSIÓN CAMPAÑA 97

4.4.1 METODOLOGÍA DE CONCENTRACIÓN

Las técnicas evaluadas en este capítulo con muestras naturales para la concentración de bacteriófagos indicadores han sido:

- Filtración de 100 ml de muestra con posterior elución orbital.
- Floculación de 1000 ml de muestra con la técnica de precipitación por $Mg(OH)_2$

Los procedimientos de trabajo se detallaron en el capítulo 3 (3.5).

Como ya señalamos en el apartado de resultados (4.3.3.1), tuvimos problemas para el cálculo de las eficiencias de concentración en las muestras que presentaban bajos números de fagos. Nos encontramos con los siguientes casos:

- Ausencia de fagos (no se detectan) en la muestra directa y detección en el concentrado.
- Detección de fagos en la muestra directa y ausencia de éstos en el concentrado.
- Obtención de porcentajes de recuperación menores a 20 o superiores a 100.

Con el método de filtración aplicado a muestras naturales, los resultados globales obtenidos en agua de mar muestran unas recuperaciones para colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 algo inferiores a las obtenidas en el laboratorio con MAR9 (colifago somático, *Myoviridae*) y B40-8 (fago que infecta a *Bact. fragilis* HSP40, *Siphoviridae*). Sin embargo, los fagos F-específicos totales manifiestan unas recuperaciones superiores en muestras naturales respecto a la eficiencia global conseguida con MS2 (fago F-específico de RNA, *Leviviridae*). (Comparación Tabla 3.13 y Tabla 4.3).

Con el método de floculación aplicado a muestras naturales de mar y río, los porcentajes globales de recuperación para los tres grupos de fagos son ligeramente inferiores a los obtenidos en el laboratorio con MAR9, MS2 y B40-8 añadidos (comparación tablas 3.30, 3.31, 3.32 y 4.4).

En cualquier caso, las eficiencias de recuperación de bacteriófagos indicadores con ambos métodos son superiores al 40 %, tanto en mar como en río y para los tres grupos de fagos investigados. Así, podemos considerar que los métodos de filtración y floculación son fiables en términos de eficiencia y sensibilidad.

La Tabla 4.15 presenta un resumen de los resultados obtenidos tras la evaluación de los métodos en estudio. Comprobamos que ambos métodos son aplicables y reproducibles con distintos tipos de muestras y diferentes calidades. Además, consideramos que ambos métodos son suficientemente simples en el ámbito técnico y económico como para ser prácticos en laboratorios de rutina.

Tabla 4.15. Aplicación de los métodos de filtración y floculación en muestras naturales para la concentración de bacteriófagos indicadores.

¿La eficiencia del método de concentración se ve afectada por:	Métodos en evaluación	
	FILTRACIÓN	FLOCULACIÓN
Tipo de fago: colifagos somáticos, fagos F-específicos totales y fagos de <i>Bact. fragilis</i> HSP40 Consideraciones para el análisis estadístico: muestras de mar y río agrupadas en un solo conjunto.	Mejor eficiencia en la concentración de fagos F-específicos ($P < 0.001$). No hay diferencias entre las recuperaciones de colifagos somáticos y fagos de <i>Bact. fragilis</i> .	Los tres grupos de fagos se recuperan de forma eficiente. No se detectan diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de los diferentes grupos.
Tipo de agua: mar y río	Diferencias significativas ($P < 0.001$) para el grupo de colifagos somáticos, que se recuperaron mejor en río que en mar. No hay diferencias estadísticas entre mar y río para los otros dos grupos de fagos.	La recuperación de fagos F-específicos fue mayor en río que en mar ($P < 0.05$); para los otros dos grupos de fagos no hubo diferencias.
Concentración del fago diana en la muestra inicial	La concentración inicial de fagos no parece afectar al porcentaje de recuperación del método.	La concentración inicial de fagos no parece afectar a la recuperación.
Calidad del agua: niveles de <i>E. coli</i> , EF, CP, turbidez, salinidad, pH	En el grupo de muestras analizadas, las recuperaciones de los diferentes grupos de fagos no parecen verse afectadas por la calidad del agua.	En el grupo de muestras analizadas, las recuperaciones de los diferentes grupos de fagos no parecen verse afectadas por la calidad del agua.
Método escogido: Filtración o floculación	La aplicación de los métodos de filtración y floculación sobre la misma muestra, rinde porcentajes de recuperación equivalentes dentro de cada grupo de fagos. El método de floculación aparece como más sensible porque el porcentaje de positivos tras concentración es mayor que con la filtración.	

La Tabla 4.16 muestra las principales ventajas e inconvenientes que ayudaron a escoger el método que se utilizaría en diferentes laboratorios europeos para concentrar bacteriófagos en aguas de baño.

Tabla 4.16. Comparación de las ventajas e inconvenientes de los métodos de filtración y floculación estudiados.

	VENTAJAS	INCONVENIENTES
FILTRACIÓN	Equipo sencillo	Rango limitado de turbidez y, por tanto, de tamaño de muestra procesada
	Rapidez (tiempo <20 min)	Límite de detección <1 pfp/100 ml (si se titula todo el volumen para un grupo de fagos)
	Fácil procesamiento de varias muestras en paralelo	
	Puede titularse el volumen completo de concentrado (2 ml)	
	Factor de concentración 50	
FLOCULACIÓN	Método fácil y económico	Requiere un tiempo no inferior a una hora
	Válido en un amplio rango de turbidez de las muestras	Problema de homogeneización del concentrado
	Un solo paso de concentración proporciona volumen suficiente para la detección de los tres grupos de fagos (30 ml)	En ocasiones puede plantear dificultad de lectura de las calvas de fagos F-específicos de RNA
	Límite de detección <1 pfp/333 ml (si se titulan 10 placas de concentrado obtenido en un solo paso de concentración)	Para titular todo el volumen se necesitan muchas placas
	Factor de concentración 30	Limitación de muestras que pueden procesarse en paralelo

Los dos métodos de concentración estudiados proporcionaban resultados de recuperación aceptables en muestras naturales, alrededor del 50% para los tres grupos de bacteriófagos. En una reunión del Comité Directivo del proyecto "Bacteriófagos en aguas de baño" conducida en el último trimestre de 1997, se propusieron los métodos de filtración y de floculación. Finalmente se decidió proceder con la floculación debido a: (i) los problemas potenciales de la turbidez y la consiguiente dificultad de filtrar

diferentes muestras en la Unión Europea, como por ej. muestras del Mar del Norte o del Danubio, (ii) porque permite concentrar un volumen mayor de muestra, y por tanto obtenemos una mayor sensibilidad, y (iii) porque es un método barato.

4.4.1.1 Transferencia del método a laboratorios europeos

Después de una encuesta se comprobó que el equipo básico para llevar a cabo la floculación inorgánica estaba disponible en los 17 laboratorios europeos participantes en el proyecto "Bacteriófagos en aguas de baño" (contrato SMT4-CT95-1603), sin contar el nuestro. A finales del 97 se realizó una sesión formativa para los participantes en un laboratorio central (IPL) donde se introdujo la técnica de concentración y la utilización de los métodos para la detección y cuantificación de fagos en muestras naturales. Los resultados de recuperación obtenidos en dicho entrenamiento fueron satisfactorios. El método en sí no causó problemas técnicos.

Los porcentajes de recuperación de colifagos somáticos en agua de río fueron más altos que en agua de mar. A este respecto, nuestros resultados (apartado 4.3.3.3) también presentaron esta tendencia, pero menos acusadamente para colifagos somáticos y de forma estadísticamente significativa para los fagos F-específicos. Sin embargo, en nuestro estudio los fagos de *Bact. fragilis* casi se recuperaron mejor en mar que en río (aunque las diferencias no fueron significativas).

El método fue considerado suficientemente bueno como para proseguir con su utilización en los estudios ecológicos posteriores dentro del mismo proyecto.

4.4.2 INTRODUCCIÓN A LA ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS

El porcentaje de muestras positivas para fagos F-específicos totales y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 fue bajo para aquellas aguas con *E. coli* <100 cfp/100 ml (Tabla 4.11) o con enterococos fecales <33 cfp/100 ml (Tabla 4.12). Nuestras observaciones fueron confirmadas por los datos que obtuvieron en 3 laboratorios europeos (RIVM, IPL y UB) en una monitorización de características similares llevada a cabo en la misma época (Jofre *et al.*, 1999). Queda claro que la concentración de las muestras permite la detección y enumeración de bacteriófagos presentes en las aguas de baño en baja cantidad.

En nuestro estudio durante la campaña 97 analizamos un total de 83 muestras, de las cuales, 57 fueron marinas y 26 fluviales. El análisis de correlaciones bivariadas de todas las variables microbiológicas señalaba relaciones estadísticamente significativas ($P < 0.01$) entre *E. coli* y: EF, CP, SOM, F-TOT, BfHSP; entre EF y: CP, SOM, F-TOT; entre CP y: SOM, F-TOT; entre SOM y: F-TOT, BfHSP; y entre F-TOT y BfHSP.

Considerando dos grupos de muestras, mar por un lado y río por otro, las correlaciones *E. coli* - enterococos fecales y entre *E. coli* y los distintos grupos de fagos fueron más altas en río que en mar. En río, la turbidez se relacionó positivamente con los diferentes parámetros microbiológicos, excepto con fagos de *Bact. fragilis*; en mar no se encontraron estas relaciones.

En el conjunto de muestras (mar y río) que presentaron <33 EF/100 ml ($n=27$), no se encontraron relaciones entre bacterias y bacteriófagos ni entre los diferentes grupos de fagos.

El trabajo realizado en tres laboratorios europeos (RIVM, IPL y UB) durante el verano del 97 mencionado más arriba, confirmaba nuestros datos, destacando las altas correlaciones entre *E. coli* y colifagos somáticos (Jofre *et al.* 1999). Además, nuestros resultados están en concordancia con los trabajos de Cornax *et al.* (1991) que estudiaron muestras marinas con diferentes grados de polución. Calcularon coeficientes de regresión lineales entre diferentes microorganismos y encontraron que en muestras altamente polucionadas, todos los parámetros microbiológicos estaban estrechamente relacionados, con altos coeficientes de correlación. Sin embargo para las muestras con concentraciones de coliformes fecales entre 10^2 - 10^4 en 100 ml, los diferentes coeficientes de regresión obtenidos fueron bajos, siendo los microorganismos que mejor se correlacionaban con los CF, los colifagos somáticos. En muestras con bajos niveles de contaminación, los coliformes fecales sólo se correlacionaron con los coliformes totales. Resultados similares reportan O'Keefe y Green (1989): a niveles de CF >500 /100 ml encuentran fuertes correlaciones entre CF y colifagos, mientras que a niveles de CF <500 /100 ml, la correlación entre colifagos y coliformes se reduce progresivamente a medida que disminuyen los niveles de CF.

Con nuestros datos observamos que, a concentraciones de *E. coli* <10 cfp/100 ml todavía detectábamos colifagos somáticos. De hecho, en el conjunto total de muestras analizadas siempre se detectaron colifagos somáticos, aunque se precisó de una técnica de concentración en el 52.6 % de muestras con *E. coli* <100 cfp/100 ml para poder detectarlos.

De forma parecida Borrego *et al.* (1987), de un total de 476 muestras (marinas, fluviales y de estuario), en ningún momento encontraron coliformes fecales en ausencia de colifagos. Moriñigo *et al.* (1992), en un estudio de la calidad microbiológica de aguas fluviales y marinas del sur de Inglaterra, detectaron colifagos en número más elevado que los coliformes fecales en la mayor parte de muestras que presentaban un nivel moderado de contaminación (≤ 1000 CF/100 ml). Al igual que nosotros, Moriñigo *et al.* (1992) no encontraron muestras con títulos más altos de estreptococos fecales que de coliformes fecales. Este resultado contrasta con los datos obtenidos por Cornax *et al.* (1991), que en aguas marinas poco contaminadas obtuvieron un aumento en el número de muestras en las que los EF (y colifagos) eran más altos que los CF.

Las curvas COR han sido utilizadas en clínica para interpretar las pruebas diagnósticas (Sackett *et al.*, 1992). Maiello *et al.* (1997) aplicaron la curva COR, con los resultados de fagos F-específicos totales medidos en 102 muestras del lago Orta (Italia), como análisis de la asociación entre sensibilidad y especificidad de la presencia de fagos con relación a los valores de contaminación bacteriológica. Tales autores hallaron que el punto de corte obtenido con la curva COR, a partir de la relación entre la concentración de fagos y los indicadores bacterianos fuera de los límites de la ley para el baño, se situaba en 50 pfp/100 ml.

En nuestro análisis de curvas COR, encontramos que a partir de 1-2 pfp/100 ml de fagos F-específicos totales en muestras marinas podía considerarse que la "alteración"

contaminación (tomada como >100 *E. coli*/100 ml ó como >35 EF/100 ml) estaba presente, siendo la sensibilidad de esta prueba de un 70.6% y la especificidad de un 92.9%. Fue la prueba de colifagos somáticos (utilizando como patrón los EF) la más sensible y específica para detectar la “alteración” contaminación, con un punto de corte de 200 pfp/100 ml.

Las curvas COR pueden ofrecer información complementaria de la relación entre bacterias indicadoras y bacteriófagos de bacterias entéricas en aguas de baño, pero en ningún caso deben considerarse determinantes.

4.4.3 VALORACIÓN

Con los datos obtenidos en la campaña 1997 queda claro que no tiene sentido analizar fagos en aguas altamente polucionadas, porque los niveles de coliformes fecales o *Escherichia coli* (>2000 cfp/100 ml) ya indican que no son aptas para el baño y los fagos en este caso no proporcionan información adicional sobre la calidad del agua. Quedaba la opción de elegir para la monitorización del 98-99 playas con una calidad aceptable (*E. coli* 100-2000 cfp/100 ml). Pero es precisamente en las muestras con niveles <100 *E. coli*/100 ml, que catalogamos como aguas recreativas “limpias” según la normativa vigente 76/160/CE, donde nos interesa valorar la “contaminación vírica”. Así, se prefirieron muestras que no presentaran más de 500 *E. coli*/100 ml y que no estuvieran por debajo de 50-100 cfp/100 ml para reducir el riesgo de encontrar sólo valores 0 de bacteriófagos.

Para la campaña del 98 se decide concentrar un volumen de 2 litros. Los informes del año 1997 indicaban que para la obtención de datos positivos de bacteriófagos en aguas aptas para el baño era necesario concentrar la muestra, sobretodo en el análisis de fagos F-específicos y de *Bact. fragilis*. En realidad, si los niveles de coliformes fecales en el agua residual se sitúan en torno a 10^7 partículas formadoras de colonias en 100 ml, se requiere una reducción de 5-6 $\log_{10}$ en la concentración de dichos microorganismos en el agua receptora apta para el baño. Teniendo en cuenta que los niveles en el agua residual de colifagos somáticos, fagos F-específicos de RNA y fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 son aproximadamente de 10^6 , 10^5 y 10^4 pfp/100 ml respectivamente, la disminución de 5-6 $\log_{10}$ significa unas concentraciones en aguas de baño de 10^{1-0} , $10^{0(-1)}$, y $10^{(-1)-(-2)}$ pfp/100 ml para colifagos somáticos, fagos F-RNA y fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 respectivamente. Así, la detección de fagos F-RNA y de *Bact. fragilis* RYC2056 en aguas poco polucionadas requiere el análisis de volúmenes superiores a 100 ml. En el caso de los fagos de *Bact. fragilis* HSP40, cuya concentración en el agua residual oscila entre 10^2 y 10^4 pfp/100 ml, queda justificado el análisis de un litro completo de muestra.

Los trabajos de A. Puig (1998) ponen de manifiesto que la cepa RYC2056 de *Bact. fragilis* recupera de forma consistente recuentos más altos que la cepa HSP40 y también detecta entre 10^1 y 10^3 fagos por ml en agua residual urbana de diferentes áreas geográficas. Los fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 son potenciales candidatos a indicadores de contaminación fecal humana (Puig *et al.*, 1999) por lo que en los análisis conducidos a partir de 1998 introdujimos la utilización de la cepa RYC2056 para la detección de fagos de *Bact. fragilis* en muestras ambientales.

4.5 OBJETIVOS CAMPAÑA 98-99

Con el propósito de determinar la calidad microbiológica de las aguas recreativas y obtener una aproximación del riesgo para la salud de los bañistas debido a la contaminación fecal, se analizaron aguas marinas “limpias” (aptas para el baño). Los objetivos concretos fueron:

- ❑ Obtención y análisis de muestras de aguas recreativas con *E. coli* dentro del rango 100-500 cfp/100 ml.
- ❑ Utilización y valoración de materiales de referencia.
- ❑ Validación de los métodos de detección de bacterias y fagos a través de los controles de calidad.
- ❑ Introducción del análisis rutinario de fagos de *Bact. fragilis* RYC2056.
- ❑ Evaluación del método de concentración.
- ❑ Obtención de datos sobre la presencia de bacteriófagos (colifagos somáticos, fagos F-específicos totales y de RNA, y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y RYC2056) en relación con los indicadores bacterianos (*E. coli* y enterococos fecales), para poder juzgar si ofrecen información adicional o no.
- ❑ Valoración de la estrategia experimental seguida en esta campaña.

En el litoral catalán se contabilizan más de 200 playas marítimas, mientras que las playas fluviales (12 en 1998) representan un porcentaje muy pequeño de las aguas de baño en Cataluña. Este es el motivo principal por el que en esta campaña centramos nuestro interés en las aguas de baño marinas.

PLAN DE TRABAJO 98

⇒ Campaña 98-99

1. Obtención de muestras marinas dentro del rango de *E. coli* 100-500 cfp/100 ml. Muestreos realizados.
2. Control interno de los medios, reactivos y bacterias huéspedes.
3. Control de los materiales de referencia (bacteriófagos ϕ X174, MS2, B40-8 y B56-1 y Lenticulas J conteniendo *E. coli* y enterococos fecales); cartas de control interlaboratorios. Validación de los resultados obtenidos.
4. Detección y cuantificación de bacteriófagos tras concentración por floculación de $Mg(OH)_2$; evaluación de la recuperación a través de los colifagos somáticos. Control del método de concentración.

5. Ecología. El diseño experimental para la monitorización del 98 permite la obtención de importante información en el estudio de la ecología de los bacteriófagos.

→ Análisis de los resultados en dos grupos:

- Muestras con *E. coli* <100 cfp/100 ml
- Muestras con *E. coli* 100-500 cfp/100 ml

Para cada grupo de estudio:

Resultados *E. coli*, EF, SOM, F-TOT, F-RNA, BfHSP y BfRYC.

Relación *E. coli*/SOM

Relación EF/SOM

Relación F-TOT/F-RNA

Relación BfRYC/BfHSP

4.6 MATERIALES Y MÉTODOS 98-99

Condiciones experimentales (julio–octubre 98 y abril-mayo 99)

- Muestreo de aguas de baño en el litoral del Área Metropolitana de Barcelona durante la campaña 1998. En 1999 se recogieron muestras de la costa mallorquina.
 - Selección de muestras marinas con *Escherichia coli* dentro del rango de 100-500 cfp/100 ml (escogidas a partir de lectura presuntiva después de 24h).

NOTA: Las playas de Mallorca fueron muestreadas por M. Boqué (del Laboratorio de Medio Ambiente de la *Conselleria de Medi Ambient, Ordenació del Territori i Litoral, Govern Balear*) quien también realizó los análisis físico-químicos y bacteriológicos de dichas muestras. Nosotros concentramos las muestras mallorquinas para la detección y cuantificación de bacteriófagos.

Estrategia experimental

- **Día 0**
 - Muestreo de las aguas de baño (ISO 5667-2, 1982; ISO 5667-3, 1985).
 - Medida de la salinidad y turbidez de las muestras (APHA, 1995).
 - Enumeración de *E. coli* con las microplacas EC/MU NFT 90-433 (algunas muestras se analizaron por microfiltración e incubación sobre agar m-FC, según APHA 1995).
- **Día 1**
 - Lectura preliminar de *E. coli* del día 0.
 - Aproximación del rango de *E. coli* de las muestras.
 - Selección de la/s muestra/s para someter a análisis de fagos e indicadores bacterianos.
 - Concentración de la muestra de mar seleccionada: floculación por hidróxido de magnesio de 1 litro x2 de muestra con la subsiguiente reducción de volumen a aproximadamente 60 ml (30ml x 2).
 - Análisis de la muestra.
 - En la muestra de playa directa:
 - ✓ *E. coli* (EC) y enterococos fecales (EN) por microplaca (EC/MU NFT 90-433 y EN/MU NFT 90-432), y un volumen inoculado de 9.6 ml de agua de baño (dilución 1/2 en los 96 pocillos de las microplacas). Dos réplicas para EC y EN. En paralelo, un control positivo de Lénticula J.
 - ✓ Colifagos somáticos. Enumeración de acuerdo a ISO/FDIS 10705-2 (1999). Análisis directo de 10.1 ml (10 placas con un mililitro de muestra por placa y una placa con un mililitro de la dilución -1).

- En la muestra concentrada:

- ✓ Colifagos somáticos (ISO/FDIS 10705-2, 1999). Análisis de 2.3 ml (2 placas con un mililitro de concentrado y 3 placas con un mililitro de la dilución -1), equivalente a aproximadamente 75 ml de muestra sin concentrar.
- ✓ Fagos F-específicos totales (ISO 10705-1, 1996). Análisis de 9 ml, equivalente a aproximadamente 300 ml de muestra directa sin concentrar.
- ✓ Fagos F-RNA (ISO 10705-1, 1996). Análisis de 9 ml, equivalente a unos 300 ml directos sin concentrar.
- ✓ Fagos de *Bacteroides fragilis* RYC2056 (ISO/DIS 10705-4, 1999). Análisis de 9 ml, equivalente a unos 300 ml directos sin concentrar.
- ✓ Fagos de *Bact. fragilis* HSP40. Análisis de 30 ml, equivalente a unos 1000 ml directos sin concentrar.

- **Día 2**

- Lectura de la enumeración de *E. coli* del día 0.
- Lectura de la enumeración de bacteriófagos del día 1 y comprobación de los controles negativos y materiales de referencia.
- Evaluación de la eficiencia de concentración. Cálculo de los porcentajes de recuperación del método a partir de los colifagos somáticos en la muestra directa y los colifagos somáticos obtenidos por floculación, teniendo en cuenta el volumen de muestra inicial y el volumen final después de concentrar.

- **Día 3**

- Lectura de la enumeración de *E. coli*, enterococos y Lentícula J del día 1.
- Situación de los valores obtenidos para los materiales de referencia sobre la carta de control correspondiente.

Tabla 4.17. Resumen de las principales diferencias entre las condiciones experimentales de la campaña 1997 y la campaña 98-99 para el análisis de muestras naturales.

	Monitorización 1997	Monitorización 1998
Muestreo	Mar y río, distintos grados de contaminación	Aguas de baño marinas y selección de aquellas que contengan <i>E. coli</i> 100-500 cfp/100 ml
Método de concentración	- Filtración-elución orbital de 100 ml y/o - Floculación por $Mg(OH)_2$ de 1000 ml	Floculación por $Mg(OH)_2$ de 1000 ml x2*
Cuantificación de bacteriófagos en la muestra directa	- Colifagos somáticos - Fagos F-específicos totales - Fagos de <i>Bact. fragilis</i> HSP40	Colifagos somáticos
Cuantificación de bacteriófagos en el concentrado	- Colifagos somáticos - Fagos F-específicos totales - Fagos de <i>Bact. fragilis</i> HSP40 Cálculo del porcentaje de recuperación para los 3 grupos de bacteriófagos.	- Colifagos somáticos - Fagos F-específicos totales - Fagos F-RNA - Fagos de <i>Bact. fragilis</i> HSP40* - Fagos de <i>Bact. fragilis</i> RYC2056 Cálculo del porcentaje de recuperación de colifagos somáticos.

* Diferencias de la campaña de 1999 respecto a la campaña de 1998: concentración de un litro de muestra por floculación inorgánica, en vez de 2 litros, y enumeración de fagos de *Bact. fragilis* sólo con la cepa RYC2056.

4.7 RESULTADOS 98-99

4.7.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DENTRO DEL RANGO DE *E. coli* 100-500 cfp/100 ml

Inicialmente, en el programa europeo para el estudio de las aguas de baño durante la temporada 1998, se había propuesto analizar completamente una única muestra por día, ya que el número de placas establecidas para los controles de calidad y cuantificación de bacteriófagos ascendía a un total de 91 por muestra. Comprobada la dificultad de encontrar muestras dentro del rango *E.coli* 100-500 cfp/100 ml, tanto por hallarse por debajo como por encima de estos límites, decidimos procesar algunas muestras con *E.coli* <100 cfp/100 ml y otras que sobrepasaban las *E. coli* hasta 700 cfp/100 ml. En la Tabla 4.18 relacionamos los muestreos llevados a cabo durante 1998 y 1999.

Tabla 4.18. Muestreos realizados en 1998 y 1999 para la obtención de muestras dentro del rango de *E. coli* 100-500 cfp/100 ml.

Mes	Días de muestreo	Muestras recogidas ^a	Muestras concentradas ^b	Muestras dentro del rango 100-500 ^c
Julio-98	6	15	7	3
Agosto-98	5	14	4	3
Septiembre-98	9	22	4	0
Octubre-98	5	14	5	2
Abril-99	1	4	2	0
Mayo-99	6	26	5	0
TOTAL	32	95	27	8

^aMuestras en las que se realiza el análisis de *E. coli* y parámetros físico-químicos el día 0 (día del muestreo).

^bAnálisis el día 1 de las muestras seleccionadas: parámetros microbiológicos y concentración por $Mg(OH)_2$ para la cuantificación de bacteriófagos.

^cMuestras concentradas que cumplen el criterio *E. coli* 100-500 cfp/100 ml.

4.7.2 CONTROL INTERNO DE LOS MEDIOS, REACTIVOS Y BACTERIAS HUÉSPED

Todos los datos constatados fueron obtenidos con medios, reactivos y bacterias que superaron los controles internos de calidad según los formularios que se presentan en el anexo 4.F. En algún caso en el que se detectaron problemas, los análisis y/o materiales se volvieron a repetir y si esto no fue posible, el dato correspondiente aparece como NT en las hojas de resultados. Destacamos la especial atención prestada en el

trabajo con *Bact. fragilis*, cuyo control fue más riguroso. A diferencia de esta severidad, los parámetros físico-químicos fueron menos precisos.

4.7.3 CONTROL DE CALIDAD INTERLABORATORIOS

Los materiales de referencia utilizados en los análisis de aguas de baño de 1998 fueron facilitados por el “*Water and Environment Department of the Institut Pasteur de Lille*” (IPL) y por el “*Microbiological Laboratory for Health Protection of the RIVM, Bilthoven*” (RIVM). En 1999, los controles de bacterias fecales se realizaron en Palma de Mallorca y por ello no los presentamos aquí. Para las playas mallorquinas, los bacteriófagos fueron analizados en Barcelona y utilizamos controles internos preparados por nosotros mismos.

Los resultados de los materiales de referencia dentro de los límites de la carta de control validan los resultados obtenidos (figuras 4.10 a 4.15).

Control de calidad de los análisis de *E. coli* y enterococos por microplacas (EC/MU NFT 90-433 y EN/MU NFT 90-432). Lentículas “J” PHLS facilitadas por IPL

Condiciones experimentales

- ❑ Análisis EC/MU y EN/MU de una lentícula “J” (sólo el día 1).
- ❑ Disolver una lentícula en 100 ml solución SDM (“muestra estándar”).
- ❑ Dilución 1/2 de la “muestra estándar” en 50 ml SDM.
- ❑ Inoculación de los 96 pocillos de cada una de las microplacas.

Cartas de control de los materiales de referencia (RM) de bacteriófagos facilitados por RIVM

Condiciones experimentales

- ❑ Un vial de material de referencia / fago específico / día de análisis.
- ❑ Dos réplicas por cada vial sobre una bacteria huésped.

• Colifagos somáticos	<i>E. coli</i> WG5	RM del fago ϕ X174 (lote RIVM270597)
• Fagos F-específicos	<i>S. typhimurium</i> WG49	RM del fago MS2 (una réplica sin RNAsa y otra con RNAsa) (lote RIVM220597)
• Fagos de <i>Bact. fragilis</i>	<i>Bact. fragilis</i> HSP40	RM del fago B40-8 (lote RIVM260397)
	<i>Bact. fragilis</i> RYC2056	RM del fago B56-1 (lote RIVM090698)

Figura 4.10. Control de calidad de los análisis EC/MU (NFT 90-433). Lentículas “J” y límites del control facilitados por IPL.

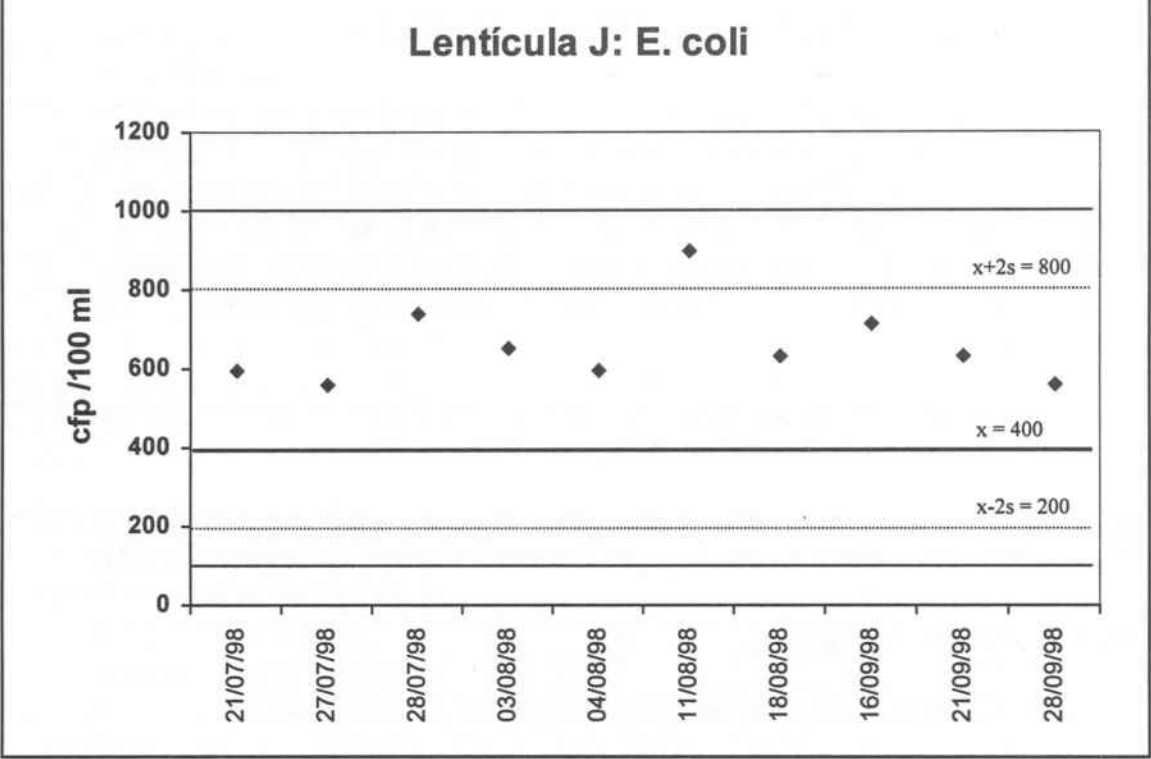


Figura 4.11 Control de calidad de los análisis EN/MU (NFT 90-432). Lentículas “J” y límites del control facilitados por IPL.

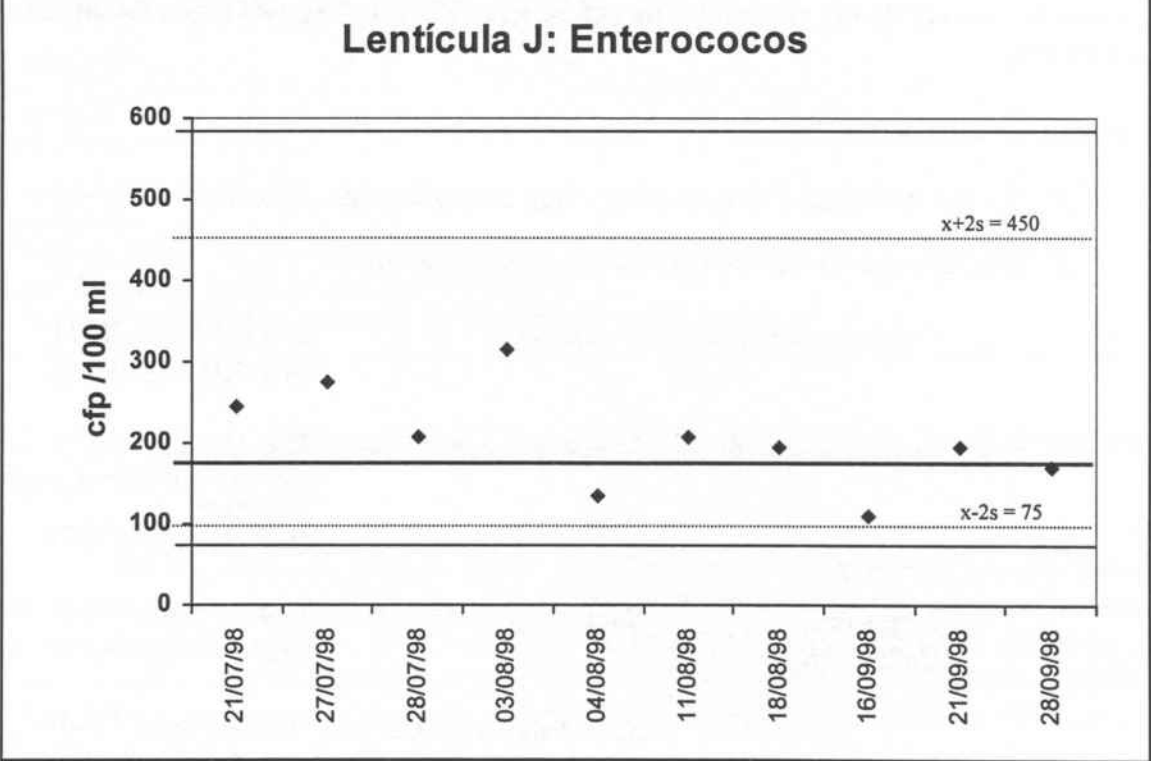


Figura 4.12. Material de referencia ϕ X174 (RIVM270597). Límites del control facilitados por RIVM.

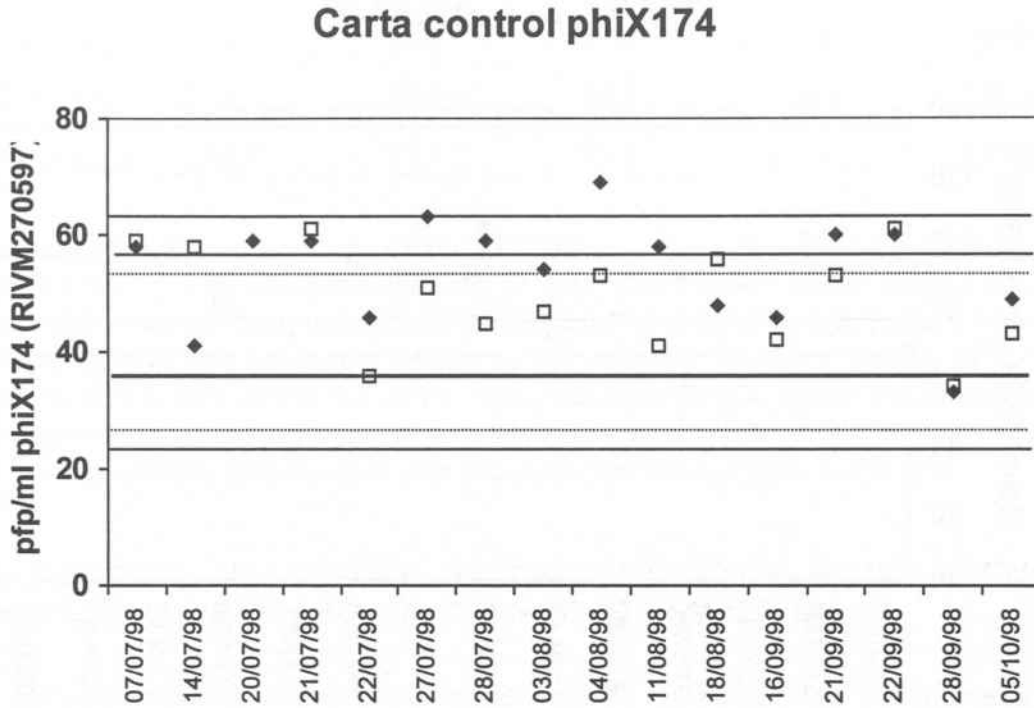


Figura 4.13. Material de referencia MS2 (RIVM220597). Límites del control facilitados por RIVM.

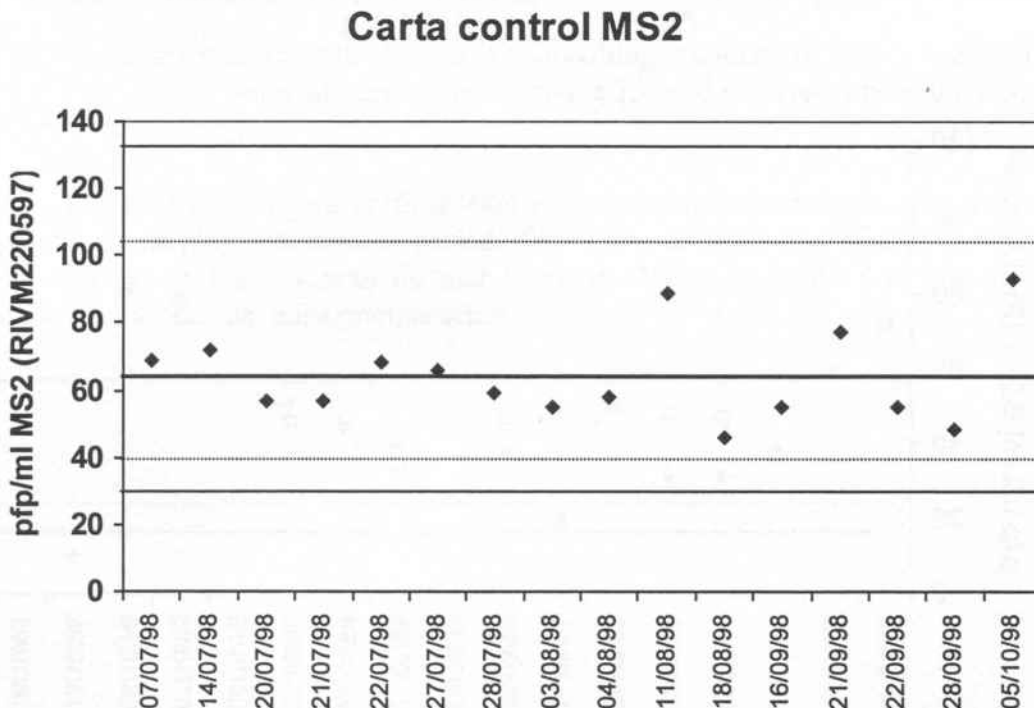


Figura 4.14. Material de referencia B40-8 (RIVM260397). Límites del control facilitados por RIVM.

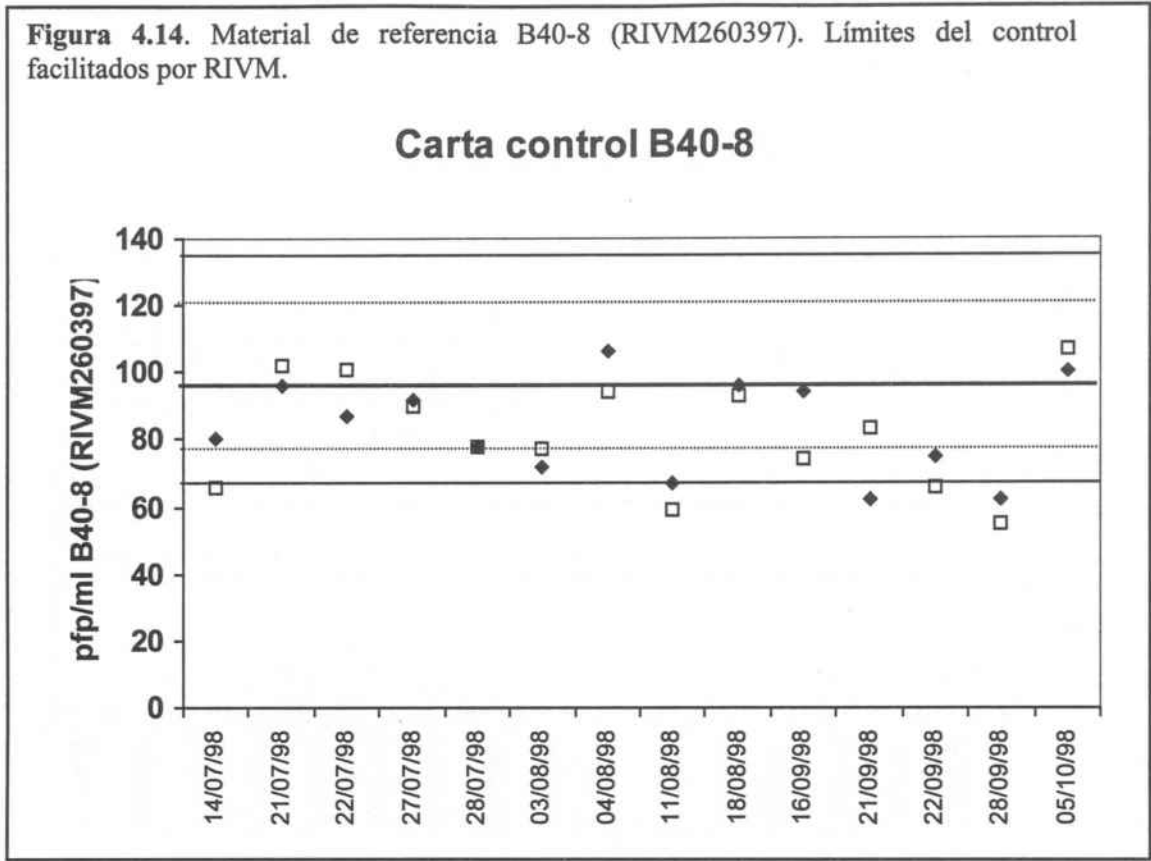
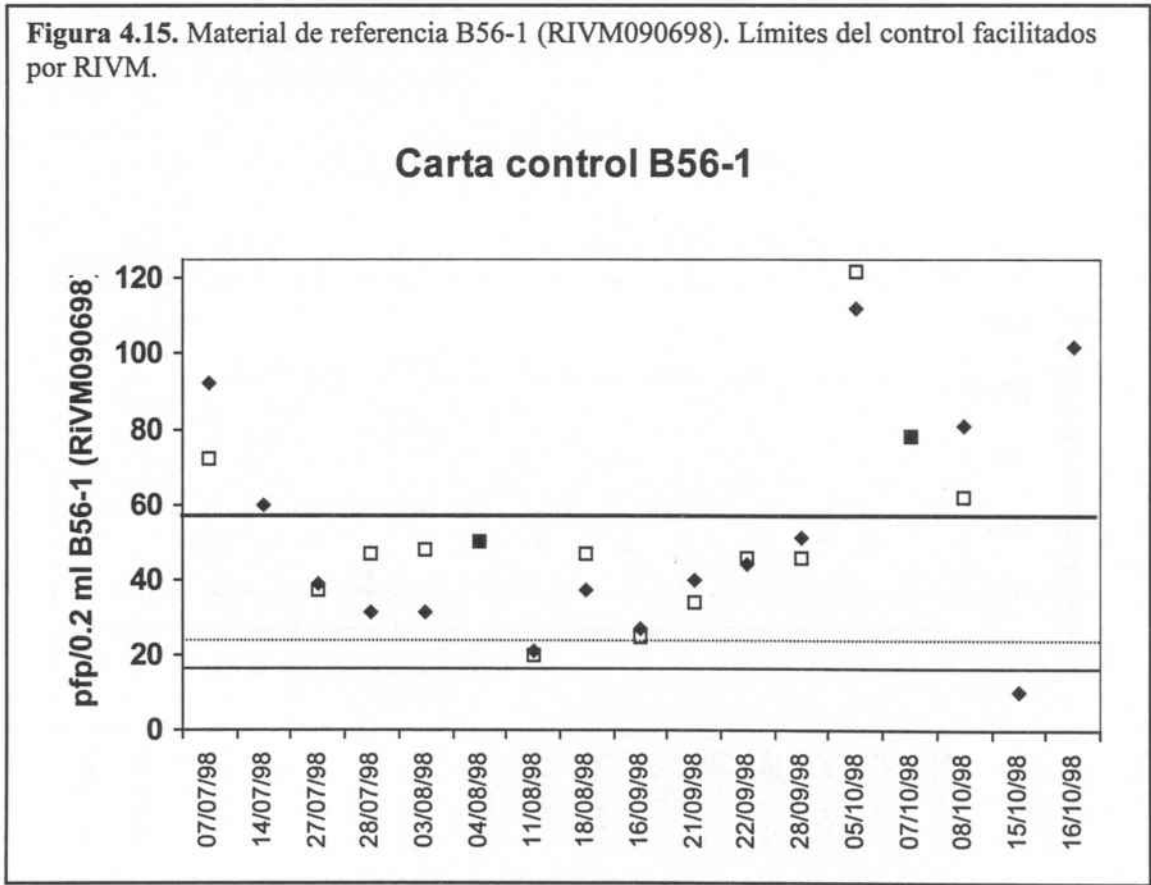


Figura 4.15. Material de referencia B56-1 (RIVM090698). Límites del control facilitados por RIVM.



Los valores (pfp/ml) que se han utilizado para dibujar las cartas de control de los bacteriófagos de referencia son los siguientes:

	x-3s	x-2s	x	x+2s	x+3s
ϕ X174 (270597)	22.2	26.4	37.4	52.8	62.8
MS2 (220597)	31.3	39.8	64.5	104.4	132.9
B40-8 (260397)	69.9	78.1	97.3	121.2	135.3

Hubo un problema con el material de referencia que contenía el fago B56-1. Los viales enviados por RIVM contenían más de 300 pfp/ml con el inconveniente añadido que se habían seleccionado unas calvas de tamaño muy pequeño (aproximadamente 0.1 ml de diámetro). Los miembros dirigentes del proyecto europeo (RIVM, IPL, UB) decidieron que se analizarían 0.2 ml por vial. Aún así hubo problemas con la lectura de las calvas de B56-1. Posteriores estudios en la UB conducirían a la elección del fago B56-3 como material de referencia para el trabajo con *Bact. fragilis* RYC2056.

4.7.4 CONTROL DEL MÉTODO DE CONCENTRACIÓN. EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN PARA LOS COLIFAGOS SOMÁTICOS

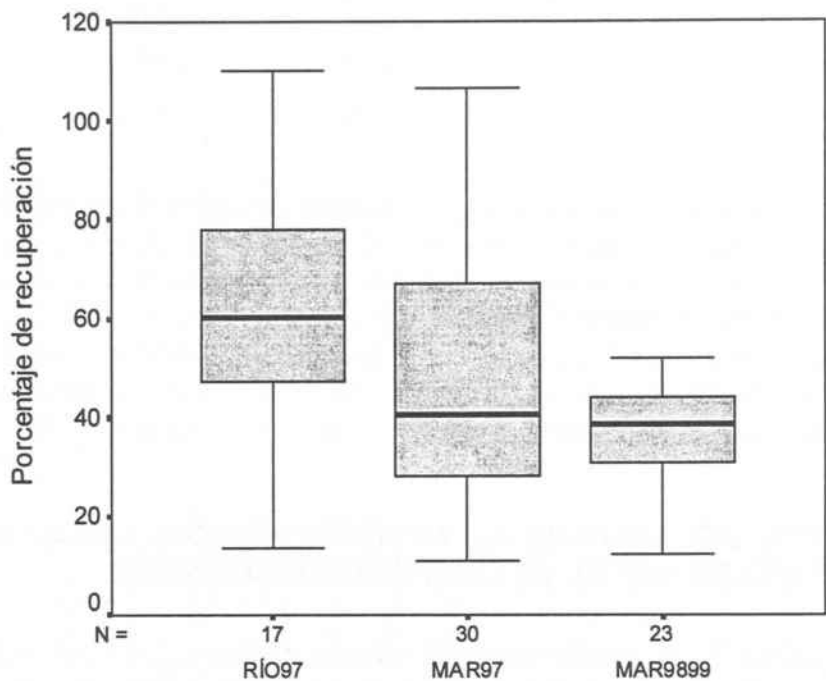
La evaluación de la recuperación del método de floculación por hidróxido de magnesio se ha realizado a través de la concentración de los colifagos somáticos.

Condiciones experimentales

- En la muestra bruta, directa: análisis de colifagos somáticos 10.1 ml
- Concentración 2x 1 litro de muestra, en un volumen final próximo a 60 ml
- En la muestra concentrada, análisis de colifagos somáticos 2.3 ml
(equivale aproximadamente a 75 ml de muestra bruta, directa)

La Figura 4.16 compara gráficamente los porcentajes de recuperación obtenidos en los análisis de playas durante el período 98-99 con relación a la eficiencia obtenida por floculación en las muestras de mar y río de 1997; la Tabla 4.19 muestra los resultados numéricos de dicha comparación.

Figura 4.16. Comparación de los porcentajes de recuperación de colifagos somáticos obtenidos por concentración de hidróxido de magnesio en las muestras de mar de la temporada 98-99 con relación a la recuperación obtenida en las muestras de mar y río de 1997.



	n	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
RÍO97	17	13.6	142.3	66.0	34.4
MAR97	30	11.0	171.3	52.9	39.1
MAR9899	23	12.3	118.3	39.2	20.5

Tabla 4.19. Comparación de las eficiencias de floculación de colifagos somáticos obtenidas en muestras marinas y fluviales durante la temporada 97 y a partir de muestras de mar durante el período 98-99.

Análisis: comparación de medias y tablas ANOVA de un factor.

Objetivo: detectar diferencias en los porcentajes de recuperación de colifagos somáticos

RÍO 97 (n= 17)	$F= 3.295, P= 0.043$ Diferencias significativas
MAR 97 (n= 30)	
MAR 98-99 (n= 23)	
MAR 97	No diferencias
MAR 98-99	
MAR 97	No diferencias
RÍO 97	
RÍO 97	$F= 9.478, P= 0.004$ Diferencias significativas
MAR 98-99	

4.7.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LAS AGUAS DE BAÑO MONITORIZADAS EN EL PERÍODO 98-99.

Los resultados se han dividido en dos grupos para su análisis, según el criterio utilizado para la selección de las muestras:

1. Muestras con niveles de *E. coli* dentro del rango 100-700 cfp/100 ml, $n=10$

De las 10 muestras contempladas en este grupo,

6 dentro del rango 100-500 *E. coli* cfp/100 ml
 3 dentro del rango 500-700 *E. coli* cfp/100 ml
 1 valor medio *E. coli* 732 cfp/100 ml

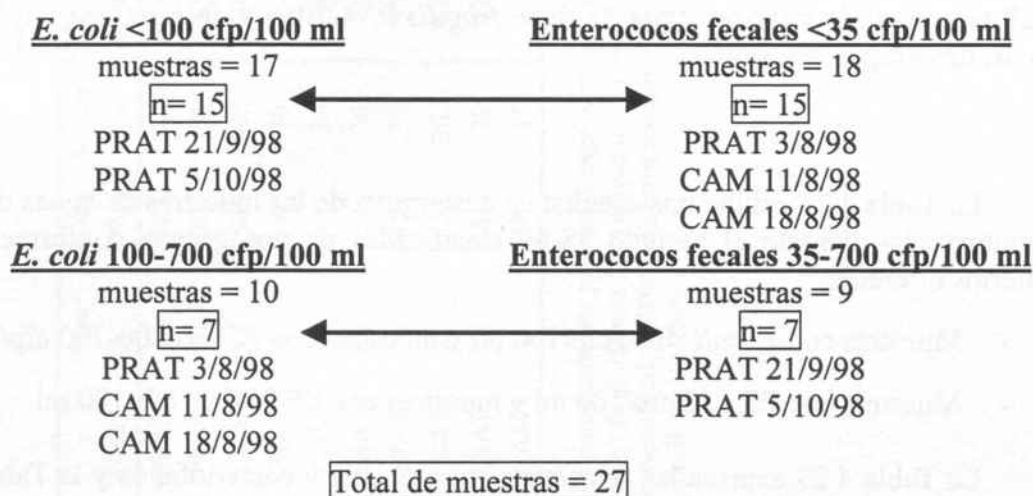
2. Muestras con niveles de *E. coli* <100 cfp/100 ml, $n=17$

De las 17 muestras incluidas en el grupo,

8 por debajo del límite de detección
 9 dentro del rango 1-99 cfp/100 ml

Para esta clasificación se ha tenido en cuenta el valor medio de *E. coli* calculado a partir de las dos réplicas del día 1; excepciones: 6 muestras para las cuales se ha tomado el valor de la única réplica del día 1 disponible, una muestra (PRAT 28/9/98) para la que se considera el dato del día 0 por no estar disponibles el resto de datos. Los detalles del diseño experimental se especificaron en el apartado de materiales y métodos de este capítulo.

La división de las muestras en dos grupos atendiendo al criterio de enterococos o estreptococos fecales según la EPA (1986) variaría muy poco respecto a la que hemos escogido para el análisis de los resultados. Las diferencias en la distribución de muestras, según se atienda al criterio de *E. coli* (según valor guía de la Directiva 76/160/CEE) o al criterio de enterococos fecales se señalan seguidamente:



Algunas consideraciones sobre los datos

- En los análisis estadísticos que incluyen bacterias fecales se ha utilizado la media de las réplicas del día 1, salvo las excepciones comentadas en el primer punto de este apartado respecto a *E. coli*; en el caso de los enterococos, para 6 muestras sólo se constata el valor de una réplica en la tabla de resultados y éste valor es el que se ha considerado para dichos análisis y representaciones.
- Cuando los datos se transforman en logaritmo para su representación y análisis, los valores <10 se han sustituido por 1 antes del cálculo.
- Si no se especifica lo contrario, los datos de colifagos somáticos utilizados en las representaciones y cálculos son los obtenidos por análisis directo de la muestra y no por cuantificación en el concentrado.
- Los valores de fagos F-específicos (totales y de RNA) y de *Bact. fragilis* (de las cepas RYC2056 y HSP40) utilizados en el análisis de los datos representan las partículas formadoras de calvas (pfp) en 100 ml de muestra directa y se han calculado a partir de las calvas por mililitro obtenidas en el concentrado.

Muestras con *E. coli* dentro del rango 100-700 cfp/100 ml

En la Tabla 4.20 se relacionan los datos resumidos para el grupo de muestras dentro del rango de *E. coli* 100-700 cfp/100 ml. A continuación de dicha tabla se muestran las figuras 4.17 a 4.22 que representan gráficamente los resultados obtenidos para *E. coli*, enterococos, colifagos somáticos, relación *E. coli*/colifagos somáticos, relación enterococos/colifagos somáticos y fagos F-específicos y de *Bact. fragilis*.

Muestras con *E. coli* <100 cfp/100 ml

La Tabla 4.21 presenta los resultados resumidos para aquellas muestras cuyos niveles medios de *E. coli* se manifestaron inferiores a 100 cfp/100 ml. Las figuras 4.23 a 4.28 exponen gráficamente los resultados obtenidos para *E. coli*, enterococos, colifagos somáticos, relación *E. coli*/colifagos somáticos, relación enterococos/colifagos somáticos y fagos F-específicos y de *Bact. fragilis* en este grupo de muestras. La Figura 4.29 representa la relación fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 y de *Bact. fragilis* HSP40 en los dos grupos de estudio.

La Tabla 4.22 exhibe una estadística descriptiva de las muestras de aguas de baño monitorizadas durante el período 98-99 clasificadas en dos grupos conforme a dos criterios diferentes:

- Muestras con *E. coli* <100 cfp/100 ml y muestras con *E. coli* 100-700 cfp/100ml
- Muestras con EF <35 cfp/100 ml y muestras con EF 35-700 cfp/100 ml

La Tabla 4.23 expresa las relaciones entre *E. coli* y bacteriófagos y la Tabla 4.24 presenta las relaciones entre enterococos y bacteriófagos.

Tabla 4.20. Monitorización de aguas de baño marinas (98-99). Muestras con *Escherichia coli* en el rango 100-700 cfp/100 ml

FECHA	PLAYA	Tªire °C	Turbidez NTU	Salinidad ‰	← 10 ml →		75 ml ←		300 ml →		1 litro					
					<i>E. coli</i> media cfp/100ml	EF media cfp/100ml	SOM directo pfp/100ml	Concentración		SOM concentrado pfp/100ml	F-específicos			de <i>Bact. fragilis</i>		
								V cº ml	Recuperación %		F-TOT pfp/100ml	F-DNA pfp/100ml	F-RNA pfp/100ml	%F-RNA/ F-TOT	RYC2056 pfp/100ml	HSP40 pfp/100ml
7/10	PRAT	16	NT	24.5	105	37	1772.0	72	24.8	439.8	2.4	2.8	0.0	0.0	10.0	2.5
14/7	PRAT	24	9.21	36	123	82	2911.0	63	43.6	813.5	29.1	27.0	2.1	7.2	18.9	5.6
18/8	CAM	27	0.98	33.5	170	<10	1000.0	63	38.5	389	7.0	7.4	0.0	0.0	1.8	NT
3/8	PRAT	26	11.6	36	317	32	683.2	67	36.7	246.2	5.6	5.2	0.4	7.1	0.7	1.2
11/8	CAM	28	4.31	20	408	11	1901.0	64	36.6	695.7	56.0	35.9	20.1	35.9	6.4	0.3
21/7	PRAT	26	4.56	36	486	374	3520.0	65	39.7	1396.5	54.6	61.8	0.0	0.0	27.8	10.7
22/9	PRAT	22	3.79	35	595	183	2782.2	63	49.4	1375.6	11.9	17.2	0.0	0.0	12.6	3.7
28/9	PRAT	21	3.15	36.5	632	683	4732.7	66	52.1	2464.1	27.5	40.0	0.0	0.0	14.7	7.3
20/7	PRAT	25	3.8	36	672	330	5160.0	63	37.6	1942.5	39.9	46.2	0.0	0.0	52.4	15.0
4/8	CAM	26	0.58	37	736	82	752.5	62	31.0	235.9	11.0	9.3	1.7	15.5	1.7	0.5

NT: Test no constatado por problemas experimentales o por diseño experimental.

V cº: Volumen final después de la concentración por floculación de hidróxido de magnesio.

EF: enterococos fecales; SOM: colifagos somáticos; F-TOT: fagos F-específicos totales; F-DNA: fagos que infectan a *S. typhimurium* WG49 en presencia de RNAsa; F-RNA: fagos F-específicos de RNA.

Figura 4.17. Monitorización 98-99. Resultados de *Escherichia coli* en las muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml *E.coli*.

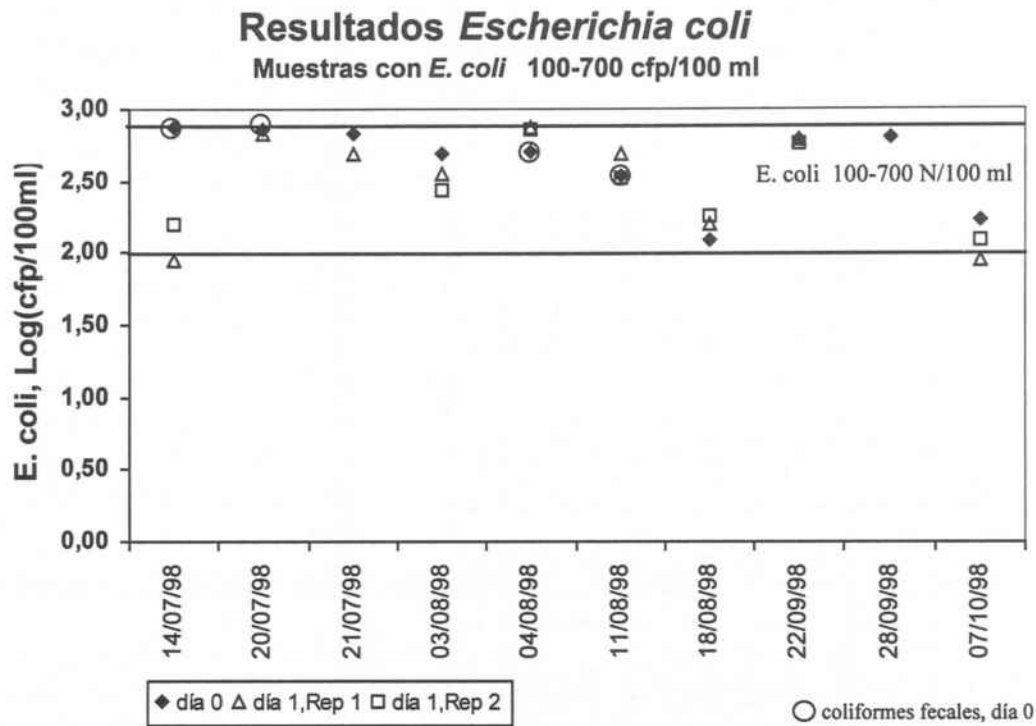


Figura 4.18. Monitorización 98-99. Resultados de enterococos en las muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml *E.coli*.

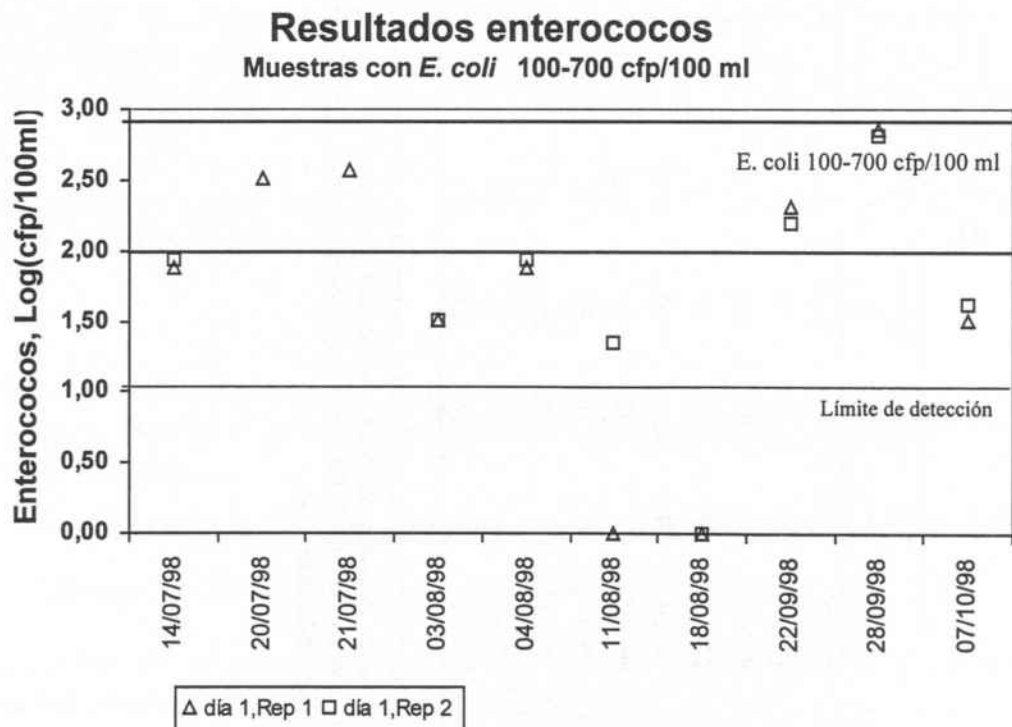


Figura 4.19. Monitorización 98-99. Resultados de colifagos somáticos en las muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml *E.coli*.

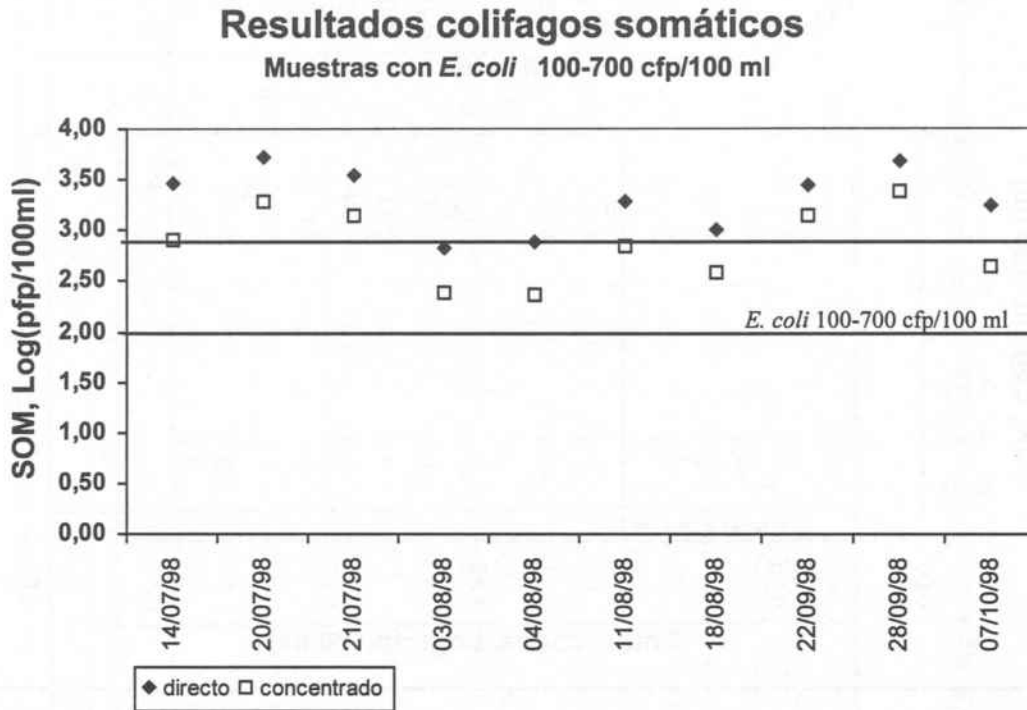


Figura 4.20. Monitorización 98-99. Relación *E. coli*/colifagos somáticos en las muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml *E.coli*.

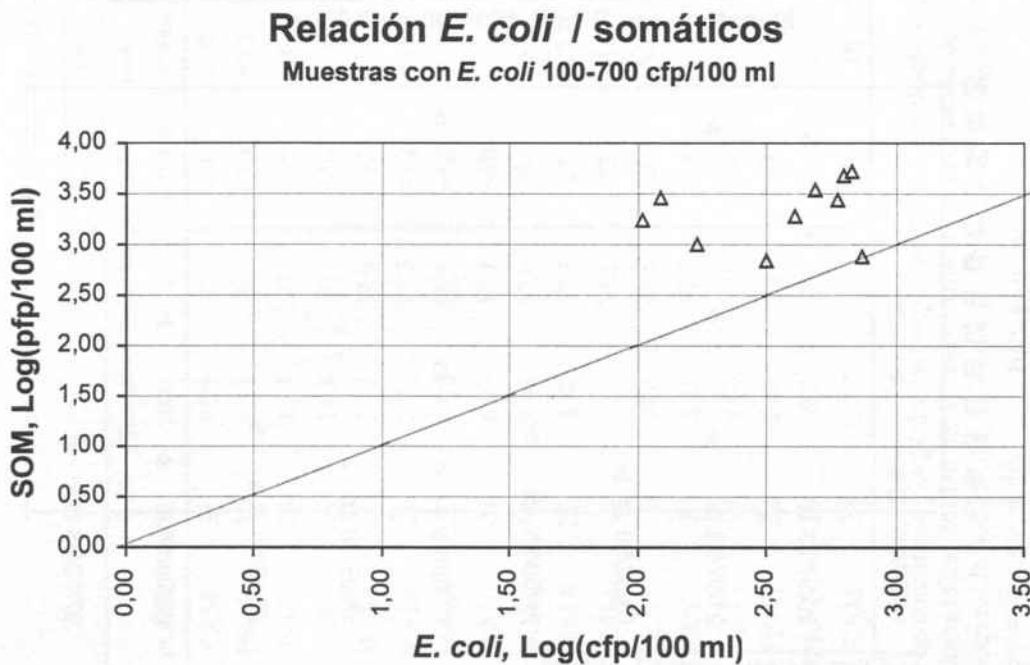


Figura 4.21. Monitorización 98-99. Relación enterococos/colifagos somáticos en las muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml *E.coli*.

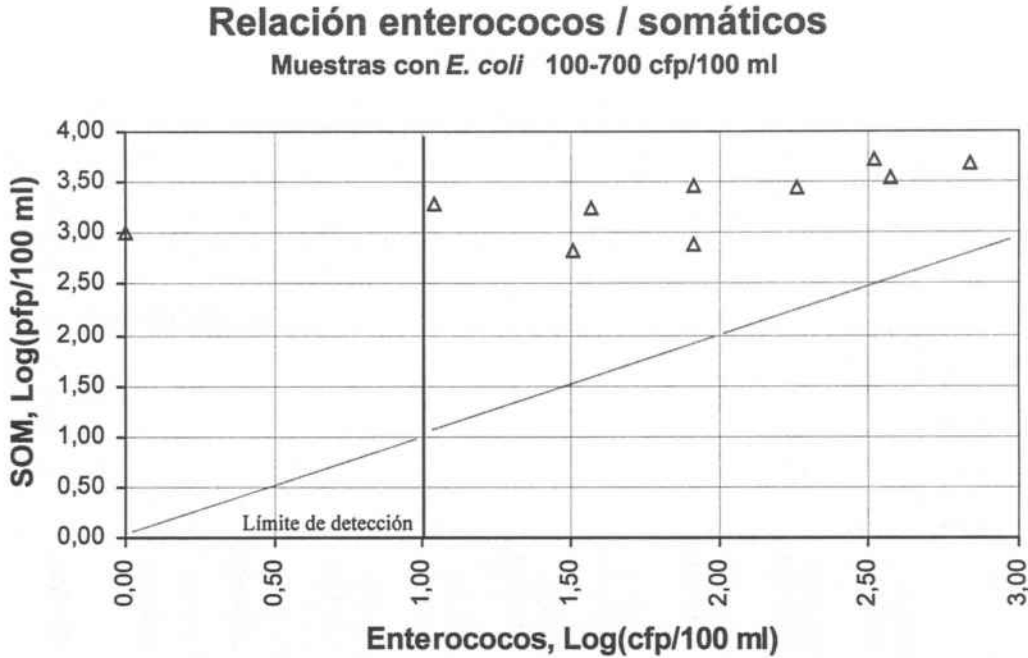


Figura 4.22. Monitorización 98-99. Resultados de bacteriófagos F-específicos y de *Bact. fragilis* en las muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml *E.coli*.

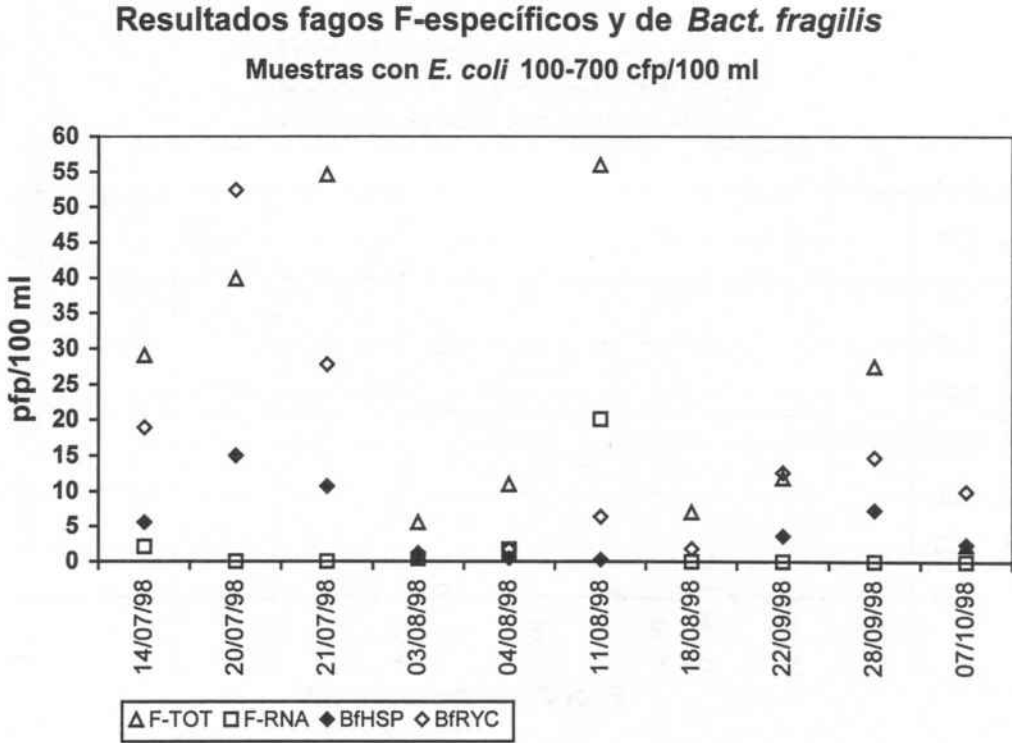


Tabla 4.21. Monitorización de aguas de baño marinas (98-99). Muestras con *Escherichia coli* <100 cfu/100 ml

				← 10 ml →		75 ml		300 ml				1 litro			
		E. coli		SOM		Concentración		SOM		F-específicos				de Bact. fragilis	
		media	EF	directo	V c°	Recuperación	concentrado	F-TOT	F-DNA	F-RNA	%F-RNA/	F-TOT	RYC2056	HSP40	
FECHA	PLAYA	cfp/100ml	cfp/100ml	pfp/100ml	ml	%	pfp/100ml	pfp/100ml	pfp/100ml	pfp/100ml			pfp/100ml	pfp/100ml	
21/7	CAM	<10	<10	663.4	65	47.3	284.9	11.2	10.7	0.5	4.5	10.8	4.2		
27/7	PRAT	<10	<10	9.9	65	14.3	1.41	<0.36	<0.36	<0.36	-	<0.36	<0.1		
28/7	BAR	<10	10	108.9	68	42.1	45.8	0.8	0.4	0.4	50.0	0.4	0.2		
15/10	PRAT	<10	<10	277.2	68	12.3	34	0.4	1.1	0.0	0.0	0.8	0.1		
3/5	MAL3	<10	5	<10	34	-	<1.1	<0.38	<0.38	<0.38	-	<0.38	NT		
3/5	MAL4	<10	<10	<10	33	-	1.1	<0.37	<0.37	<0.37	-	<0.37	NT		
11/5	MAL5	<10	<10	<10	34	-	2.27	<0.38	<0.38	<0.38	-	<0.38	NT		
18/5	MAL7	<10	10	10	32	42.7	4.27	<0.36	0.36	0	0	<0.36	NT		
26/4	MAL2	5	5	40	33	28.7	11.48	3.3	<0.37	3.3	100	0.73	NT		
18/5	MAL6	21	10	<10	33	-	<1.1	<0.37	<0.37	<0.37	-	<0.37	NT		
15/10	CAM	22	<10	950.5	68	13.2	125.7	1.9	<0.38	1.9	100.0	0.4	<0.1		
5/10	PRAT	26	55	1049.0	60	33.0	347	5.7	5.3	0.4	7.0	13.7	2.6		
16/9	PRAT	43	<10	742.6	62	44.1	327.5	31.0	NT	NT	NT	3.1	0.6		
26/4	MAL1	53	32	10	34	118.3	11.83	<0.38	<0.38	<0.38	-	0.38	NT		
21/9	PRAT	59	111	2623.8	63	40.4	1060.7	7.0	11.1	0.0	0.0	16.1	6.8		
7/10	PRAT1	65	27	1931.0	67	30.8	594.3	3.7	3.0	0.7	18.9	12.3	2.7		
7/7	CAM	88	10	2029.7	60	44.8	854.5	118.7	149.3	0.0	0.0	10.0	NT		

NT: Test no constatado por problemas experimentales o por diseño experimental.

V c°: Volumen final después de la concentración por floculación de hidróxido de magnesio.

EF: enterococos fecales; SOM: colifagos somáticos; F-TOT: fagos F-específicos totales; F-DNA: fagos que infectan a *S. typhimurium* WG49 en presencia de RNAsa; F-RNA: fagos F-específicos de RNA.

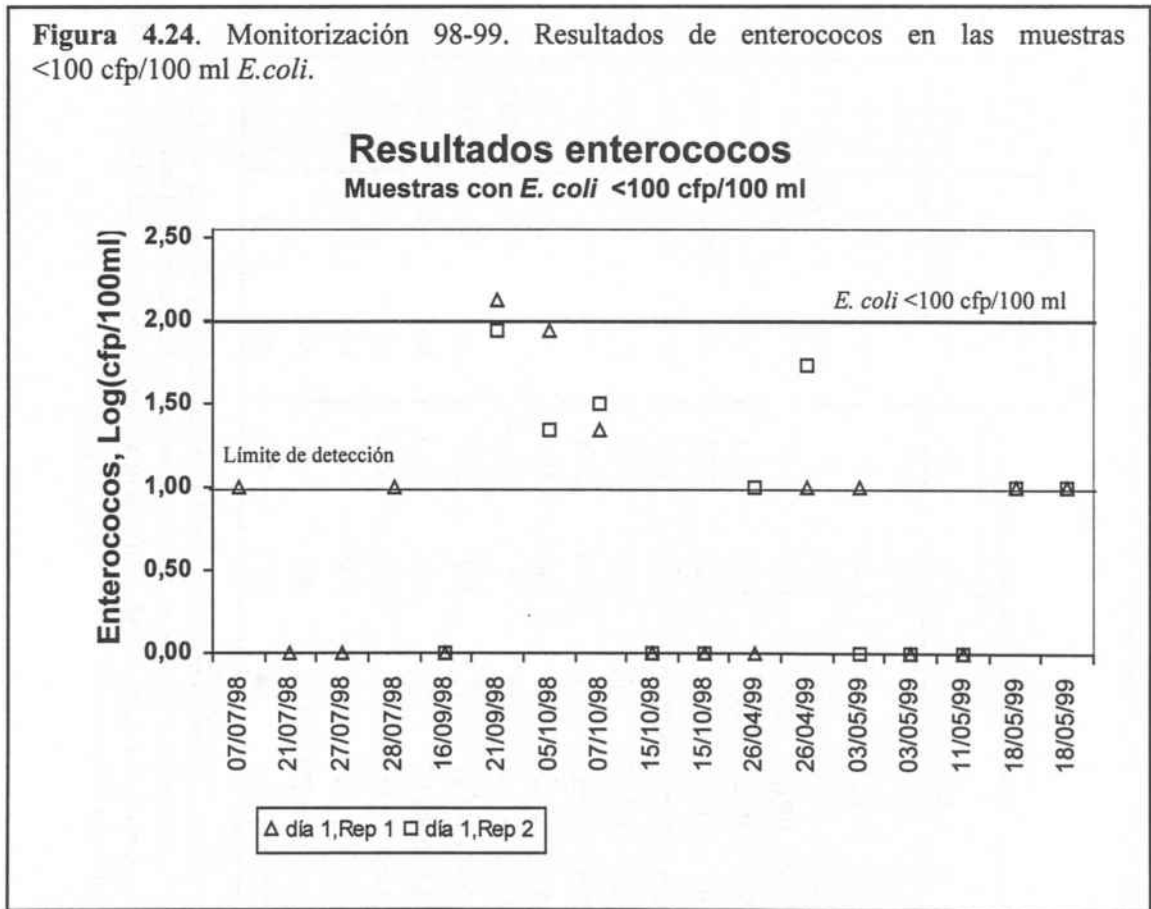
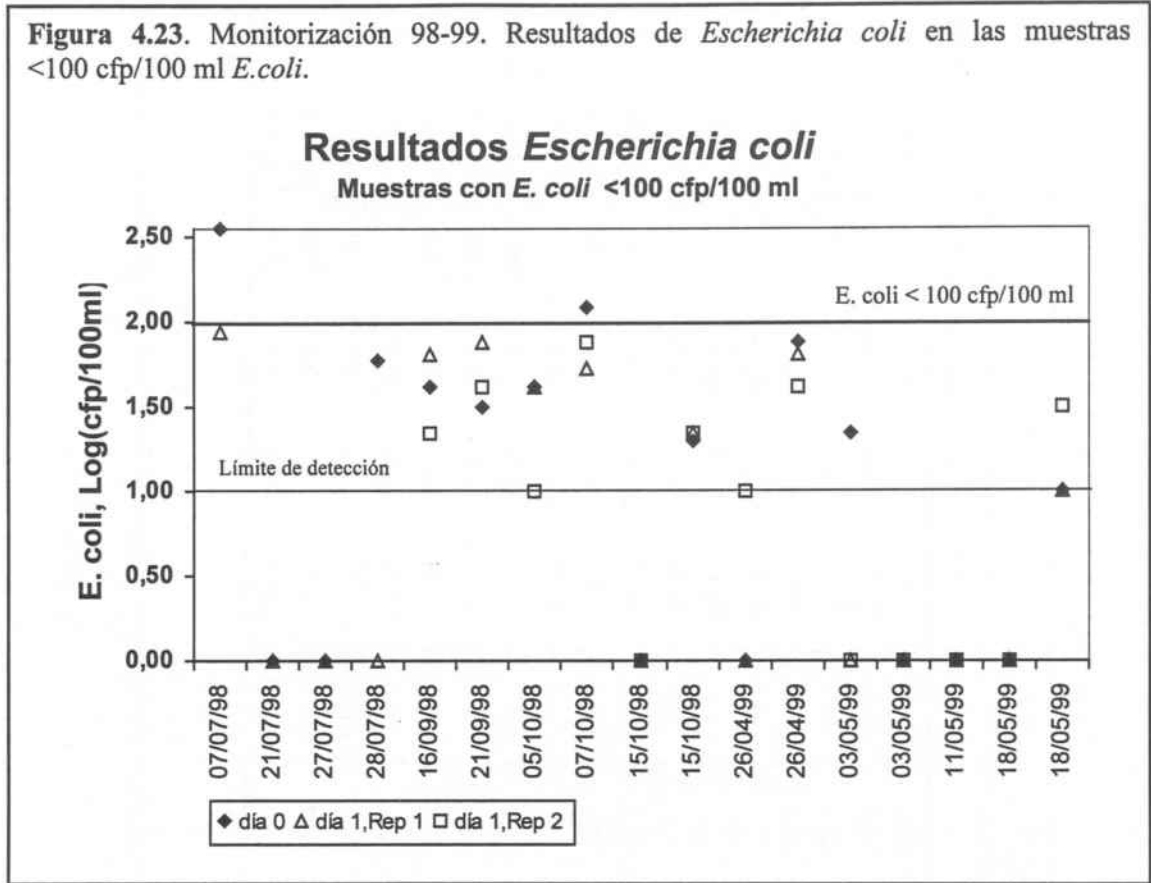


Figura 4.25. Monitorización 98-99. Resultados de colifagos somáticos en las muestras <100 cfp/100 ml *E.coli*.

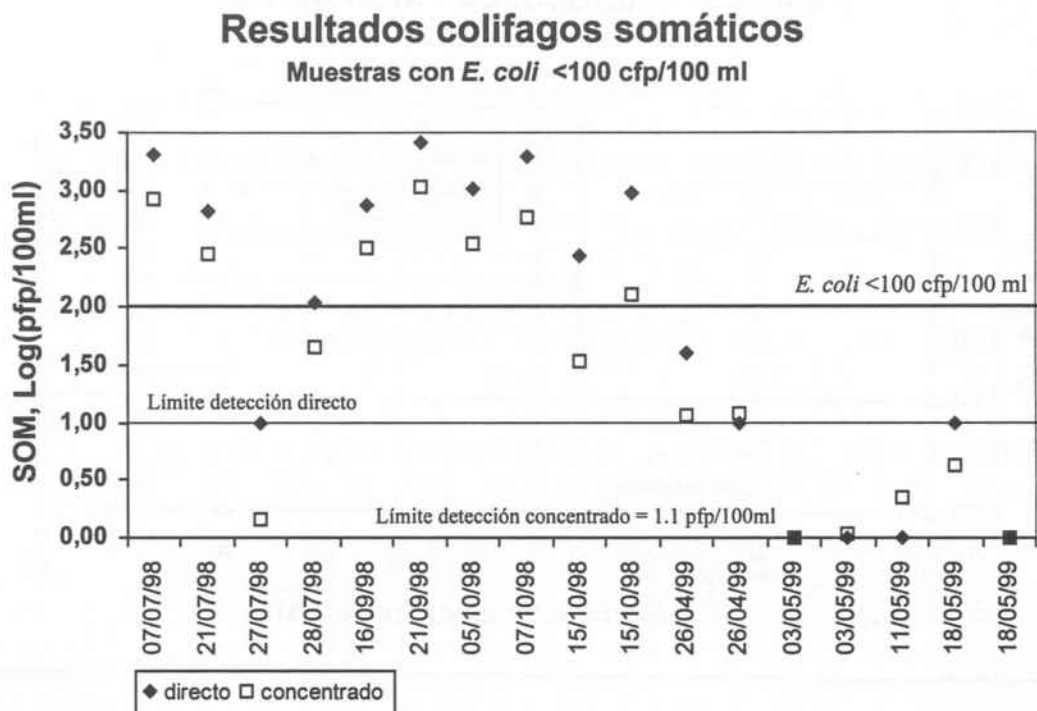


Figura 4.26. Monitorización 98-99. Relación *E. coli*/colifagos somáticos en las muestras <100 cfp/100 ml *E.coli*.

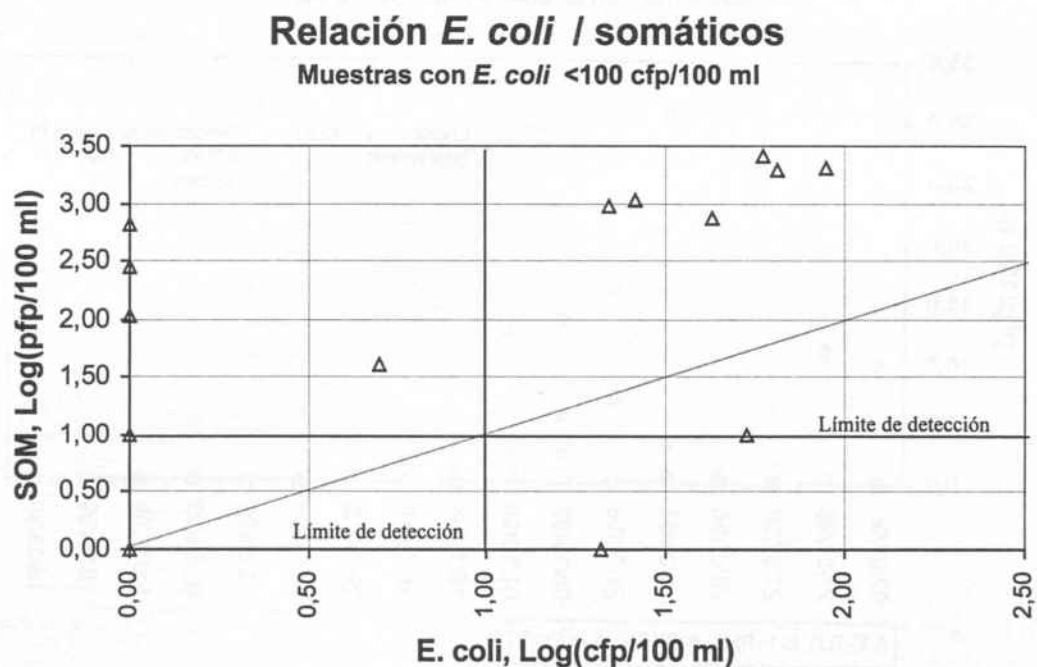


Figura 4.27. Monitorización 98-99. Relación enterococos/colifagos somáticos en las muestras <100 cfp/100 ml *E.coli*.

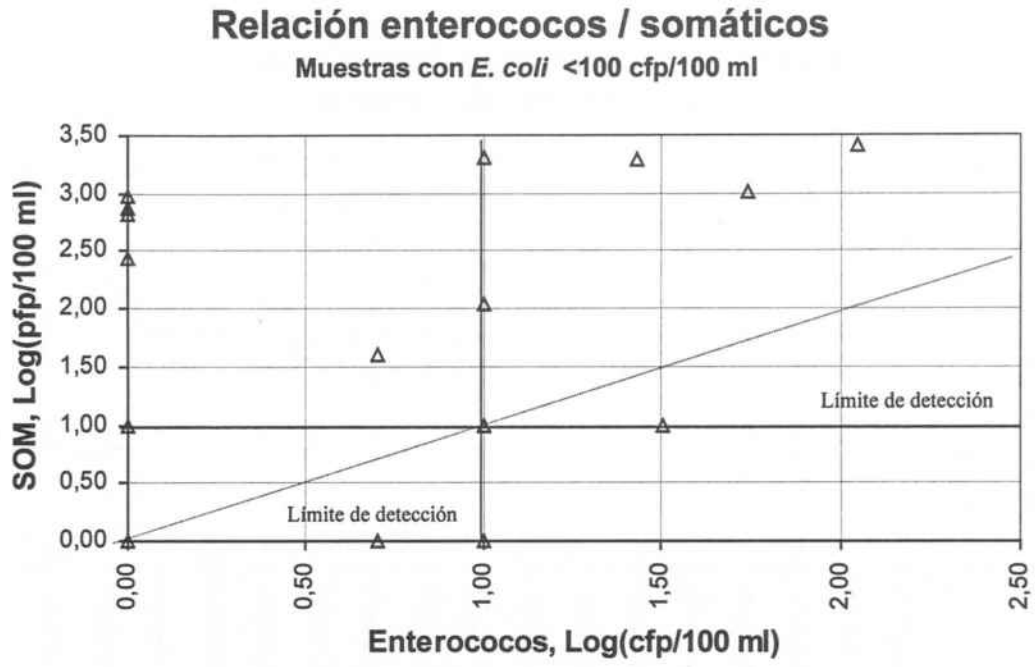


Figura 4.28. Monitorización 98-99. Resultados de bacteriófagos F-específicos y de *Bact. fragilis* en las muestras <100cfp/100 ml *E.coli*.

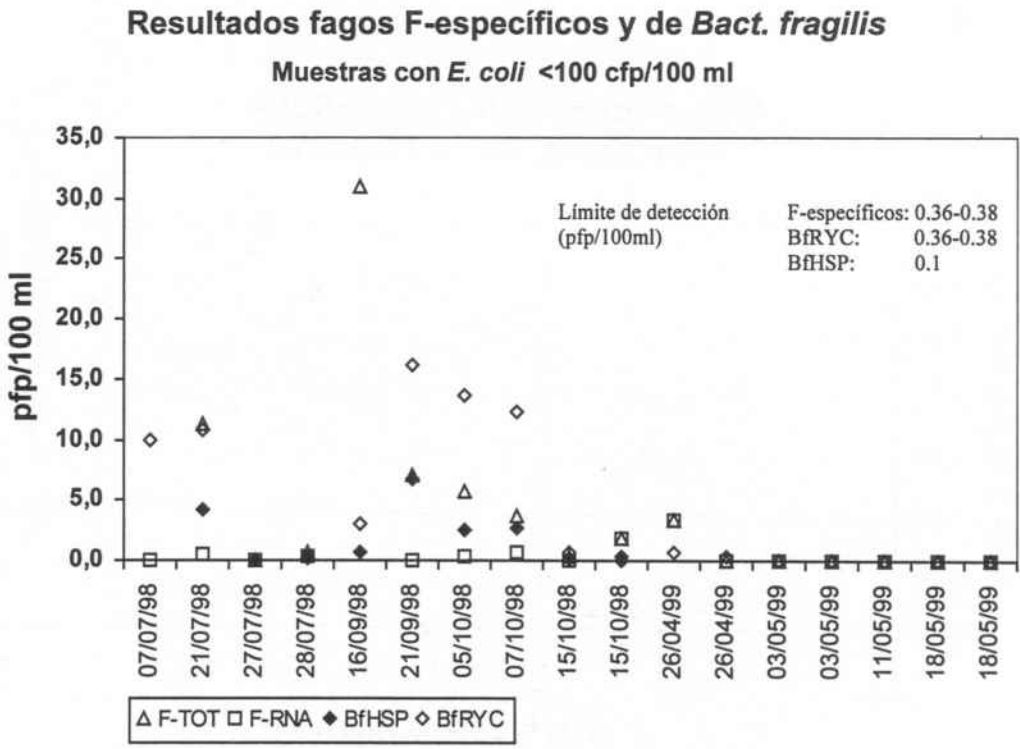


Figura 4.22. Monitorización 98-99. Relación entre *Bact. fragilis* RYC2056 y *Bact. fragilis* HSP40.

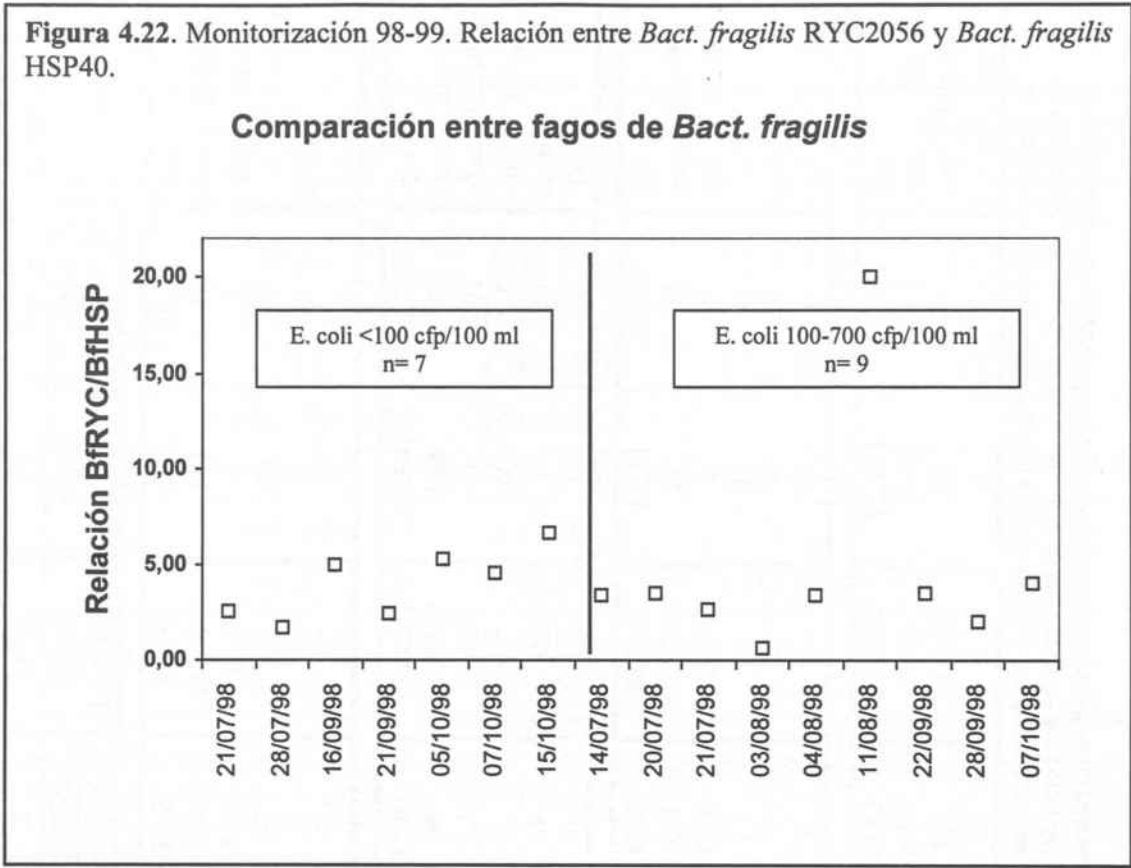


Tabla 4.22. Estadística descriptiva de la monitorización de aguas de baño marinas durante el período 98-99.

(27 muestras)		<i>E. coli</i>		EF	media	SOM	F-específicos			de <i>Bact. fragilis</i>		relación
		media				directo	F-TOT	F-RNA	%F-RNA/ F-TOT*	HSP40	RYC2056	BRYC/BHSP*
cfp/100 ml		N/100ml		N/100ml		pfp/100ml	pfp/100ml	pfp/100ml		pfp/100ml	pfp/100ml	
<i>E. coli</i> <100 η=17	mg max	32,98	88	16,29	111	233,22	5,05	0,00	28,04	1,18	2,53	4,01
	min	5	5	5	5	2623,76	118,67	3,30	100,00	6,80	16,10	6,67
	n	9	9	10	5	9,90	0,38	0,00	0,00	0,11	0,38	1,67
	n<ld	8	8	7	10	13	10	10	10	7	11	7
	NT	0	0	0	0	0	0	6	6	2	6	7
								1	1	8	0	3
<i>E. coli</i> 100-700 η=10	mg max	347,49	736	103,40	683	2032,91	16,14	0,00	6,57	2,84	7,70	3,19
	min	105	105	11	11	5160,00	56	20,09	35,9	15	52,4	20
	n	10	10	9	9	683,17	2,4	0,00	0	0,32	0,74	0,61
	n<ld	0	0	1	9	10	10	10	10	9	10	9
	NT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
										1	0	1
EF<33 η=18	mg max	60,55	408	12,25	32	245,26	6,28	0,00	28,76	0,67	1,78	5,99
	min	5	5	5	5	2029,70	118,67	20,09	100,00	4,23	12,30	20,00
	n	10	10	10	10	9,90	0,38	0,00	0,00	0,10	0,38	0,61
	n<ld	8	8	8	10	14	11	11	11	7	12	7
	NT	0	0	0	0	0	0	6	6	2	6	7
								1	1	9	0	4
EF 33-700 η=9	mg max	229,85	736	141,97	683	2391,10	14,09	0,00	3,29	4,34	13,90	3,32
	min	26	26	37	37	5160	54,6	2,10	15,45	15,00	52,40	5,27
	n	9	9	9	9	752,48	2,4	0,00	0,00	0,52	1,72	2,02
										9	9	9

η : número de muestras que cumplen el requisito; mg: media geométrica; max: valor máximo; min: valor mínimo; n: número de datos utilizados para calcular la media; n<ld: número de muestras por debajo del límite de detección del método; NT: número de datos no disponibles.
*Para las relaciones FRNA/FTOT y BfRYC2056/BfHSP40 se ha calculado la media aritmética y no la media geométrica.

Tabla 4.23. Relaciones entre *E. coli* y bacteriófagos.

	grupo <i>E. coli</i> ^a	n	[fagos]<< <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> /fagos > 2	[fagos]= <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> /fagos = 0.5-2	[fagos]>> <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> /fagos < 0.5
SOM	100-700	10	-	1 ^b (10%)	9 (90%)
	<100	14	2 (14.3%)	2 (14.3%)	10 (71.4%)
F-TOT	100-700	10	10 (100%)	-	-
	<100	9	6 (66.7%)	2 (22.2%)	1 (11.1%)
F-RNA	100-700	10	10 (100%)	-	-
	<100	8	7 (87.5%)	1 (12.5%)	-
BfRYC	100-700	10	10 (100%)	-	-
	<100	9	8 (88.9%)	1 (11.1%)	-
BfHSP	100-700	10	10 (100%)	-	-
	<100	5	5 (100%)	-	-

^amuestras divididas en dos grupos de estudio; 100-700: muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml *E. coli*; <100: muestras que presentan <100 cfp/100 ml *E. coli*.

^bmuestra con 736 cfp/100 ml de *E. coli*

Tabla 4.24. Relaciones entre enterococos y bacteriófagos.

	grupo enterococo ^a	n	[fagos]<<EF EF/fagos > 2	[fagos]=EF EF/fagos = 0.5-2	[fagos]>>EF EF/fagos < 0.5
SOM	33-700	9	-	-	9 (100%)
	<33	15	3 (20%)	1 (6.7%)	11 (73.3%)
F-TOT	33-700	9	9 (100%)	-	-
	<33	11	7 (63.6%)	1 (9.1%)	3 (27.3%)
F-RNA	33-700	9	9 (100%)	-	-
	<33	10	8 (80%)	2 (20%)	-
BfRYC	33-700	9	9 (100%)	-	-
	<33	10	8 (80%)	2 (20%)	-
BfHSP	33-700	9	9 (100%)	-	-
	<33	4	4 (100%)	-	-

^amuestras divididas en dos grupos de estudio; 33-700: muestras dentro del rango 33-700 cfp/100 ml enterococos; <33: muestras que presentan <33 cfp/100 ml enterococos.

4.8 DISCUSIÓN 98-99

4.8.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DENTRO DEL RANGO

100-500 *E.coli*/100 ml

El muestreo de las aguas de baño con niveles de contaminación dentro del rango propuesto (entre 100-500 *E. coli*/100 ml) fue la principal dificultad durante la monitorización, por este motivo también se consideraron otras muestras analizadas con niveles de *E. coli* inferiores a 100 y superiores a 500 cfp/100 ml (hasta 700 cfp/100 ml).

Ya habíamos comprobado durante la monitorización de 1997 que en muestras altamente polucionadas todos los parámetros microbiológicos se correlacionaban. Era en las muestras con niveles más bajos de *E. coli* donde las relaciones entre fagos y bacterias indicadoras se invertían a favor de los bacteriófagos. El límite inferior de 100 sugerido para la campaña 98 tenía como objetivo eliminar el riesgo de encontrar sólo valores 0.

4.8.2 MATERIALES DE REFERENCIA Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS

En el estudio de 1998, trabajamos con el mismo lote de materiales de referencia que los laboratorios de IPL y RIVM y utilizamos los límites del control calculados previamente con dichos materiales en el laboratorio de RIVM.

- Los controles de calidad para *E. coli* y enterococos (llevados a cabo con las lenticulas J de PHLS, GB), mostraron valores correctos dentro de los límites de la carta de control.
- Los controles de calidad para los métodos de fagos, realizados con el material de referencia facilitado por RIVM, fueron considerados correctos.

Se detectaron problemas con el fago B56-1 debido a que el lote, preparado específicamente para este trabajo de monitorización, mostró una morfología de calvas muy pequeñas y presentó un número de pfp superior a 300 en el volumen de un mililitro. Esto condujo a dificultades en la lectura de las calvas y al análisis de volúmenes inferiores (0.2 ml ó 0.5 ml). En IPL se aplicaron análisis estadísticos extra: no fueron detectados ningún valor fuera de los límites (test Shapiro, Kolmogorov, Dixon y Grubbs, $P=0.05$) y ningún efecto "laboratorio" y efecto "volumen analizado" significativos (ANOVA, $P=0.05$) (Jofre *et al.*, 1999).

Posteriores trabajos en nuestro grupo de investigación probaron la conveniencia de la utilización de un material de referencia sustituto: el fago B56-3. B56-3 produce calvas nítidas y bien definidas sobre un césped confluyente de *Bact. fragilis* RYC2056 de un diámetro aproximado de 2 mm. El stock de B56-3 guardado a -70°C es estable en concentración y en morfología de calva (Jofre *et al.*, 1999).

Ya que el análisis de los materiales de referencia enviados por IPL y RIVM proporcionó resultados dentro de los límites de las cartas control, tenemos garantizada la calidad de los datos de bacterias indicadoras y bacteriófagos fecales que obtuvimos en el examen de muestras naturales.

4.8.3 ANÁLISIS DE FAGOS DE *Bact. fragilis* RYC2056

Dados los bajos recuentos de fagos de *Bact. fragilis* HSP40 encontrados en el análisis de muestras naturales durante la campaña de 1997, en 1998 se introdujo también el ensayo de fagos de *Bact. fragilis* 2056. Los estudios de Puig-A. (1998) habían mostrado que los fagos detectados con la cepa RYC2056 se encontraban de forma consistente y en mayor concentración en diferentes aguas residuales europeas que los fagos detectados con la cepa HSP40.

Nuestros resultados en aguas marinas con *E. coli* <100 cfp/100 ml muestran una concentración de fagos detectados con la cepa RYC2056 de *Bact. fragilis* 4 veces superior a la recuperación obtenida con la cepa HSP40 y 3.2 veces superior en muestras con *E. coli* en el rango 100-700 cfp/100 ml (Figura 4.29 y Tabla 4.22).

4.8.4 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE CONCENTRACIÓN

El porcentaje de recuperación del método de concentración por floculación de $Mg(OH)_2$, calculado a partir de los resultados de colifagos somáticos, mostró cierta variabilidad (media 39.2, desv. est. 20.5), pero no pareció verse afectado por la concentración de fagos en la muestra inicial.

La variabilidad observada en las recuperaciones podría deberse a un efecto similar al que ocurre con la variabilidad detectada para los materiales de referencia con relación a los límites superior e inferior de la carta de control. En efecto, si antes de la concentración se miden los valores inferiores y después de la concentración para la misma muestra, se miden los valores superiores, el porcentaje de recuperación podría ser muy diferente a la situación contraria (si antes de la concentración se miden los valores superiores mientras que los valores inferiores son medidos después de la concentración). De esta forma, la variación en el porcentaje de recuperación entre ambas situaciones podría ser muy amplia, sin ninguna influencia del método de concentración sino simplemente debido a la variabilidad de los recuentos.

La comparación de las eficiencias de floculación de colifagos somáticos obtenidas en muestras marinas durante la campaña de 1997 y durante la campaña 98-99, no indica diferencias significativas. Sin embargo, las recuperaciones en muestras de río durante el período de 1997 sí que fueron estadísticamente ($P < 0.01$) superiores a las obtenidas en mar durante la temporada 98-99 (Tabla 4.19). Este resultado está en conformidad con la observación realizada durante la sesión formativa de los participantes en el proyecto europeo en IPL, donde encontraron mejores recuperaciones para colifagos somáticos en río y peores en mar.

En cualquier caso, podemos considerar que las eficiencias de concentración durante la monitorización 98-99 estaban dentro de los límites de control del método de floculación por $Mg(OH)_2$.

4.8.5 RESULTADOS DE LA MONITORIZACIÓN DE AGUAS MARINAS APTAS PARA EL BAÑO

□ Muestras con *E. coli* en el rango de 100-700 cfp/100 ml

Los valores de colifagos somáticos fueron superiores a los de *E. coli* en el 100 % de las muestras, con una unidad logarítmica de diferencia en el 80 % de los casos y menos de una unidad de diferencia en el resto de muestras (tablas 4.20 y 4.23). El análisis de regresión lineal no mostró correlaciones entre *E. coli* y colifagos somáticos (Figura 4.20).

Los enterococos fecales no superaron los valores de *E. coli*; se encontraron a concentraciones parecidas (en el 40 % de las muestras) o a un logaritmo de distancia (60 % de muestras restantes).

El análisis de correlaciones bivariadas apuntó una cierta relación entre enterococos fecales y colifagos somáticos (correlación de Pearson 0.672, $P=0.033$), aunque no fue muy fuerte (Figura 4.21).

En los concentrados, encontramos positivos para bacteriófagos en los siguientes porcentajes de muestras: 100 % colifagos somáticos, 100 % fagos F-específicos totales, 40 % fagos F-RNA, 100 % fagos de *Bact. fragilis* 2056 y 100 % fagos de *Bact. fragilis* HSP40.

A pesar de que los fagos F-específicos fueron detectados en todas las muestras, sólo una pequeña proporción (% F-RNA/F-TOT= 16, de media) en unas pocas muestras (4 de 10) resultaron ser fagos F-RNA.

Todos los resultados de fagos F-específicos totales, fagos F-RNA, y fagos de *Bact. fragilis* 2056 y HSP40 fueron inferiores a los niveles de *E. coli* en 1-3 unidades logarítmicas.

□ Muestras con *E. coli* <100 cfp/100 ml

El 53 % de muestras fueron positivas para *E. coli* mientras que en el 76 % de las muestras se detectaron colifagos somáticos directamente sin concentrar. Los valores de colifagos somáticos fueron superiores a los de *E. coli* en el 71 % de las muestras, siendo la diferencia en el 42 % de éstas de 1 logaritmo y en el 58 % restante, de 2 unidades logarítmicas aproximadamente (tablas 4.21 y 4.23). La Rho de Spearman señaló cierta correlación entre colifagos somáticos y *E. coli* en este grupo de muestras (coeficiente= 0.692, $P=0.002$).

Los valores de enterococos fecales fueron del mismo orden de magnitud que los de *E. coli* en las mismas muestras, salvo en una muestra, donde los EF sobrepasaron a *E. coli* en un logaritmo.

No se encontró correlación entre colifagos somáticos y estreptococos fecales (Figura 4.27).

En los concentrados, encontramos positivos para bacteriófagos en los siguientes porcentajes de muestras: 88 % colifagos somáticos (observamos que las 2 muestras que resultaron negativas para colifagos somáticos, fueron recogidas en Mallorca), 59 % fagos F-específicos totales, 37 % fagos F-RNA, 65 % fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 y 47.5 % fagos de *Bact. fragilis* HSP40.

El porcentaje de fagos F-RNA del total de F-específicos osciló entre el 0 y el 100 %. Cabe decir que, al tratarse de bajas concentraciones (de 0.4 a 1.9 pfp/100 ml), estos porcentajes no pueden tenerse como muy precisos.

Tanto en muestras marinas con *E. coli* dentro del rango 100-700 como en muestras con <100 *E. coli*/100 ml, encontramos mayor porcentaje de positivos para fagos de *Bact. fragilis* que para fagos F-RNA.

En 3 muestras de 8 con <10 *E. coli*/100 ml detectamos colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* en los concentrados (Tabla 4.21). En todas las muestras en que se detectaron *E. coli* (n= 9), también se contabilizaron fagos de *Bact. fragilis*, salvo en una muestra.

4.8.6 VALORACIÓN DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

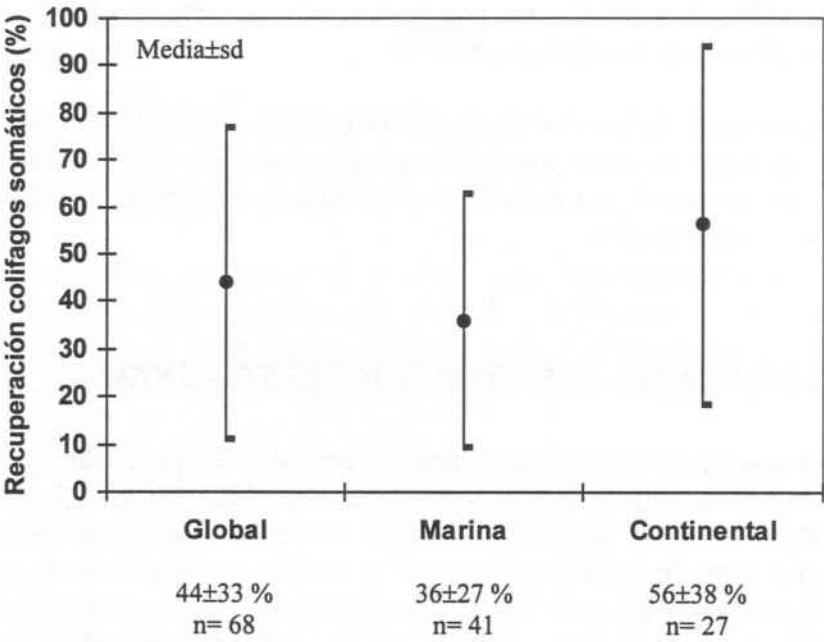
Los niveles de *E. coli* en las muestras recogidas el día 0 (día del muestreo) se determinaban por inoculación en microplacas EC/MU NFT 90-433 el mismo día de su recepción. Después de la incubación durante 24 horas a 44°C, se hacía una lectura preliminar para aproximar el rango de *E. coli* y decidir qué muestras se procesaban para análisis de bacterias entéricas y bacteriófagos indicadores el día 1 (día siguiente a la recepción de la muestra). Los valores de *E. coli* medidos el día 1 no fueron sustancialmente diferentes a los obtenidos el día 0 en las muestras dentro del rango 100-700 cfp/100 ml (Figura 4.17).

A partir de estos resultados, y sabiendo que el título de fagos varía poco en una muestra guardada durante un día a 4°C (capítulo 3), podemos considerar que la estrategia experimental fue adecuada.

4.8.7 RESULTADOS OBTENIDOS EN OTROS LABORATORIOS EUROPEOS

Las recuperaciones de colifagos somáticos obtenidas tanto en la monitorización realizada en verano de 1998 por dos laboratorios además del nuestro (IPL, RIVM), como en la monitorización realizada en primavera de 1999 por 15 laboratorios participantes, fueron similares con una media de recuperación del 44%. El porcentaje medio de recuperación de muestras continentales fue superior a la de muestras marinas, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 4.30).

Figura 4.30. Concentración por floculación de $Mg(OH)_2$. Evaluación de la recuperación de colifagos somáticos en las muestras analizadas durante la primavera de 1999 por 15 laboratorios europeos.



4.9 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

- 1** Los materiales de referencia para fagos han sido preparados y utilizados satisfactoriamente en cartas de control para la validación de métodos y control de calidad de los resultados.
- 2** La necesidad de concentrar muestras ambientales para detectar fagos se hace más evidente en aguas con niveles de *E. coli* <100 cfp/100 ml, sobretudo para fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis*.
- 3** La evaluación de los métodos de concentración de fagos por filtración-elución orbital de 100 ml y por floculación de $Mg(OH)_2$ en 1000 ml sobre muestras naturales de mar y río proporcionaron resultados aceptables. Los porcentajes de recuperación oscilaron alrededor del 50 % para colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis*.
- 4** El método de concentración por floculación de $Mg(OH)_2$ es simple, económicamente barato (no requiere equipo especial), puede ser aplicado en las diferentes aguas de baño de la UE, independientemente de la turbidez, y permite el análisis de un mayor volumen de muestra que el método de filtración.
- 5** El método de floculación ha permitido la detección de los tres grupos de bacteriófagos en el mismo concentrado. Con este método, diferentes laboratorios de Europa han obtenido resultados sobre los niveles de bacteriófagos en aguas de baño, incluso cuando la concentración era inferior a 1 pfp en 100 ml. A pesar de ello, es impracticable para el procesamiento de muchas muestras por día. También tiene el inconveniente de la dificultad de lectura de las calvas de fagos F+ en las placas de concentrados con un alto contenido de flora acompañante.
- 6** En muestras altamente polucionadas, tanto de mar como de río, todos los parámetros microbiológicos se correlacionan (de forma similar a lo que ocurre en el agua residual). En muestras con <100 *E. coli*/100 ml (o <33 EF/100 ml) no encontramos correlaciones entre bacterias y bacteriófagos.
- 7** En la mayor parte de playas analizadas del litoral catalán, los colifagos somáticos se detectan directamente, sin concentrar la muestra.
- 8** En aguas marinas aptas para el baño, normalmente la concentración de colifagos somáticos sobrepasa la de *E. coli*.

Capítulo V: PERSISTENCIA DE BACTERIÓFAGOS EN EL AMBIENTE ACUÁTICO

5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los resultados obtenidos en el capítulo precedente parecen indicar una mayor resistencia de los bacteriófagos, sobretudo el grupo de colifagos somáticos, frente a las bacterias indicadoras de contaminación fecal (básicamente coliformes fecales) en el medio marino. Además, varios estudios han demostrado que los coliformes presentan tasas de supervivencia mucho más inferiores en ambientes marinos que los virus entéricos (Moriñigo *et al.*, 1992; Wyer *et al.*, 1995); tal conclusión sugiere que los indicadores bacterianos no reflejarían la calidad del agua respecto a otros patógenos como virus y parásitos que podrían estar presentes en las aguas recreativas y/o aguas utilizadas para la cría de marisco. En efecto, los microorganismos de origen fecal en el agua marina pueden sufrir diferentes procesos de inactivación natural que no afectan de igual forma a virus y bacterias (Gironés, 1986; Lucena *et al.*, 1995; Sinton *et al.*, 1999; Burkhardt III *et al.*, 2000).

La función potencial de los bacteriófagos como modelos o indicadores de virus entéricos humanos y/o contaminación fecal debería ser evaluada en base a información detallada sobre su ecología en diferentes ambientes. Con el propósito de ampliar el conocimiento sobre el comportamiento de los bacteriófagos entéricos candidatos a microorganismos índice en el ambiente acuático, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Obtención de datos del agua residual urbana y comparación de las relaciones indicadores bacterianos/fagos en el agua residual y en las correspondientes aguas de baño. El conocimiento de la fuente principal de contaminación de las aguas superficiales es esencial para entender mejor posibles fenómenos de dilución y/o inactivación de los microorganismos en el ambiente acuático.
- Estudios de inactivación de bacteriófagos indígenas en agua de mar. Entre los muchos factores que afectan la supervivencia de virus en el ambiente marino están la salinidad, la temperatura, la radiación solar, la asociación de virus a sólidos y la presencia de flora microbiana (Gironés *et al.*, 1990; Bosch, 1995; Sinton *et al.*, 1999). La radiación solar parece ser el factor más importante que influye en la inactivación de los indicadores fecales bacterianos en el mar (Sinton *et al.*, 1994), pero los efectos de la luz solar sobre los virus no están tan bien documentados como sobre las bacterias. Los experimentos de supervivencia de los tres grupos de fagos entéricos, junto a los indicadores bacterianos, pueden revelar diferencias importantes en la resistencia de los microorganismos en el ambiente marino y podrían explicar resultados y relaciones (entre grupos de fagos y bacterias) encontrados en aguas marinas afectadas de contaminación reciente y en aguas de baño que cumplen los valores guía de la Directiva 76/160/CE.
- Estudio de microorganismos en muestras con contaminación persistente. La falta de correlación entre bacterias y virus es especialmente significativa en muestras ambientales en las que los microorganismos contaminantes han sufrido diferentes procesos de inactivación como son, pe. aguas tratadas, aguas subterráneas, aguas marinas, marisco y sedimentos marinos. Se ha observado bioacumulación de bacterias y bacteriófagos en mejillones (Lucena *et al.*, 1994) así como concentración en sedimentos marinos (Lucena *et al.*, 1996). Con el objetivo de comparar los niveles de bacteriófagos y bacterias fecales entre muestras con contaminación

persistente y muestras en agua residual, analizamos sedimentos marinos de la costa catalana.

- Obtención de resultados positivos para enterovirus en agua marina. El análisis de bacterias indicadoras, bacteriófagos de bacterias fecales y enterovirus en muestras relativamente polucionadas permitirá establecer relaciones entre dichos microorganismos. Además, con este tipo de información es posible elucidar cuál es el grado de dilución y/o inactivación necesario de los posibles vertidos de agua residual que llegan al mar para que las aguas de baño cumplan con los requisitos de calidad establecidos en la Directiva europea.

En definitiva, el objetivo fue conocer un poco mejor la ecología de los bacteriófagos fecales en el medio marino, evaluándolos dentro del ciclo de contaminación de las aguas costeras: descargas de agua residual en el ambiente marino, acumulación en sedimentos, transporte y persistencia en las aguas de baño.

PLAN DE TRABAJO

⇒ Obtención y análisis de diferentes muestras ambientales. Determinación de los siguientes parámetros microbiológicos: coliformes fecales, estreptococos fecales, colifagos somáticos, fagos F-específicos, fagos F-RNA, fagos de *Bacteroides fragilis* HSP40 y fagos de *Bact. fragilis* RYC2056.

- Análisis de agua residual urbana.
- Experimentos de supervivencia en agua de mar “*in situ*”.
- Obtención y análisis de sedimentos marinos que presenten contaminación fecal relativamente alta.
- Concentración y detección de enterovirus en muestras marinas próximas al foco de contaminación.

⇒ Valoración global:

- Los datos obtenidos en los estudios de aguas de baño con diferentes grados de contaminación (capítulo 4), ¿pueden ser explicados a través de los resultados anteriores?.
- División de las muestras en varios grupos para su análisis: (i) primera clasificación según tipo de agua: ① agua residual, ② río, ③ mar; (ii) segunda clasificación en función del nivel de *E. coli* (N/100 ml): ① muestras <100, ② muestras 100-600, ③ muestras 600-2000, ④ muestras >2000.
- Diferencias en la presencia y cantidad de bacteriófagos en las potenciales aguas de baño del Área Metropolitana de Barcelona y sus relaciones con *E. coli* y enterococos fecales.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de los parámetros bacteriológicos y bacteriófagos modelo se llevó a cabo siguiendo los protocolos especificados en el capítulo 2 de *material y métodos generales*. Los controles de bacterias y bacteriófagos de referencia fueron satisfactorios y estaban dentro de los límites de las cartas de control específicas.

5.2.1 AGUA RESIDUAL

Se analizaron un total de 13 muestras de agua residual urbana tomadas a la entrada de la depuradora de Sant Adrià del Besòs. Los muestreos se realizaron durante siete días diferentes en junio de 1999 dentro de la franja horaria que va de las 8:45 a las 9:45 de la mañana. Las muestras se conservaron a 4°C desde el momento de su recogida hasta acabar las diferentes determinaciones microbiológicas en el mismo día de trabajo.

Por cada muestra, se realizaron dos bancos de diluciones independientes con Ringer 1/4 (hasta 10^{-4}) para la cuantificación de coliformes fecales y estreptococos fecales por filtración en membrana y esporas de clostridios sulfito-reductores. También se produjeron dos bancos de diluciones independientes con peptona salina (hasta 10^{-4}) para la enumeración de colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos F-RNA. La determinación de los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y *Bact. fragilis* RYC2056 se efectuó con muestra previamente descontaminada por filtración a través de filtros de PVDF (Millex-GV, Millipore Corp.) de 0.22 μm y también se realizaron dos bancos de diluciones. Para cada parámetro examinado, se hicieron un mínimo de dos placas por dilución. En cada banco de dilución se calculó el número de microorganismos en 100 ml y la media aritmética de estos dos valores es el resultado que se ofrece para cada muestra y microorganismo analizado.

5.2.2 SUPERVIVENCIA DE BACTERIÓFAGOS EN EL AMBIENTE MARINO. EXPERIMENTOS "IN SITU"

Para el diseño experimental se siguió básicamente el protocolo descrito en el trabajo de Muniesa (1998).

- **Preparación de bolsas de diálisis (general).**

Material: Membranas de diálisis, tamaño de corte 12-14 Kda.

Las membranas de diálisis se presentan como un tubo largo cilíndrico abierto por los dos extremos. Para preparar las bolsas, cortar el tubo de diálisis en fragmentos de unos 70 cm de longitud. Manipular las membranas con guantes de látex para evitar que las grasas de la piel obstruyan los poros. Introducir las bolsas en un gran volumen de la solución de lavado de membranas de diálisis (Anexo 5.A). Hervir 10 minutos en la solución de lavado. Retirar las bolsas y lavarlas con agua bidestilada. A continuación hervirlas 10 minutos en la solución 1 mM de EDTA. Dejar enfriar la solución de EDTA con las membranas y guardarlas a 4°C, (las bolsas dentro de la solución de EDTA

pueden guardarse a 4°C durante mucho tiempo hasta su utilización). Antes de utilizarlas, lavarlas por dentro y por fuera con agua bidestilada (las membranas han de mantenerse siempre húmedas).

- **Preparación de la muestra**

Se cogió agua residual reciente (agua de la entrada a la planta depuradora de Sant Adrià del Besòs) y se diluyó con agua de mar de la zona donde se realizaba el experimento de inactivación "*in situ*" en relación 1:50. Se llenaron las bolsas de diálisis con aproximadamente 100 ml de esta mezcla. Se comprobó que las bolsas no perdían agua después de hacer dos nudos en cada extremo. Las bolsas se sumergieron en el mismo tipo de agua de mar utilizada para llenar las membranas. Se efectuaron un total de 4 experimentos de supervivencia siguiendo este protocolo de preparación de la muestra.

También se realizó un ensayo de inactivación con bacteriófagos de laboratorio; en este caso, el agua de mar no se mezcló con agua residual sino que se añadieron directamente las diluciones correspondientes de los bacteriófagos ϕ X174, MS2, B40-8 y B56-3 para obtener una concentración final de aproximadamente 10^2 pfu/ml de cada grupo de fagos. Se continuó utilizando RNAsa en la cuantificación de los fagos MS2 y de esta forma se comprobó que todos los fagos F-específicos enumerados en las muestras eran fagos F-RNA.

- **Muestras controladas en el mar**

Los 18 tubos de diálisis, preparados para cada uno de los experimentos realizados, se dividieron en dos grupos de 9 y se unieron por un extremo con un cordel; cada grupo se protegió con una malla de plástico y se introdujeron dentro de una jaula de metal (para evitar posibles daños físicos de las bolsas). Este recipiente se sumergió dentro del Port Olímpic de Barcelona atado con una cuerda a una amarra de un barco y se colocó aproximadamente a 40 cm de profundidad. El tiempo 0 se tomó después de 30 minutos de haber colocado las muestras en el mar.

- **Toma de muestras**

Se extraían dos o tres tubos (según el caso) con las muestras a intervalos de tiempo variable y el contenido se vertía en botellas estériles de 100 ml. Una vez en el laboratorio, las muestras mantenidas a 4 °C se sometían inmediatamente al análisis de los distintos parámetros microbiológicos objeto de estudio: coliformes fecales, estreptococos fecales, esporas de clostridios sulfito-reductores, colifagos somáticos, fagos F-específicos, fagos F-RNA, fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y *Bact. fragilis* RYC2056.

En el capítulo 2 de *material y métodos generales* se especifican las distintas metodologías utilizadas para los análisis microbiológicos, sólo señalar que los coliformes y estreptococos fueron cuantificados con la técnica de filtración en membrana y que los bacteriófagos se analizaron directamente, sin concentrar.

• Análisis de los resultados

Analizando las curvas de supervivencia se puede calcular el tiempo necesario para una reducción del 90 % (T_{90}) en el número de cfp ó pfp, del 99% (T_{99}) y del 99.9% ($T_{99.9}$) en las muestras de aguas naturales. Estos índices permiten comparar cuantitativamente las diferentes cinéticas de inactivación y evidencian las importantes diferencias existentes entre la supervivencia de diversos microorganismos en aguas marinas.

A partir de las diluciones correspondientes, se calculó la concentración de los diferentes microorganismos en cada uno de los tubos extraídos del mar en el mismo intervalo de tiempo. Se realizó la media de los dos o tres resultados equivalentes en tiempo para cada parámetro y este valor, expresado como cfp ó pfp en 100 ml, es el que se constata en las tablas de resultados. A partir de dichos resultados, se calculó el $\log_{10}(N_t/N_0)$, siendo N_t el número de microorganismos en el tiempo t y N_0 el número de microorganismos en el tiempo 0.

Se realizaron un total de 5 experimentos de supervivencia “*in situ*” y para cada uno de ellos se calculó la regresión lineal $Y = mX + b$, siendo Y el $\log_{10}(N_t/N_0)$ y X el tiempo en horas. Obtenidos los valores m y b (pendiente e intersección con el eje Y , respectivamente), despejamos $X = (Y - b)/m$, sustituyendo Y por -1 . El valor obtenido es la T_{90} , tiempo que tarda en disminuir el título de microorganismos en un logaritmo (quedando así un 10 % del título inicial).

En estos cálculos estamos asumiendo que las curvas de inactivación de los diferentes microorganismos siguen una cinética de primer orden, pero esto no es del todo cierto, como podremos comprobar en las gráficas de resultados.

5.2.3. SEDIMENTOS MARINOS

• Muestreo

Se aprovecharon muestras del Programa de Vigilancia y Control de emisarios submarinos del Área Metropolitana de Barcelona (emisarios de la EDAR Barcelona-Besòs y la EDAR Gavà-Viladecans). Los puntos de muestreo se encontraban entre 20 y 50 m de profundidad y entre 1 y 5 Km de la costa y se agruparon de la siguiente forma:

- 6 estaciones (de S1 a S6) en la zona Besòs de las que se obtuvieron muestras en dos campañas diferentes,
- 5 estaciones (A, B, D, E y F) frente a la costa de Barcelona ciudad.
- 2 estaciones (GV0 y GV2) de la zona Gavà.

Además, se añadieron dos muestras de sedimentos recogidas en la Bahía de los Alfacs del Delta del Ebro a 0.5 m de profundidad y a unos 100 metros de la línea de costa (DERES y DEMEJ).

La toma de muestras se realizó con la draga de cuchara y esto permitía recoger entre 100 y 500 g de la primera capa sedimentaria (1-2 cm) de las diferentes estaciones. Los sedimentos se transportaban y guardaban a 4°C en la oscuridad, y se examinaban generalmente al día siguiente.

• Procedimiento

Se siguió básicamente el protocolo descrito en Araujo y col. (1997).

Si el sedimento era húmedo, se centrifugó a 2000 g durante 20 min. a 4°C con el objetivo de conseguir un sedimento más compacto, homogéneo y comparable.

Para la detección de bacterias fecales y esporas de clostridios se pesaron entre 25 y 50 g de sedimentos, se mezclaron con Ringer 1/4 en proporción peso:volumen 1:3 y la solución se mantuvo en agitación máxima durante 10 minutos. Después de otros 10 minutos de reposo, se recogió el sobrenadante que se sometería a análisis bacteriológico.

Para bacteriófagos se tomaron entre 10 y 50 g de sedimento, según disponibilidad y/o contaminación prevista. La elución de bacteriófagos a partir de los sedimentos marinos se realizó con tampón glicina 0.25 M pH 10.5, en relación peso:volumen 1:3, durante 10 minutos en agitación magnética a la máxima velocidad posible. La suspensión se dejó reposar 10 minutos, transcurridos los cuales se recogió el sobrenadante. El eluido fue clarificado por centrifugación a 2000 g durante 5 min. a 4°C. El sobrenadante así obtenido se neutralizó a pH 7-7.5 con HCl 1M (y NaOH 1M) y se guardó a 4°C en la oscuridad hasta el día siguiente. En caso de no acertarse la dilución para poder cuantificar algún grupo de bacteriófagos, volvía a repetirse la titulación de la suspensión de virus bacterianos al día siguiente.

Los resultados se expresan como cfp ó pfp en 100 g de sedimento.

5.2.4 ENTEROVIRUS EN AGUA DE MAR.

Los enterovirus fueron detectados utilizando la línea celular continua BGM. Para el crecimiento de las células se utilizó medio MEM ("*Eagle's minimum essential medium*") conteniendo un 5% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 26.8 mM NaHCO₃, 100 U de penicilina por ml y 100 µg de estreptomicina por ml. El medio de mantenimiento era igual que el de crecimiento pero con un 1% de suero fetal bovino. Como control positivo se utilizó el poliovirus atenuado tipo 1, cepa Lsc-2ab. El stock fue preparado como una suspensión de poliovirus 1 en MEM con un 5% de glicerol, repartido en viales de 1.5 ml y conservados a -70°C. La concentración de virus en cada vial determinada por ensayo estándar de calvas sobre células en monocapa era de 13.8 pfp/ml ($x = 13.8$, $x+2s = 22.5$, $x-2s = 8.4$, $x+3s = 28.7$, $x-3s = 6.6$; datos facilitados por N. Queralt).

En el Anexo 6.A se presenta el protocolo detallado de trabajo para el mantenimiento de la línea celular BGM.

5.2.4.1 Concentración de enterovirus por el método de polvo de vidrio.

Se siguió básicamente el protocolo descrito en Lucena y col. (1991). El aparato utilizado fue el propuesto por Schwartzbrod y Lucena-Gutiérrez (1978), posteriormente modificado en su pieza inferior por Ribas y col. (1986). El procedimiento de concentración se especifica con más detalles en el Anexo .

- Se utilizaron 150 g de polvo de vidrio Sovirel de 100-200 μm de diámetro como sustrato cargado negativamente para la adsorción de los virus.
- El volumen de las muestras de mar analizadas osciló entre 10 y 18 litros. El pH de la muestra en estudio se ajustó a 3.5 con HCl 1 N en constante agitación y se añadió MgCl_2 a una concentración final de 0.05 M.
- Preparado y esterilizado el aparato de filtración, la concentración se efectuó por filtración ascensional de la muestra de agua acidificada a través de una masa de vidrio en lecho fluidizado.
- Los enterovirus adsorbidos al polvo de vidrio fueron enseguida eluidos tras añadir por la parte superior de la columna 150 ml de tampón glicina 0.05M-NaOH pH 11.0 coloreado con rojo fenol 0.01 mg/ml, de los cuales se recogieron los primeros 30-40 ml por el grifo inferior de la columna. El paso de los virus teóricamente retenidos en el polvo de vidrio al eluyente se debe a que a pH alcalino (superior al pH_i de los virus) existe repulsión electrostática entre los virus, cargados negativamente, y el polvo de vidrio, siempre negativo.
- El concentrado fue rápidamente neutralizado por adición de HCl 0.1N en agitación, siendo el viraje del color rojo al color anaranjado el indicador de la consecución del pH neutro.
- La muestra concentrada se guardó a 4 °C durante máximo 24 horas antes de proceder al análisis de enterovirus.
- Descontaminación e inoculación en cultivo celular, generalmente el mismo día de la concentración.

5.2.4.2. Metodología utilizada en el análisis de parámetros bacteriológicos, bacteriófagos fecales y enterovirus de muestras marinas.

Se tomaron muestras de agua marina relativamente polucionada en contenedores estériles de plástico de 15 litros que se transportaron inmediatamente al laboratorio y se guardaron a 4°C durante máximo 24 h antes de los análisis.

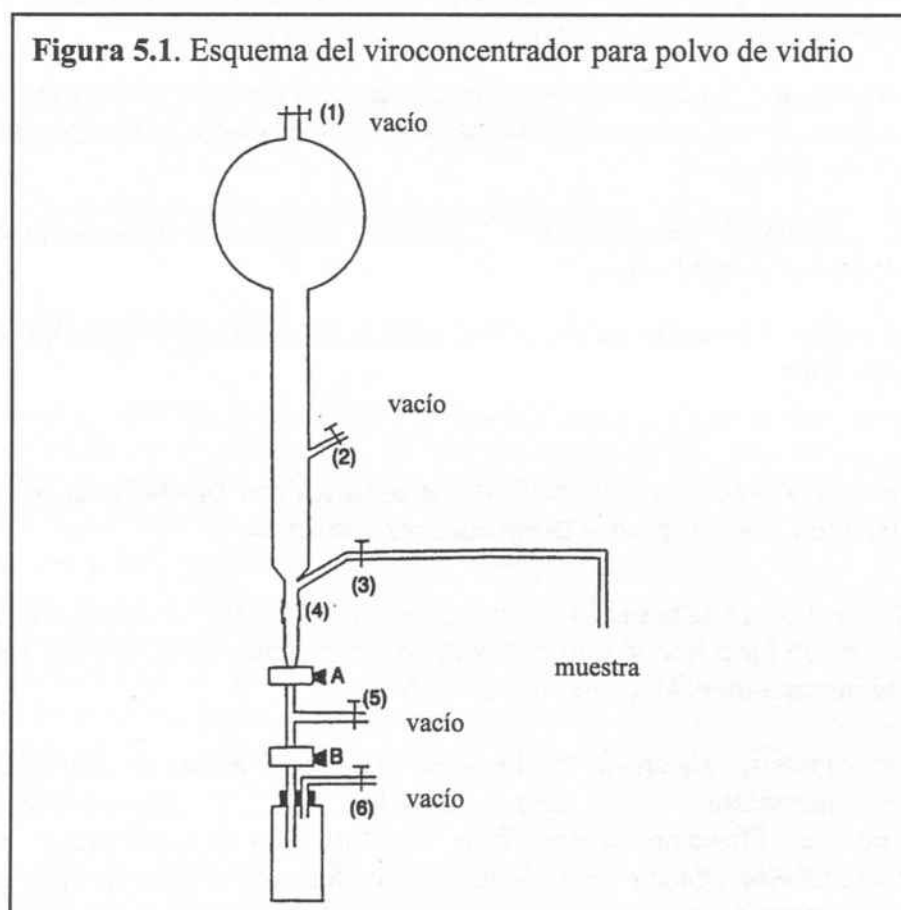
Los coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales se analizaron por filtración en membrana sobre agares mEndo, mFC y mEnterococcus respectivamente, con la utilización de agar Bilis Esculina para la confirmativa de estreptococos fecales. La enumeración de bacteriófagos se efectuó tras concentración de 100 ml de muestra para colifagos somáticos, 300 ml para fagos F-específicos totales, 300 ml para fagos F-específicos tratados con RNAsa y 300 ml para fagos de *Bact.*

fragilis RYC2056. En la concentración de fagos se siguió básicamente la metodología validada por J. Méndez (1999): acondicionamiento de la muestra con $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ a una concentración final de 0.05M, filtración a través de una membrana de acetato/nitrato de celulosa de 0.22 μm (GSWP047, Millipore), elución durante 4 minutos en baño de ultrasonidos (200W) con 5 ml de la solución a pH 9.0 conteniendo 3% Tween 80, 1% extracto de carne y 0.5 M NaCl.

Los enterovirus se concentraron a partir de muestras marinas de 10-15 litros por el método de polvo de vidrio descrito en el apartado anterior. Los 40-50 ml de concentrado obtenido para cada muestra fueron descontaminados siguiendo el protocolo de trabajo propuesto por Papageorgiu y col. (Congreso IAWQ, París 2000): prefiltración a través de papel de filtro Whatman n° 1 (Whatman, Kent, United Kingdom), seguida de filtración a través de unidades Millex-GV de 0.22 μm (Millipore, Corp.). La muestra así preparada se utilizó para inocular 15 ml en placas de 90 mm de diámetro (1ml/placa) con una monocapa bien formada de células BGM, según el ensayo de calvas estándar (APHA, 1995). También se inocularon 10 ml de cada muestra en rouxes de 175 cm^2 para realizar tests de presencia-ausencia de efecto citopático sobre los tapetes celulares (APHA, 1995). Se hizo una confirmación de todos los resultados obtenidos por inoculación en medio líquido, tanto si fueron positivos como si dieron negativos, siguiendo el procedimiento descrito en APHA (1995).

En el Anexo se adjuntan los protocolos de detección de virus entéricos por cultivo celular.

Figura 5.1. Esquema del viroconcentrador para polvo de vidrio



5.3 RESULTADOS

5.3.1 Agua residual

La Tabla 5.1 muestra los resultados de bacterias fecales, bacteriófagos de bacterias entéricas y enterovirus en agua residual del Área Metropolitana de Barcelona a la entrada de la planta depuradora físico-química de Sant Adrià del Besòs.

En general, los valores obtenidos son bastante homogéneos dentro de cada grupo de microorganismos, con excepción de las esporas de clostridios.

Tabla 5.1 Niveles de bacteriófagos e indicadores bacterianos de contaminación fecal en el agua residual a la entrada de la planta depuradora de Sant Adrià del Besòs.

5.1.A	CF	EF	CP	SOM	F+	F-RNA
-------	----	----	----	-----	----	-------

cfp/ pfp en 100 ml

n	13	13	13	13	13	13
x	3.02×10^7	1.29×10^6	9.68×10^5	1.03×10^7	1.20×10^6	1.06×10^6
sd	8.60×10^6	5.19×10^5	2.42×10^6	4.11×10^6	4.82×10^5	4.37×10^5
mg	2.87×10^7	1.17×10^6	3.24×10^5	9.52×10^6	1.12×10^6	9.83×10^5
cv	28.5	40.2	249.8	39.8	40.1	41.1
max	4.27×10^7	2.10×10^6	8.64×10^6	1.93×10^7	2.20×10^6	1.95×10^6
min	1.17×10^7	4.00×10^5	1.00×10^5	3.43×10^6	4.67×10^5	3.95×10^5

5.1.B	BfHSP40	BfRYC2056	ENT*
-------	---------	-----------	------

pfp en 100 ml

n	12	12	12
x	7.36×10^3	7.24×10^4	37.4
sd	2.99×10^3	2.98×10^4	28.1
mg	6.77×10^3	6.55×10^4	27.0
cv	40.6	41.2	75.2
max	1.19×10^4	1.16×10^5	99.0
min	3.48×10^3	2.66×10^4	7.1

Los datos para la elaboración del cuadro 5.1.B han sido facilitados por J. Méndez.

*la muestra se filtró por papel Whatman 1, seguidamente se descontaminó con filtros de PVDF de 0.22 μm y se inoculó 1 ml en placas de 90 mm con células BGM (método monocapa). Se utilizaron las concentraciones de antibióticos del método de células en suspensión.

CF: coliformes fecales; EF: estreptococos fecales; CP: esporas de clostridios sulfito-reductores; SOM: colifagos somáticos; F+: fagos F-específicos totales; F-RNA: fagos F-RNA; BfHSP40: fagos de *Bact. fragilis* HSP40; BfRYC2056: fagos de *Bact. fragilis* RYC2056; ENT: enterovirus.

n= número de muestras; x: media aritmética; sd: desviación estándar; mg: media geométrica; cv: coeficiente de variación, en porcentaje; max: valor máximo; min: valor mínimo.

En efecto, al aplicar las pruebas de normalidad sobre las variables microbiológicas, tanto la prueba de Kolmogorov-Smirnov como la de Shapiro-Wilk señalan que los datos relativos a esporas de clostridios son los únicos que no se distribuyen normalmente. La variable clostridios tampoco parece ajustarse a una normal cuando dichos datos se transforman en logaritmo y, por tanto, no la hemos considerado en las pruebas paramétricas.

Tal y como podemos observar en la Tabla 5.2, el análisis de las correlaciones bivariadas entre los parámetros microbiológicos medidos en el agua residual urbana señala 13 valores para la correlación de Pearson altamente significativos ($p < 0.01$) que aumentan a 17 al transformar los datos a logaritmos. En realidad, todos los parámetros aparecen correlacionados, a excepción de los coliformes fecales con los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y de *Bact. fragilis* RYC2056, grupos de bacteriófagos que ni antes ni después de la transformación a logaritmos aparecen vinculados a este indicador fecal bacteriano.

La correlación más fuerte se establece entre los fagos F-específicos totales y los fagos F-RNA con un valor de 0.997, le sigue las correlaciones entre dichos fagos y los enterovirus (c. de Pearson de 0.865 y 0.850 respectivamente). Las siguientes correlaciones con alta significación se sitúan entre los estreptococos fecales y los cinco grupos de bacteriófagos modelo que hemos definido.

Los colifagos somáticos se correlacionan con los dos grupos de fagos de *Bact. fragilis* y entre los fagos de *Bact. fragilis* el c. de Pearson es de 0.721. Los fagos F-específicos se relacionan significativamente con los coliformes fecales y al transformarlos en logaritmos, también se emparejan con los colifagos somáticos.

Los enterovirus, además de relacionarse con los fagos F-específicos, parecen correlacionarse significativamente con los fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 cuando los datos se transforman a logaritmos.

La Rho de Spearman (versión no paramétrica del coeficiente de correlación de Pearson) señala una cierta correlación ($p < 0.05$) entre las esporas de clostridios y los coliformes fecales y entre las esporas y los fagos F-específicos totales y también con los fagos F-RNA, pero en ningún caso la fuerza de las relaciones es muy fuerte (0.6-0.7).

La Figura 5.1 presenta una visión resumida de los resultados en el agua residual urbana en forma de diagramas de cajas. Por otro lado, la Tabla 5.3 muestra relaciones entre los diferentes parámetros microbiológicos estudiados en el agua residual, donde destaca la prevalencia de los coliformes fecales. Más adelante, en este mismo capítulo, haremos referencia a esta tabla.

Tabla 5.2. Correlaciones bivariadas entre los diferentes parámetros microbiológicos medidos en agua residual urbana a la entrada de la depuradora de Sant Adrià del Besós.**Correlaciones**

	CF	EF	SOM	F+	F-RNA	BfHSP40	BfRYC2056	ENTEROVIRUS
CF	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N							
EF	,637* ,019 13							
SOM	,478 ,099 13	,797** ,001 13						
F+	,703** ,007 13	,798** ,001 13	,633* ,020 13					
F-RNA	,702** ,007 13	,796** ,001 13	,613* ,026 13	,997** ,000 13				
BfHSP40	,364 ,245 12	,820** ,001 12	,752** ,005 12	,636* ,026 12	,631* ,028 12			
BfRYC2056	,535 ,073 12	,745** ,005 12	,736** ,006 12	,670* ,017 12	,640* ,025 12	,721** ,008 12		
ENTEROVIRUS	,621* ,031 12	,703* ,011 12	,593* ,042 12	,865** ,000 12	,850** ,000 12	,601* ,039 12	,623* ,031 12	

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Continuación Tabla 5.2, correlaciones bivariadas entre los logaritmos de parámetros microbiológicos medidos en agua residual.

Correlaciones									
	LOGCF	LOGEF	LOGSOM	LOGF	LOGRNA	LOGHS	LOGRYC	LOGENT	
LOGCF	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N								
LOGEF	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,687** ,009 13							
LOGSOM	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,717** ,006 13	,881** ,000 13						
LOGF	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,811** ,001 13	,816** ,001 13	,786** ,001 13					
LOGRNA	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,810** ,001 13	,810** ,001 13	,767** ,002 13	,997** ,000 13				
LOGHS	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,433 ,160 12	,840** ,001 12	,835** ,001 12	,658* ,020 12	,640* ,025 12			
LOGRYC	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,565 ,056 12	,677* ,016 12	,779** ,003 12	,672* ,017 12	,638* ,026 12	,752** ,005 12		
LOGENT	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,607* ,036 12	,588* ,045 12	,704* ,011 12	,820** ,001 12	,789** ,002 12	,699* ,011 12	,709** ,010 12	

**. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Figura 5.1. Representación gráfica de los niveles de indicadores fecales bacterianos, bacteriófagos de bacterias entéricas y enterovirus en agua residual urbana del Área Metropolitana de Barcelona.

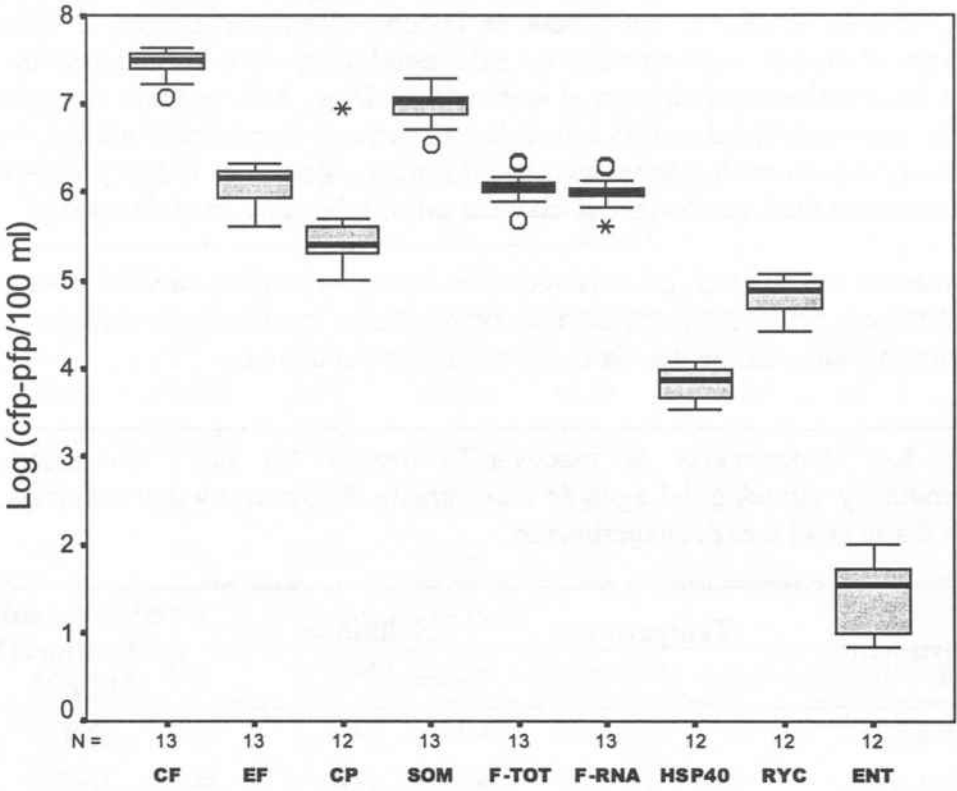


Tabla 5.3. Relaciones entre indicadores bacterianos y bacteriófagos en agua residual urbana.

CF/EF	1,23	EF/CF	0,81	SOM/CF	0,94	FTOT/FRNA	1,01
CF/SOM	1,07	EF/SOM	0,87	SOM/EF	1,15	FRNA/HSP	1,56
CF/FRNA	1,24	EF/FRNA	1,01	SOM/FRNA	1,16	FRNA/RYC	1,24
CF/HSP	1,95	EF/HSP	1,58	SOM/HSP	1,82	FRNA/ENT	4,19
CF/RYC	1,55	EF/RYC	1,26	SOM/RYC	1,45	RYC/HSP	1,26
CF/ENT	5,21	EF/ENT	4,24	SOM/ENT	4,87	RYC/ENT	3,36

Cada término de una división corresponde al valor medio de los logaritmos de los 12 ó 13 datos obtenidos para cada uno de los parámetros.

5.3.2 Supervivencia de bacteriófagos en el ambiente marino. Experimentos “in situ”.

Se realizaron experimentos de supervivencia en agua marina de bacterias fecales y bacteriófagos indígenas habituales en aguas superficiales afectadas de contaminación reciente. Se llevaron a cabo dos experiencias en verano y otras dos en la estación hibernal. Además, se efectuó una prueba en invierno con bacteriófagos de laboratorio. De acuerdo al diseño experimental de este estudio, se creó un microcosmos que simulaba las condiciones reales en el ambiente acuático. Así, se tenía controlada una porción de agua superficial marina sometida a factores de inactivación natural, de forma que podía seguirse la evolución temporal de los microorganismos índice y/o indicadores de contaminación fecal que habían afectado la calidad del agua en el tiempo 0.

A continuación se muestran las características de temperatura y salinidad del agua de mar en el lugar y períodos en que se llevaron a término los diferentes experimentos, así como la irradiación solar media diaria del mes correspondiente.

Tabla 5.4. Experiencias de inactivación natural “in situ”. Condiciones de temperatura y salinidad del agua de mar durante dichos ensayos y radiación solar media diaria en el mes del experimento.

Experimento	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Irradiación solar media diaria* (MJ/m ²)
A (10/8/98)	24.5	34	22.4
B (12/1/99)	12	35	9.5
C y D (22/3/99)	14	35	16.8
E (27/7/99)	24	35	27.5

*Datos recogidos en la estación meteorológica de la Ciutadella (Barcelonès) perteneciente a la red XVPCA (*Xarxa de Vigilància i Previsió de la Contaminació Atmosfèrica*), adscrita a la *Generalitat de Catalunya*.

Los resultados numéricos que se presentan en la Tabla 5.5 dan idea de la baja concentración de fagos de *Bact. fragilis* por mililitro de muestra analizada pero no se añadieron fagos de laboratorio (salvo en el experimento diseñado a tal efecto) para poder estudiar el comportamiento de los fagos salvajes en un agua que no hubiera perdido las características del agua de mar (agua residual a una concentración final del 5% vol/vol).

Las figuras 5.2 a 5.6 muestran gráficamente las diferencias en las cinéticas de inactivación de los microorganismos estudiados. La comparación de las T₉₀ (Tabla 5.6) pone en evidencia la desigual persistencia de bacterias fecales y bacteriófagos de bacterias entéricas frente a posibles factores de inactivación natural (principalmente la radiación solar) presentes en el ambiente marino.

Tabla 5.5. Experimentos "in situ" de supervivencia en agua de mar. Resultados expresados como cfp y/o pfp en 100 ml.**Experimento A:** del 10 al 17 de agosto de 1998

DÍA	SOM	F-TOT	F-RNA	BfHSP	BfRYC
0	67500	6250	5375	300	330
1	42667	977	143	277	553
2	8605	140	20	25	30
3	3600	50	<10	10	30
7	200	-	-	<5	<5

Experimento B: del 12 al 18 de enero de 1999

DÍA	CF	EF	CP	SOM	F-TOT	F-RNA	BfHSP	BfRYC
0	66360	15000	3546	79333	6633	5667	20	175
1	15600	12000	5682	71000	2240	1750	50	230
3	35	1600	2545	25000	318	128	35	85
6	<5	10	1900	9600	20	5	5	55

Experimento C: del 22 al 30 de marzo de 1999

DÍA	CF	EF	CP	SOM	F-TOT	F-RNA	BfHSP	BfRYC
0	54500	17500	5500	134300	9800	8700	50	450
2	1770	6290	5910	80924	635	335	30	80
4	40	310	2975	11015	130	70	<10	<10
8	<5	<5	650	3730	-	-	-	-

Experimento D: del 22 al 30 de marzo de 1999

DÍA	φX174	MS2	B40-8	B56-3
0	29500	65000	12230	11450
2	7410	4770	4100	5025
4	1435	560	180	180
8	790	10	40	40

Los valores sombreados en gris están infraestimados porque los controles positivos del material de referencia de ese día de trabajo estaban por debajo del límite de acción en el caso de B40-8 y por debajo de la línea de advertencia para B56-3. Dichos valores no han sido considerados en el cálculo de las T_{90} .

Experimento E: del 27 al 30 de julio de 1999

DÍA	CF	EF	CP	SOM	F-TOT	F-RNA	BfRYC
0	727500	17000	3250	221667	37467	33767	477
1	34250	650	3150	66500	1600	267	140
2	1500	45	3750	27000	520	100	45
3	317	9	1050	5033	210	20	5

Figura 5.2. Supervivencia de bacteriófagos en agua de mar: **Experimento A** (del 10/8/98 al 17/8/98).

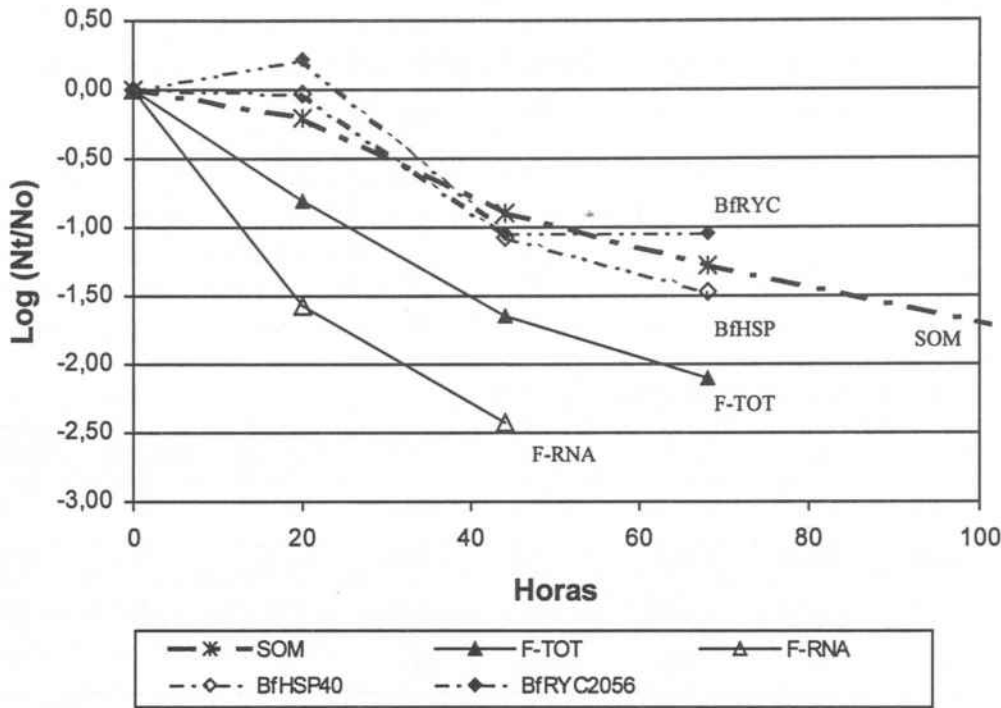


Figura 5.3. Supervivencia de bacterias fecales y bacteriófagos en agua de mar: **Experimento B** (del 12/1/99 al 18/1/99).

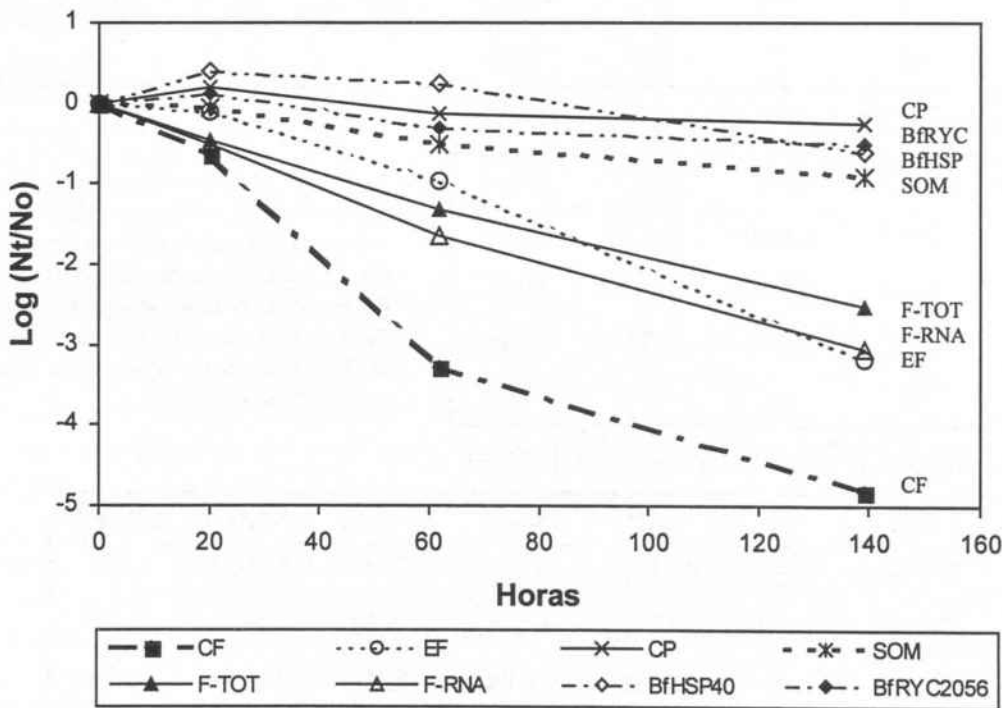


Figura 5.4. Supervivencia de bacterias fecales y bacteriófagos en agua de mar: Experimento C (del 22/3/99 al 30/3/99).

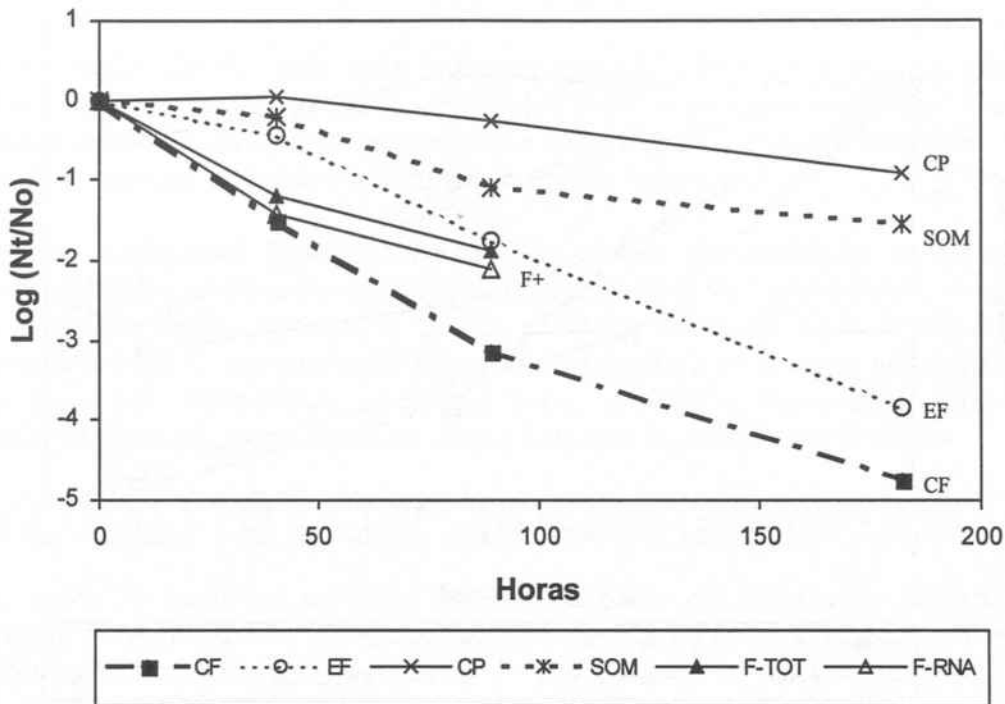
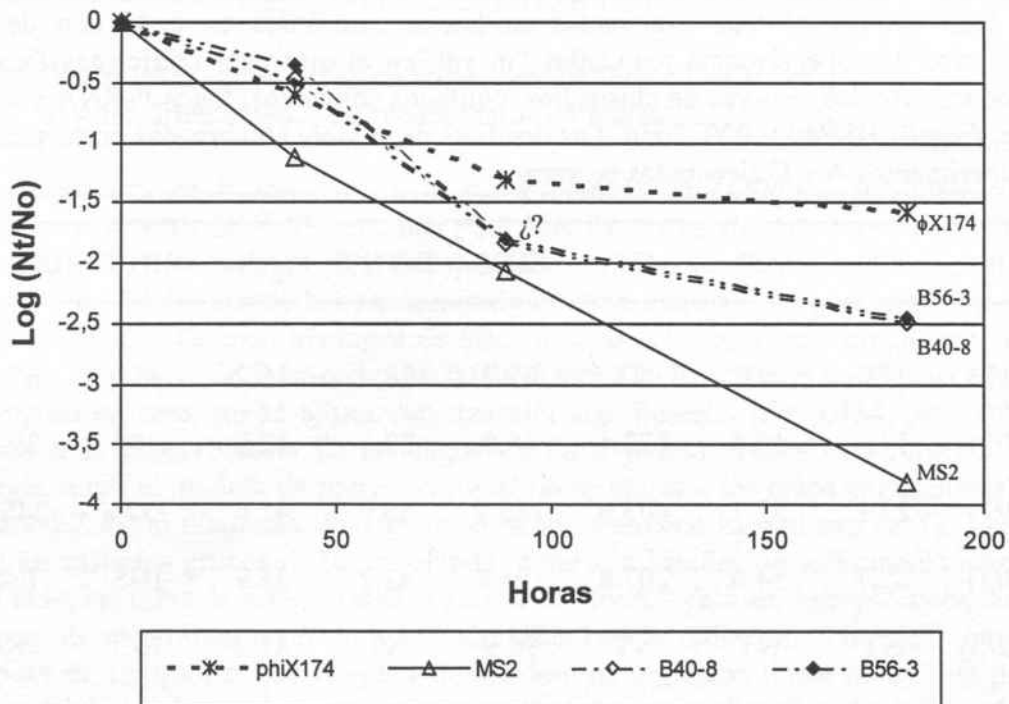


Figura 5.5. Supervivencia de bacteriófagos de laboratorio en agua de mar. Inactivación "in situ": Experimento D (del 22/3/99 al 30/3/99).



¿? Los valores de B40-8 y B56-3 en el tiempo 89 horas están infraestimados.

Figura 5.6. Supervivencia de bacterias fecales y bacteriófagos en agua de mar: Experimento E (del 27/7/99 al 30/7/99).

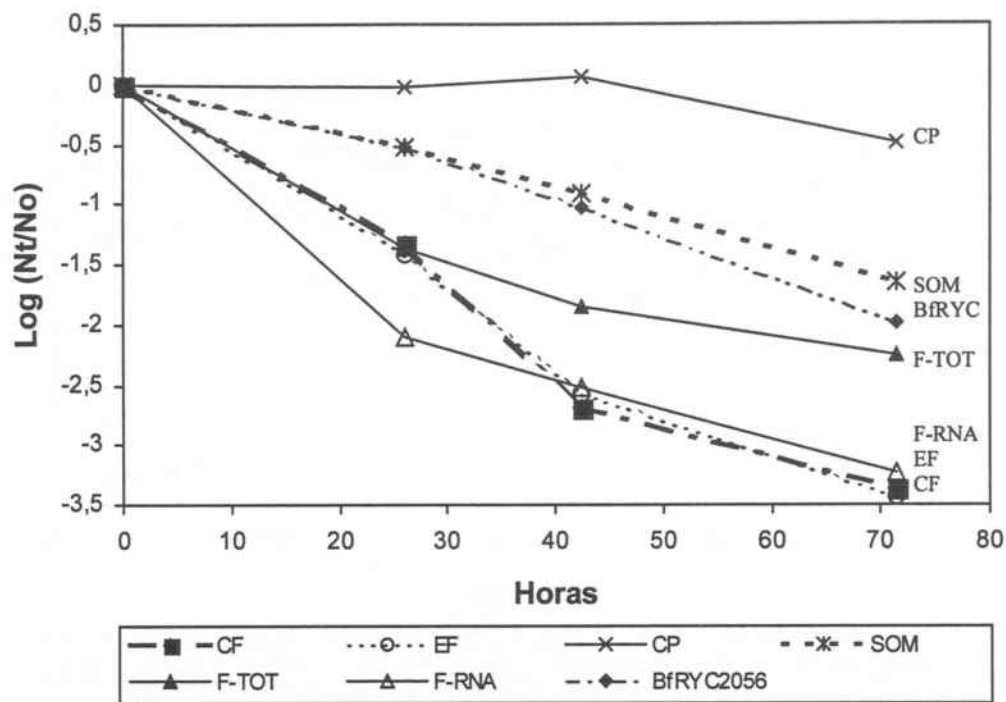


Tabla 5.6. Valores de T_{90} , expresados en horas, calculados en cada uno de los experimentos de supervivencia realizados “in situ” en el mar para coliformes fecales, estreptococos fecales, esporas de clostridios, colifagos somáticos, fagos F-RNA y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y RYC2056. Las dos filas de la tabla sombreadas corresponden a los experimentos A y E ejecutados en verano.

T ₉₀ (h)	CF	EF	CP	SOM	F-TOT	F-RNA	BfHSP	BfRYC
A (10/8)	NT	NT	NT	69.7	28.6	15.2	47.5	60.4
E (27/7)	17.6	17.5	173.4	45.0	23.1	12.9	NT	39.2
B (12/1)	22.1	52.7	403.6	146.9	50.9	41.4	237.8	248.9
C (22/3)	25.7	54.6	207.8	104.4	42.2	35.9	INS	INS
D* (22/3)	NT	NT	NT	94.9	NT	41.2	75.1	78.6

NT: Experimento no realizado.

INS: Datos insuficientes para calcular las T_{90} .

*Fagos de laboratorio: ϕ X174, MS2, B40-8 y B56-3.

La primera observación que salta a la vista, y que concuerda con las expectativas, es la elevada resistencia de las esporas de clostridios, que prácticamente permanecen inalterables durante el tiempo en que se llevan a cabo los experimentos (máximo 8 días).

Los resultados de T_{90} para cada indicador quedan subdivididos en dos grupos de valores: los de invierno y los de verano. En la Tabla 5.6 podemos comprobar que la tasa de inactivación en invierno es menor que en verano (y por tanto los valores de T_{90} son más altos) para las bacterias y bacteriófagos fecales valorados.

Bajo las condiciones experimentales en las que se han realizado los ensayos de supervivencia, la inactivación (considerada como pérdida de cultivabilidad) del 90 % de los coliformes fecales iniciales se alcanza alrededor de las 20 horas de exposición al ambiente marino. La resistencia de los microorganismos a los factores ambientales en el mar (salinidad, temperatura, radiación solar, predación, sustancias antivíricas,...) seguiría el siguiente orden creciente, empezando con los coliformes fecales:

$$\text{CF} < \text{F-RNA} < \text{EF} \approx \text{F-TOT} < \text{BfRYC2056} \approx \text{BfHSP40} < \text{SOM} < \text{CP}$$

Este orden se mantiene en todos los experimentos con excepción del ensayo B, realizado en enero del 99, donde los fagos de *Bact. fragilis* parecen resistir mejor que los colifagos somáticos.

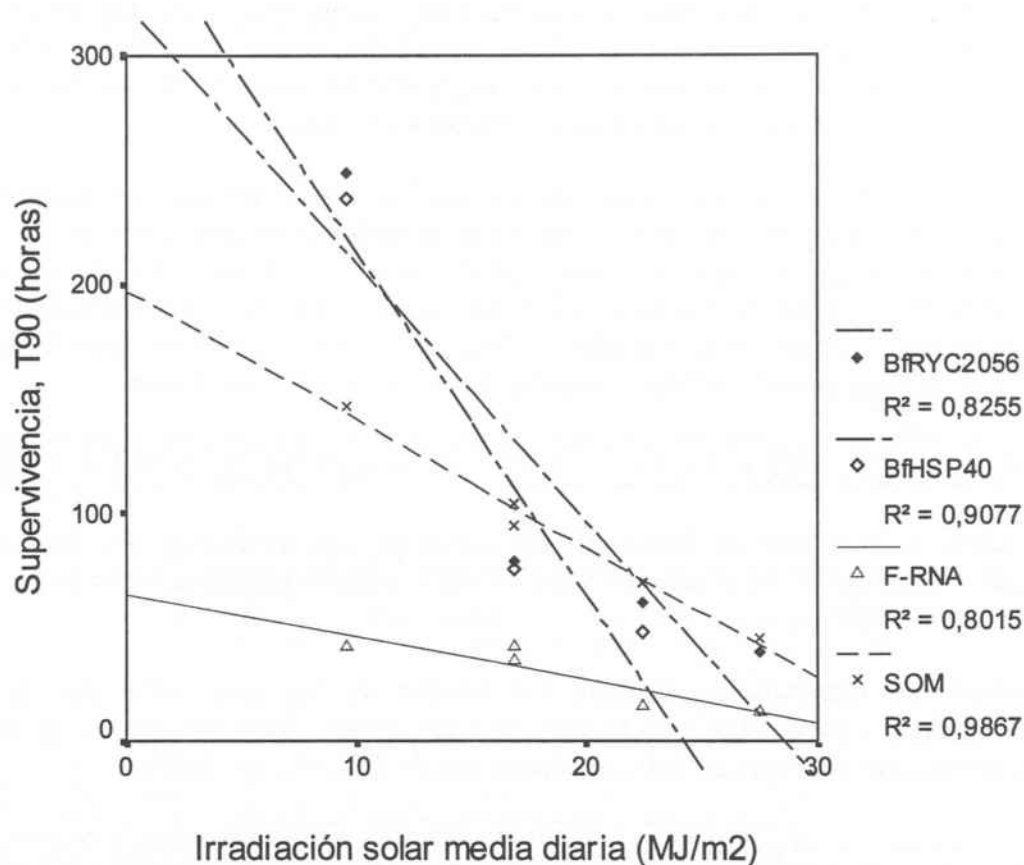
El análisis de regresión lineal entre los valores de T_{90} para cada uno de los microorganismos estudiados y la irradiación solar media diaria nos ofrece el mejor ajuste del modelo para los colifagos somáticos con $F = 222.35$ y $p = 0.001$:

$$T_{90}(\text{SOM}) = -5.638 (\text{I. solar}) + 197.162$$

- $T_{90}(\text{SOM})$: Valor de T_{90} , en horas, para colifagos somáticos.
- I. solar: Irradiación solar media diaria, en MJ/m^2 .

La correlación de Pearson entre la supervivencia de colifagos somáticos (T_{90}) e irradiación solar es de -0.993 con una $p = 0.000$. De forma similar, la persistencia de los fagos F-RNA y la energía solar se ajustan a un modelo de regresión lineal con $F = 12.116$ y $p = 0.040$, siendo la correlación de Pearson entre ambos parámetros de -0.895 y $p = 0.020$. Las T_{90} para los fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 se correlacionan con un valor de -0.909 (c. de Pearson) y $p = 0.046$ frente a la irradiación solar pero el modelo de regresión lineal no se ajusta con una alta significación ($F = 9.464$, $p = 0.091$). En cuanto a la supervivencia de los fagos de *Bact. fragilis* HSP40 en relación con la energía solar, el modelo de regresión lineal no se ajusta a los datos experimentales. La Figura 5.7 es un diagrama de dispersión donde aparecen los valores de T_{90} obtenidos para los distintos grupos de bacteriófagos frente a la irradiación solar media diaria. Por otro lado, las tasas de supervivencia (T_{90}) de coliformes fecales, estreptococos fecales y esporas de clostridios no parecen relacionadas con la radiación solar de forma lineal después de comprobar que el ajuste del modelo de regresión lineal no es significativo, como tampoco lo es la correlación de Pearson entre las T_{90} de los parámetros bacteriológicos y la energía solar.

Figura 5.7. Diagrama de dispersión y ajuste a una regresión lineal de los valores de T_{90} obtenidos en diferentes experimentos de supervivencia en agua de mar para grupos de bacteriófagos frente a la irradiación solar media diaria del mes en que se realizaron los ensayos.



Los datos de temperatura media del agua marina durante cada uno de los ensayos de supervivencia “in situ” se relacionan linealmente con los valores T_{90} obtenidos en el estudio de colifagos somáticos y de fagos F-RNA, siendo el mejor ajuste del modelo de regresión lineal para los fagos F-RNA:

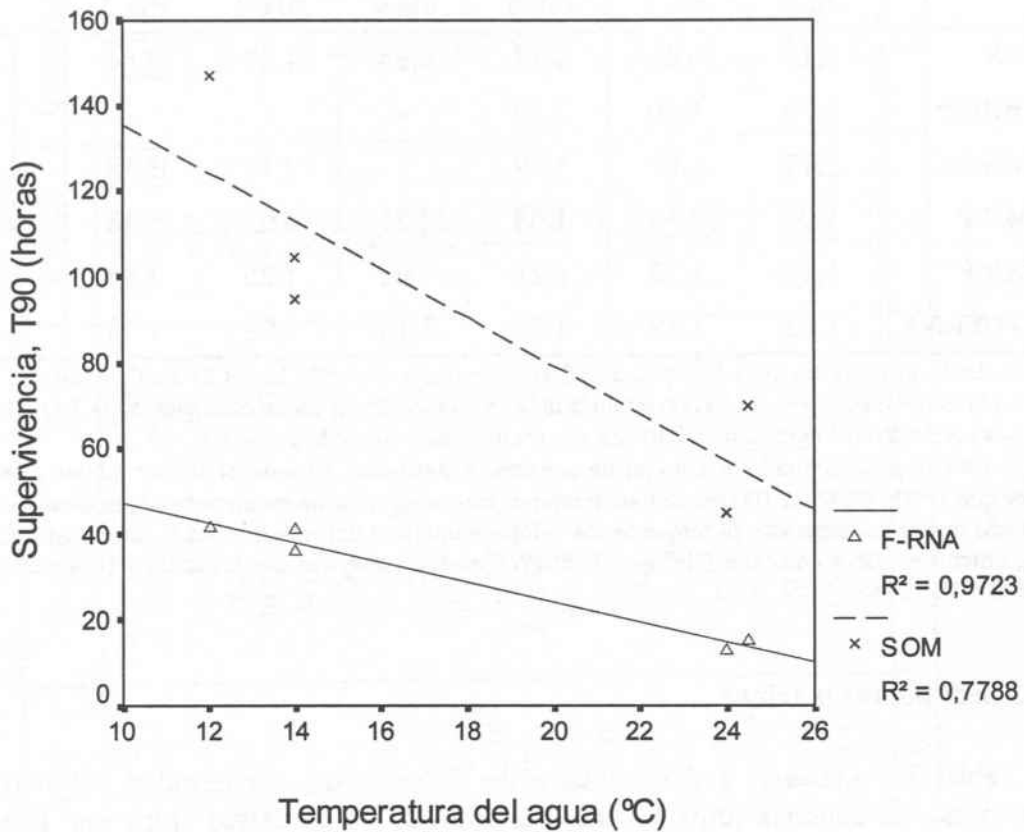
$$T_{90}(\text{F-RNA}) = -2.309 (T^a \text{ agua}) + 70.185 \quad F = 105.182; p = 0.002$$

- $T_{90}(\text{F-RNA})$: Valor de T_{90} , en horas, para fagos F-RNA.
- $T^a \text{ agua}$: Temperatura media del agua marina, en °C.

Sin embargo, los valores del parámetro de inactivación T_{90} calculados en los diferentes experimentos para el resto de microorganismos examinados no se correlacionan significativamente con la temperatura del agua.

La Figura 5.8 muestra las relaciones entre la temperatura del agua y la tasa de decaimiento T_{90} de colifagos somáticos y fagos F-RNA en el mar.

Figura 5.8. Diagrama de dispersión y ajuste a una regresión lineal de los valores de T_{90} obtenidos en diferentes experimentos de supervivencia en agua de mar para colifagos somáticos y fagos F-RNA frente a la temperatura media durante los ensayos.



Dada las diferentes cinéticas de inactivación de los microorganismos en agua de mar, podemos comprobar que las relaciones entre indicadores bacterianos y bacteriófagos no se mantienen constantes a lo largo del tiempo y estos cocientes podrían ser una herramienta útil para determinar si la contaminación de las aguas superficiales es reciente o no. La Tabla 5.7 muestra las relaciones CF/EF, CF/BfHSP40, CF/BfRYC2056, SOM/CF, SOM/EF y F-TOT/F-RNA encontradas el día 0 y el día 3 en los experimentos B, C y E junto a la columna que representa estos mismos cocientes en el agua residual. En los experimentos de supervivencia, el día 0 tenemos más de 54000 cfp/100 ml de coliformes fecales mientras que el día 3 sólo contamos 35 (experimento B), 40 (experimento C) y 317 (experimento E) colonias por 100 ml en las placas de mFC. Observamos que en el día 0, las relaciones numéricas obtenidas son comparables a las originadas en el agua residual, mientras que las relaciones el día 3 se acercan a las calculadas en playas marinas aptas para el baño. La diferencia más constante y evidente en todos los experimentos entre el día 0 y el día 3 es el aumento del cociente colifagos somáticos/coliformes fecales.

Tabla 5.7. Relaciones entre los niveles de bacterias fecales y bacteriófagos durante los experimentos de supervivencia en agua de mar "in situ". Comparación con los cocientes obtenidos en el agua residual.

	<u>Experimento B</u>		<u>Experimento C</u>		<u>Experimento E</u>		RESIDUAL
	día 0	día 3	día 0	día 4	día 0	día 3	
CF/EF	1,15	0,48	1,12	0,64	1,39	2,61	1.23
CF/BfHSP	3,70	1,00	2,79	-	-	-	1.95
CF/BfRYC	2,15	0,80	1,79	-	2,19	3,58	1.55
SOM/CF	1,02	2,85	1,08	2,52	0,91	1,48	0.94
SOM/EF	1,17	1,37	1,21	1,62	1,26	3,86	1.15
FTOT/FRNA	1.02	1.19	1.01	1.15	1.01	1.78	1.01

- B: del 12 al 18 de enero de 1999; C: del 22 al 30 de marzo de 1999; E: del 27 al 30 de julio de 1999.
- Cada término de una división corresponde al logaritmo del valor correspondiente en la Tabla 5.5.
- Los resultados del agua residual urbana son los que aparecen en la Tabla 5.3.
- $\boxed{x}$ La interpretación del cociente puede prestarse a confusión. Cuando el divisor de una relación es menor que 10 cfp ó pfp en 100 ml, al transformar el dato a $\log_{10}$ queda un número <1 ; esto conduce a un resultado mayor del esperado. Si tomamos los valores numéricos del experimento E, sin transformación a $\log_{10}$, obtenemos unos cocientes CF/EF y CF/BfRYC el día 3 menores que los del día 1 (sobretudo para CF/BfRYC).

5.3.3 Sedimentos marinos

La Tabla 5.8 presenta los resultados de 21 muestras expresados en partículas formadoras de colonias (cfp) o partículas formadoras de calvas (pfp) por 100 g de sedimento marino analizado. Los límites de detección de los distintos parámetros microbiológicos varían en función de los gramos de sedimento eluido, del volumen de la suspensión final conteniendo microorganismos que se ha titulado y de la posibilidad de repetición del análisis.

Sospechamos que en las muestras desde S2 a S6 inclusive del día 18/3/98 y en la muestra S2 del 1/6/99 hubo problemas de toxicidad del material constituyente en los sedimentos que afectó a la viabilidad de coliformes y estreptococos fecales; por dicho motivo, en estas 6 muestras las relaciones entre bacterias y bacteriófagos se alejan a las encontradas en las 15 muestras restantes. En los análisis estadísticos de este apartado las bacterias fecales de este grupo de muestras no han sido consideradas. La Figura 5.8 expone un resumen, en forma de diagramas de cajas, de los resultados positivos entre las 21 muestras objeto de análisis; los fagos F-RNA quedan representados como una constante, al tratarse de un único valor numérico.

Los valores de estreptococos fecales en sedimentos fueron superiores a los de coliformes fecales, salvo en 4 muestras donde los coliformes fecales sobrepasaron ligeramente o quedaron al mismo nivel que los estreptococos. Las esporas de clostridios se encontraron de forma consistente en todas las muestras analizadas en cantidades que oscilaron entre 10^4 y 10^6 cfp/100g. El número de colifagos somáticos superó al de coliformes fecales en uno o dos logaritmos en todas las muestras analizadas y también sobrepasó los valores obtenidos para estreptococos fecales, excepto en una muestra.

Tabla 5.8. Resultados de coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos fecales, esporas de clostridios, colifagos somáticos, fagos F-específicos totales, fagos F-RNA, fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 en sedimentos marinos.

Muestra	fecha	cfp / 100 g				pfp / 100 g				
		CT*	CF*	EF*	CP*	SOM	F+	F-RNA	BfHSP40	BfRYC2056
S1	18/03/98	1080	80	480	1.0x10 ⁵	2.4x10 ⁴	<14	<14	<7	NT
S2	18/03/98	40	40	<40	1.0x10 ⁶	>7.5x10 ⁴	1570	<18	206	NT
S3	18/03/98	<40	<40	<40	1.4x10 ⁵	>7.6x10 ⁴	13	<13	<6	NT
S4	18/03/98	<40	<40	<40	4.0x10 ⁴	NT	<52	<52	<52	NT
S5	18/03/98	<40	<40	<40	8.0x10 ⁴	2921	<13	<13	<6	NT
S6	18/03/98	<40	<40	160	8.8x10 ⁴	NT	<50	<50	<50	NT
BCN-A	18/03/98	1020	60	750	7800	6500	52	<13	6	NT
BCN-B	18/03/98	360	30	780	6000	5946	54	NT	<54	NT
BCN-D	18/03/98	570	<30	990	2.6x10 ⁴	3698	<52	<52	<52	NT
BCN-E	18/03/98	3780	120	1590	1.9x10 ⁴	8073	<52	<52	<52	NT
BCN-F	18/03/98	750	<30	1740	3.0x10 ⁴	1.5x10 ⁴	<48	<48	<48	NT
DERES	16/02/99	NT	3600	3600	NT	2.5x10 ⁴	<70	<70	42	42
DEMEJ	16/02/99	NT	180	600	NT	4480	<70	<70	NT	<42
GVO	25/05/99	2160	870	4050	8.4x10 ⁴	1497	<74	<74	<79	<79
GVS	25/05/99	540	420	150	3.9x10 ⁴	939	<123	<123	<141	<141
S1	01/06/99	780	630	240	3.6x10 ⁵	8.7x10 ⁴	<52.8	<52.8	<53	106
S2	01/06/99	-	-	-	5.4x10 ⁶	5.3x10 ⁶	1.2x10 ⁴	<61	1.0x10 ⁴	5.4x10 ⁴
S3	01/06/99	8.0x10 ⁶	1.1x10 ⁶	9.0x10 ⁵	3.3x10 ⁶	2.6x10 ⁷	6.6x10 ⁴	3494	4.9x10 ⁴	1.8x10 ⁵
S4	01/06/99	<30	<30	390	1.2x10 ⁵	3600	<46	<46	<46	<46
S5	01/06/99	30	30	210	7.2x10 ⁴	886	<111	<111	<44	<44
S6	01/06/99	30	<30	60	1.2x10 ⁵	1900	<111	<111	<44	<44
%positivos		71	57	81	100	100	29	5	25	40

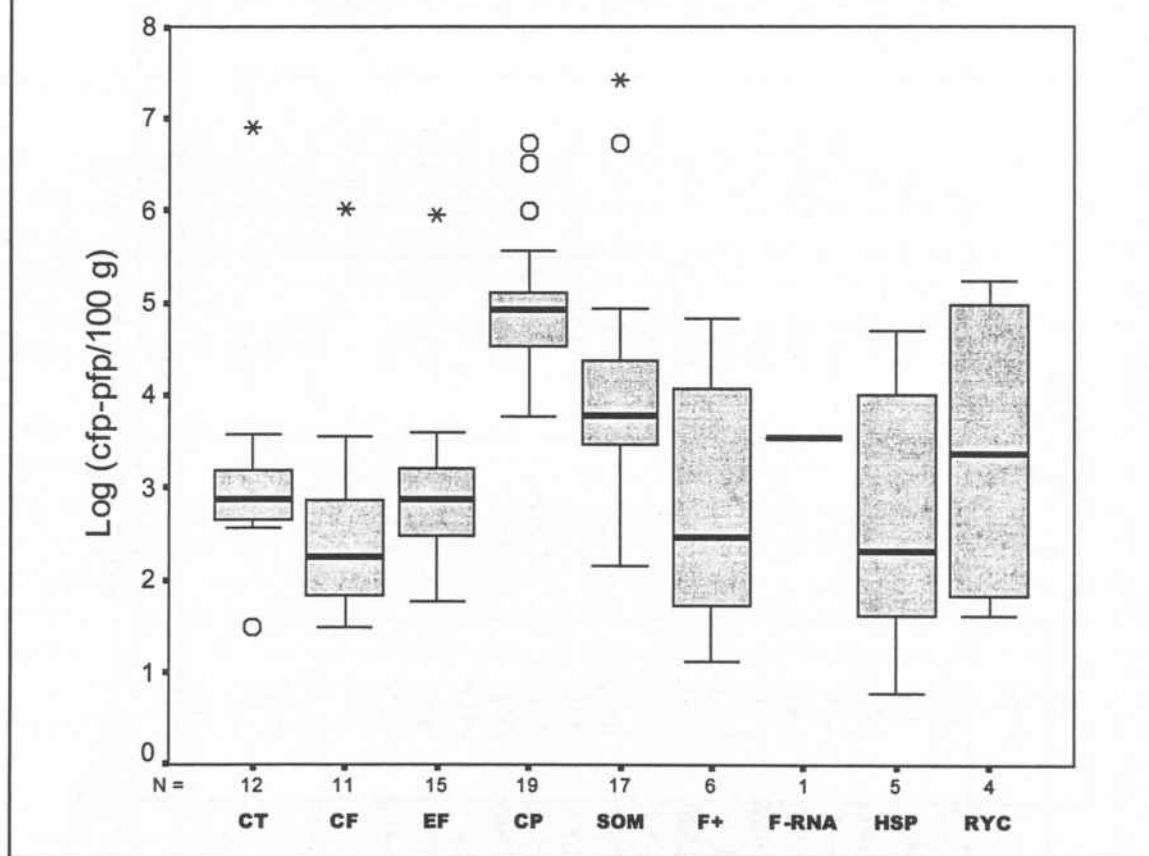
*La mayor parte de la bacteriología en sedimentos fue realizada por Jordi Dellundé.

NT: parámetro no analizado

Sin embargo, encontramos pocas muestras positivas para los grupos de bacteriófagos F-específicos y de *Bact. fragilis*. El 28.6 % de las muestras resultó positivo para fagos F-específicos totales pero el tratamiento con RNAsa sólo reveló una muestra positiva para fagos F-RNA representando este último grupo un 5.3 % del título de fagos obtenidos sobre *S. typhimurium* WG49. Se contabilizaron fagos de *Bact. fragilis* en 5 de 21 muestras sobre la cepa HSP40 y en 4 de 10 muestras analizadas sobre la cepa RYC2056. Las muestras positivas para fagos de *Bact. fragilis* HSP40 también lo fueron para fagos de *Bact. fragilis* RYC2056.

El bajo número de muestras positivas encontrado para fagos F-RNA en relación con el resto de grupos de bacteriófagos podría deberse, en parte, a un problema metodológico en la extracción de bacteriófagos a partir de sedimentos. J. Lasobras (1997) comprobó que el método glicina era poco eficiente en la elución de este grupo de fagos en el caso del lodo primario de una planta depuradora de agua residual urbana; es posible que el pH básico (10.5) afecte significativamente la viabilidad de los fagos F-RNA.

Figura 5.8. Representación gráfica de los niveles de coliformes (CT y CF), estreptococos fecales (EF), esporas de clostridios (CP), colifagos somáticos (SOM), fagos F-específicos (F+ y F-RNA) y fagos de *Bact. fragilis* (HSP y RYC) encontrados en 21 muestras de sedimentos marinos de la costa catalana.



Los datos obtenidos a partir de las diferentes muestras de sedimentos para cada uno de los parámetros microbiológicos analizados no siguen una distribución normal, tal y como lo confirman las pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

La transformación de los datos a logaritmos en base 10, sólo hace que las esporas de clostridios sigan una normal. Así, se aplicó la Rho de Spearman para detectar posibles correlaciones bivariadas entre variables microbiológicas. En realidad, este análisis sólo fue posible entre coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos fecales, esporas de clostridios y colifagos somáticos, porque para el resto de bacteriófagos los datos numéricos eran insuficientes. Se encontró una cierta correlación entre los coliformes totales y los datos de coliformes fecales, estreptococos y colifagos, y entre los coliformes fecales y las esporas de clostridios, pero en ningún caso se trataba de relaciones muy fuertes (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Correlaciones significativas ($p < 0.05$) entre los datos de variables microbiológicas obtenidos tras el examen de sedimentos marinos obtenidos mayoritariamente en la costa barcelonesa.

Rho de Spearman		CF	EF	CP	SOM
CT	Coefficiente de correlación	0.695	0.715		0.634
	Sig. (bilateral)	0.038	0.009		0.027
	N	9	12		12
CF	Coefficiente de correlación			0.703	
	Sig. (bilateral)			0.035	
	N			9	

El marcado dominio de las esporas de clostridios en sedimentos se hace evidente en las relaciones SOM/CP (valor promedio $\bar{x} = 0.82$; coeficiente de variación % $cv = 22.54$) menores a 1.27 que es la relación obtenida en el agua residual. También se calcularon las relaciones CF/EF, SOM/CT, SOM/CF, SOM/EF, SOM/BfHSP40 y SOM/BfRYC2056 para aquellas muestras en que fue posible, siendo cada valor de una división el logaritmo del dato correspondiente; la media de los cocientes obtenidos se presenta en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10. Relaciones entre coliformes fecales y estreptococos y entre colifagos somáticos y el resto de parámetros microbiológicos enumerados en sedimentos marinos. Comparación con el agua residual.

	CF/EF	SOM/CT	SOM/CF	SOM/EF	SOM/HSP	SOM/RYC
n	11	12	11	15	4	4
x	0.83	1.42	1.72	1.37	2.72	2.00
sd	0.24	0.39	0.51	0.29	1.54	0.68
cv (%)	28.32	27.34	29.41	20.92	56.73	33.97
max	1.21	2.22	2.56	2.08	4.90	2.71
min	0.51	0.94	1.07	0.87	1.58	1.41
residual	1.23	-	0.94	1.15	1.82	1.45

Cada término de una división corresponde al logaritmo en base 10 del valor correspondiente obtenido en cada una de las muestras analizadas.

n: número de cocientes calculados; x: valor promedio de todos los cocientes; sd: desviación estándar; cv (%): coeficiente de variación, en porcentaje; max: valor máximo; min: valor mínimo.

HSP: *Bact. fragilis* HSP40; RYC: *Bact. fragilis* RYC2056.

La Tabla 5.10 parece sugerir una prevalencia de los colifagos somáticos frente al resto de microorganismos indicadores en sedimentos; todas las relaciones donde los colifagos somáticos aparen en el numerador presentan un resultado superior al encontrado en las aguas residuales (Tabla 5.3). Aún así, hemos de ser cautos en la interpretación de dichos resultados, pues se ha de tener en cuenta el origen del aporte de micoorganismos contaminantes que reciben los sedimentos para poder decidir si ha habido una acumulación diferencial.

5.3.4. Enterovirus en agua de mar

En la Tabla 5.12 se presentan los resultados numéricos del análisis de enterovirus cultivables, bacterias fecales y bacteriófagos de bacterias entéricas en muestras marinas recogidas en la costa barcelonesa; la representación gráfica se muestra en las Figuras 5.10 y 5.11. Se trata de 10 muestras con cierto grado de contaminación de las cuales, sólo 3 cumplirían los requisitos de calidad de las aguas de baño, según la normativa europea 76/160/EEC. La Figura 5.9 representa en forma de diagrama de cajas la distribución de los datos positivos de la Tabla 5.12 transformados a logaritmos. La mediana de las pfp en 100 ml para colifagos somáticos se sitúa por encima de los valores de cfp en 100 ml cuantificados para coliformes, mientras que los estreptococos fecales continúan estando por debajo de los coliformes, tal y como sucede en las muestras de agua residual (Figura 5.1).

Figura 5.9. Resultados del análisis de enterovirus (ENT), coliformes (CT y CF), estreptococos fecales (EF), colifagos somáticos directos y concentrados (SOMd y SOMc), fagos F-específicos (F+ y F-RNA) y fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 (BfRYC) en muestras marinas relativamente polucionadas.

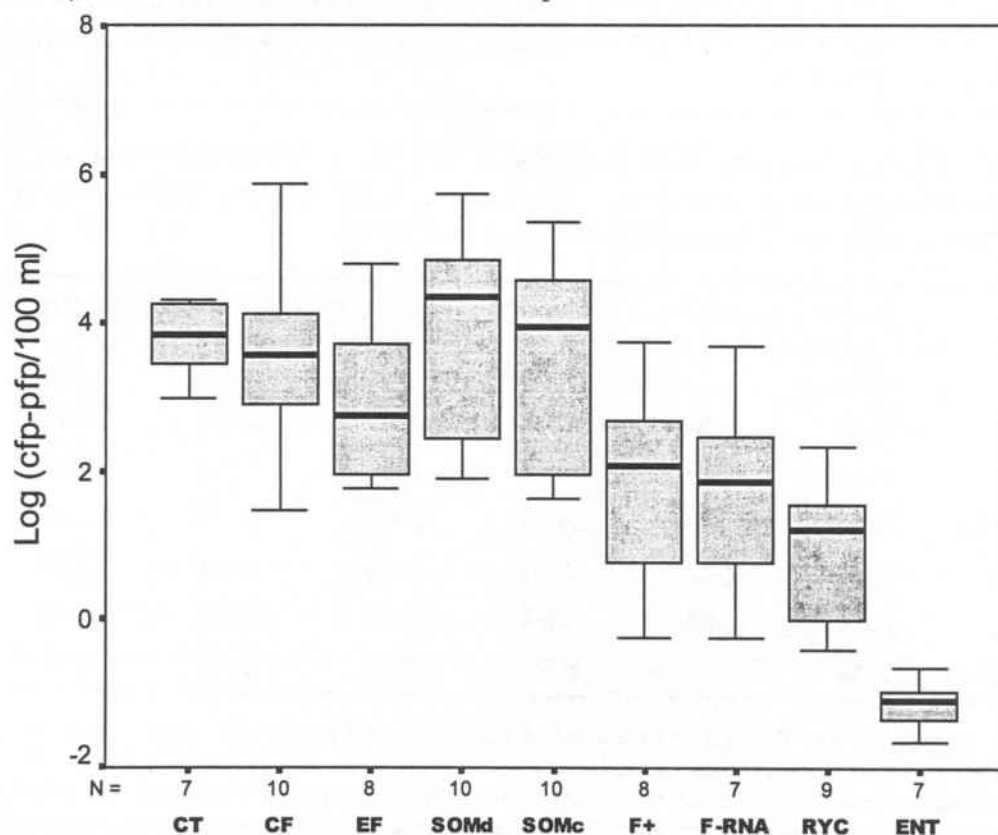


Tabla 5.12. Muestras de mar analizadas para coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos fecales, colifagos somáticos (directos y concentrados), fagos F-específicos totales, fagos F-RNA, fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 y enterovirus.

MUESTRA	cfp / 100 ml				pfp / 100 ml					
	CT	CF	EF	SOM (dir) ^a	SOM (con)	% rec	F+	F-RNA	BfRYC ^b	ENT
A 7/7/99	940	30	<10	80	44	54.38	<0.3	<0.3	<0.3	<0.01
B 7/7/99	3840	4900	NT ^c	3.7x10 ⁴	1.4x10 ⁴	37.94	54	<0.6	1 ^d	0.023
C 13/7/99	1.6x10 ⁴	7720	4300	3.5x10 ⁴	1.6x10 ⁴	44.26	183	85	32	0.128
D 13/7/99	6680	2400	1400	7.1x10 ⁴	3.9x10 ⁴	54.01	182	49	86	0.038
E 15/7/99	2x10 ⁴	1.3x10 ⁴	60	300	138	45.83	<0.5	<0.5	2	0.05
F 15/7/99	2x10 ⁴	2600	60	200	69	34.38	0.55	0.55	0.39	<0.028
G 15/7/99	1960	820	140	280	94	33.56	0.69	0.69	0.39	<0.028
H 20/7/99	NT	7.6x10 ⁵	6.1x10 ⁴	5.4x10 ⁵	2.3x10 ⁵	43.04	5500	4860	221	0.217
I 20/7/99	NT	4.9x10 ⁴	6500	1.3x10 ⁵	7.0x10 ⁴	56.03	1310	1080	36	0.084
J 20/07/99	NT	467	227	1.4x10 ⁴	5750	41.85	85	74	17	0.082
% positivos	100	100	90	100	100		80	70	90	70

Los bacteriófagos se concentraron por filtración de 100 ml para colifagos somáticos y 300 ml para los otros grupos de bacteriófagos.

Para la detección de enterovirus, las muestras (10-15 l) se concentraron por el método polvo de vidrio.

^a SOM (dir): colifagos somáticos analizados directamente sin concentrar (10 ml); SOM (con): colifagos somáticos cuantificados en el concentrado tras la filtración de 100 ml de muestra; % rec: porcentaje de recuperación del método de filtración utilizado para concentrar bacteriófagos, a partir de los datos "directo" y "concentrado" de colifagos somáticos.

^bBfRYC: A partir del día 13/7/99 las muestras concentradas fueron descontaminadas por filtración a través de unidades Millex GV 0.22 µm (Millipore, Corp.) para la enumeración de fagos de *Bact. fragilis* RYC2056.

^cNT: parámetro no analizado; estreptococos fecales no confirmados con bilis esculina: presuntiva 9500 cfp en 100 ml.

^dProblemas en la lectura de las calvas debido a la flora acompañante.

Tabla 5.13. Correlaciones bivariadas entre los logaritmos de parámetros microbiológicos, incluidos enterovirus cultivables, en muestras marinas con cierto grado de polución.

Correlaciones										
	CT	CF	EF	SOMd	SOMc	F+	F-RNA	RYC	ENT	
CT	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N									
CF	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,838* ,019 7								
EF	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	-,049 ,937 5	,757* ,030 8							
SOMd	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,232 ,617 7	,683* ,029 10	,926** ,001 8						
SOMc	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,217 ,640 7	,671* ,034 10	,918** ,001 8	,999** ,000 10					
F+	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,141 ,821 5	,724* ,042 8	,916** ,004 7	,982** ,000 8	,983** ,000 8				
F-RNA	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,268 ,732 4	,762* ,047 7	,914** ,004 7	,967** ,000 7	,963** ,001 7	,990** ,000 7			
RYC	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,220 ,675 6	,541 ,133 9	,861** ,006 8	,854** ,003 9	,867** ,002 9	,907** ,002 8	,922** ,003 7		
ENT	Correlación de Pearson Sig. (bilateral) N	,772 ,228 4	,572 ,179 7	,734 ,096 6	,403 ,370 7	,403 ,370 7	,732 ,098 6	,702 ,186 5	,716 ,070 7	

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).
**. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Figura 5.10. Niveles de coliformes fecales, estreptococos fecales y colifagos somáticos en las muestras marinas analizadas en julio de 1999 (A-J).

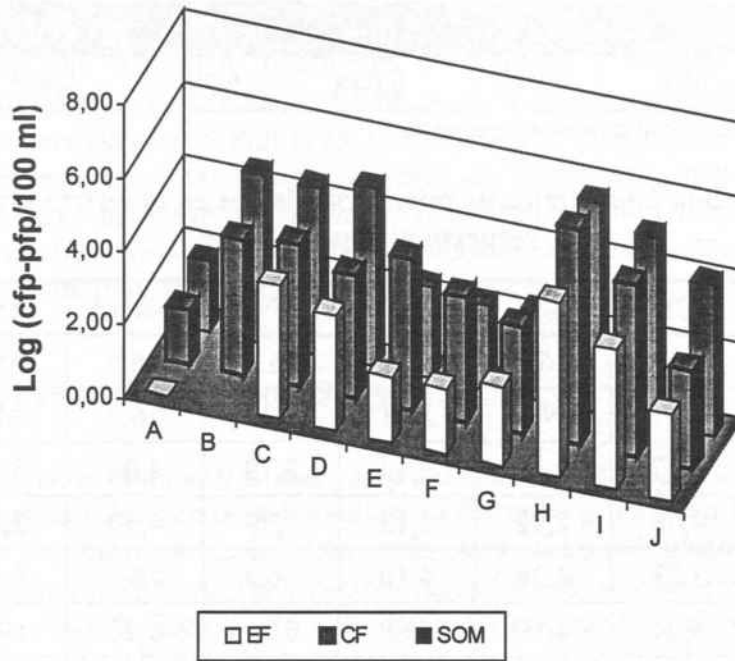


Figura 5.11. Niveles de fagos F-específicos totales y F-RNA, fagos de *Bact. fragilis* y enterovirus en las muestras marinas analizadas en julio de 1999 (A-J).

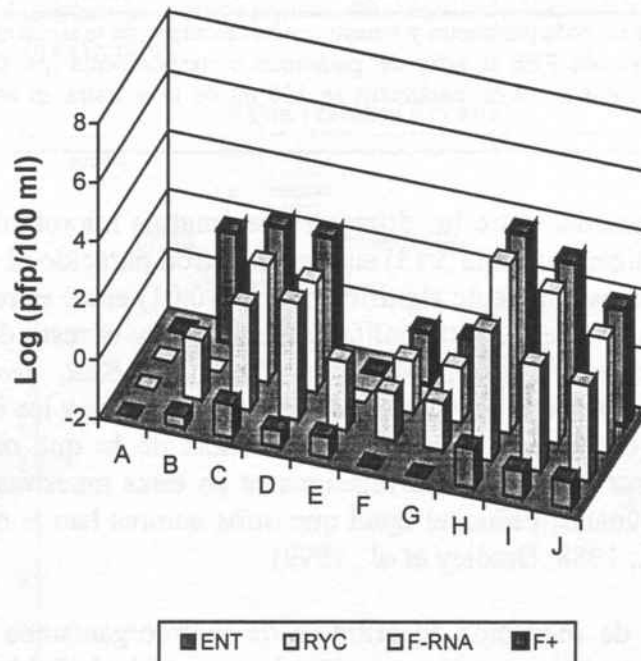


Tabla 5.14. Niveles de bacterias indicadoras, bacteriófagos fecales y enterovirus en agua residual urbana y reducción logarítmica sufrida por dichos microorganismos en muestras marinas respecto al agua residual.

Agua residual, log (cfp ó pfp/100 ml)

CF	EF	SOM	F+	F-RNA	RYC2056	ENT
7,458	6,068	6,978	6,048	5,993	4,816	1,432

Datos de la Tabla 5.1 transformados a logaritmos.

**Reducción logarítmica de microorganismos en muestras marinas
respecto al agua residual**

	SOM/CF	CF	EF	SOM	F+	F-RNA	RYC	ENT
A	1,29	5,98	>6,1	5,08	>6,6	>6,5	>5,3	>3,4
B	1,24	3,77	NT	2,41	4,32	>6,2	<4,8	3,07
C	1,17	3,57	2,43	2,43	3,79	4,06	3,31	2,32
D	1,44	4,08	2,92	2,13	3,79	4,30	2,88	2,85
E	0,60	3,33	4,29	4,50	>6,3	>6,3	4,52	2,73
F	0,67	4,04	4,29	4,68	6,31	6,25	5,23	>3
G	0,84	4,54	3,92	4,53	6,21	6,15	5,23	>3
H	0,97	1,58	1,28	1,25	2,31	2,31	2,47	2,10
I	1,09	2,77	2,25	1,88	2,93	2,96	3,26	2,51
J	1,55	4,79	3,71	2,84	4,12	4,12	3,59	2,52
x	1,09	3,84	>3,47	3,17	>4,67	>4,92	4,06	>2,75

La reducción logarítmica para cada parámetro y muestra se ha calculado de la siguiente forma:

LOG(RES)-LOG(MAR), siendo RES el valor del parámetro correspondiente (pe. CF) en 100 ml en el agua residual y MAR el valor de dicho parámetro en 100 ml de la muestra en estudio (pe. CF en la muestra A).

Las correlaciones bivariadas entre los diferentes parámetros microbiológicos en las 10 muestras marinas analizadas (Tabla 5.13) siguen un patrón parecido al del agua residual (Tabla 5.2): correlaciones altamente significativas ($p < 0.01$) entre estreptococos fecales y los diferentes grupos de fagos, entre colifagos somáticos y el resto de bacteriófagos e incluso entre los fagos F-específicos y los fagos de *Bact. fragilis* RYC2056; correlaciones significativas al nivel 0.05 entre coliformes fecales y los bacteriófagos con excepción de los fagos de *Bact. fragilis*. A diferencia de lo que ocurre en el agua residual, los enterovirus no parecen correlacionarse en estas muestras con ninguno de los microorganismos cuantificados, al igual que otros autores han constatado en aguas marinas (Tartera *et al.*, 1988; Bradley *et al.*, 1999).

De nuevo, los datos de reducción logarítmica de microorganismos en las muestras marinas consideradas en este apartado respecto al agua residual (Tabla 5.14), reafirman los resultados obtenidos a lo largo de todo el trabajo experimental: el grupo de

bacteriófagos más afectado negativamente en el agua marina es el de los fagos F-específicos de RNA.

Efectivamente, en la Tabla 5.14 puede comprobarse que el 80 % de las muestras analizadas tiene a los fagos F-específicos como los microorganismos que sufren la mayor reducción logarítmica tomando como referencia el agua residual. También se observa que los fagos de *Bact. fragilis* aguantan mejor en el ambiente marino que los fagos F-específicos y que, sin duda, el grupo de colifagos somáticos es el que más resiste presentando una reducción logarítmica comparable, o incluso inferior, a la contemplada para enterovirus cultivables. No obstante las observaciones anteriores, las muestras E, F y G (recogidas en el Prat el 15/7/99) presentan unos niveles de coliformes fecales particularmente altos en relación al resto de parámetros microbiológicos y sospechamos que hubo un aporte de coliformes procedente de otra fuente diferente al agua residual urbana (pe. aves). En casi todas las muestras analizadas, los estreptococos fecales se presentan como los indicadores bacterianos que sufren menor aminoración.

5.3.5 Ecología de bacteriófagos. Valoración global.

Hemos recopilado datos de muestras marinas y fluviales analizadas a lo largo de este trabajo de cuatro años y las hemos subdividido en distintos grupos, en función de los niveles de *E. coli* o coliformes fecales. Los parámetros microbiológicos analizados en dichas muestras (bacterias indicadoras y bacteriófagos fecales) quedan representados en diagramas de cajas desde la Figura 5.12 a la Figura 5.14 donde los valores 0 obtenidos en la muestra directa sin concentrar han sido sustituidos por 1 y los valores 0 después de concentrar la muestra se han sustituido por 0.05 para el cálculo de los logaritmos (un valor 0 significa que el parámetro analizado en la muestra de agua no ha sido detectado). En la Figura 5.15 pueden contrastarse los resultados de las 95 muestras de agua marina y 21 sedimentos marinos, donde sólo se han incorporado los resultados positivos y no se han contabilizado resultados negativos. A continuación recordamos gráficamente los resultados del agua residual urbana, representados previamente en la Figura 5.1, para facilitar la comparación de resultados en diferentes categorías y calidades de aguas superficiales.

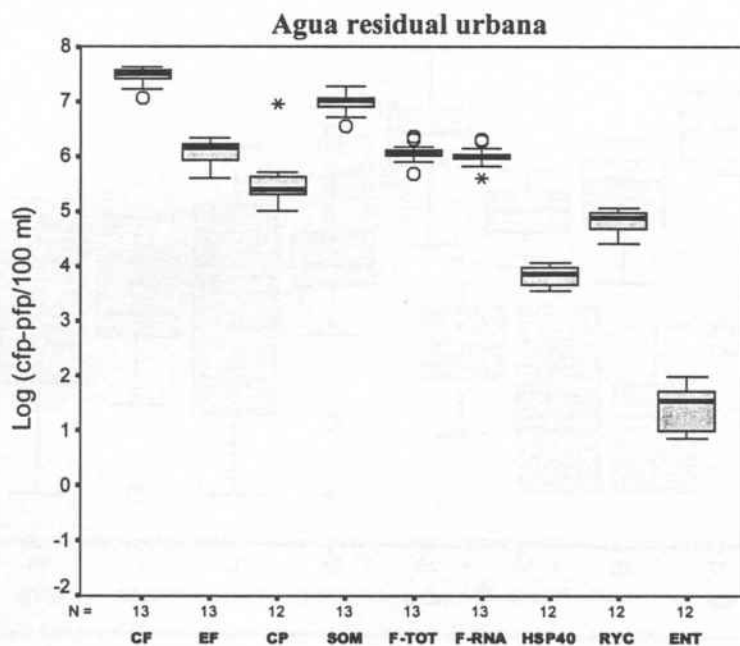


Figura 5.12. Representación en diagramas de cajas de los valores de bacterias indicadoras (CF, EF), esporas de clostridios (CP) y bacteriófagos fecales (SOM, F-TOT, F-RNA, HSP y RYC) obtenidos en muestras polucionadas de río y mar.

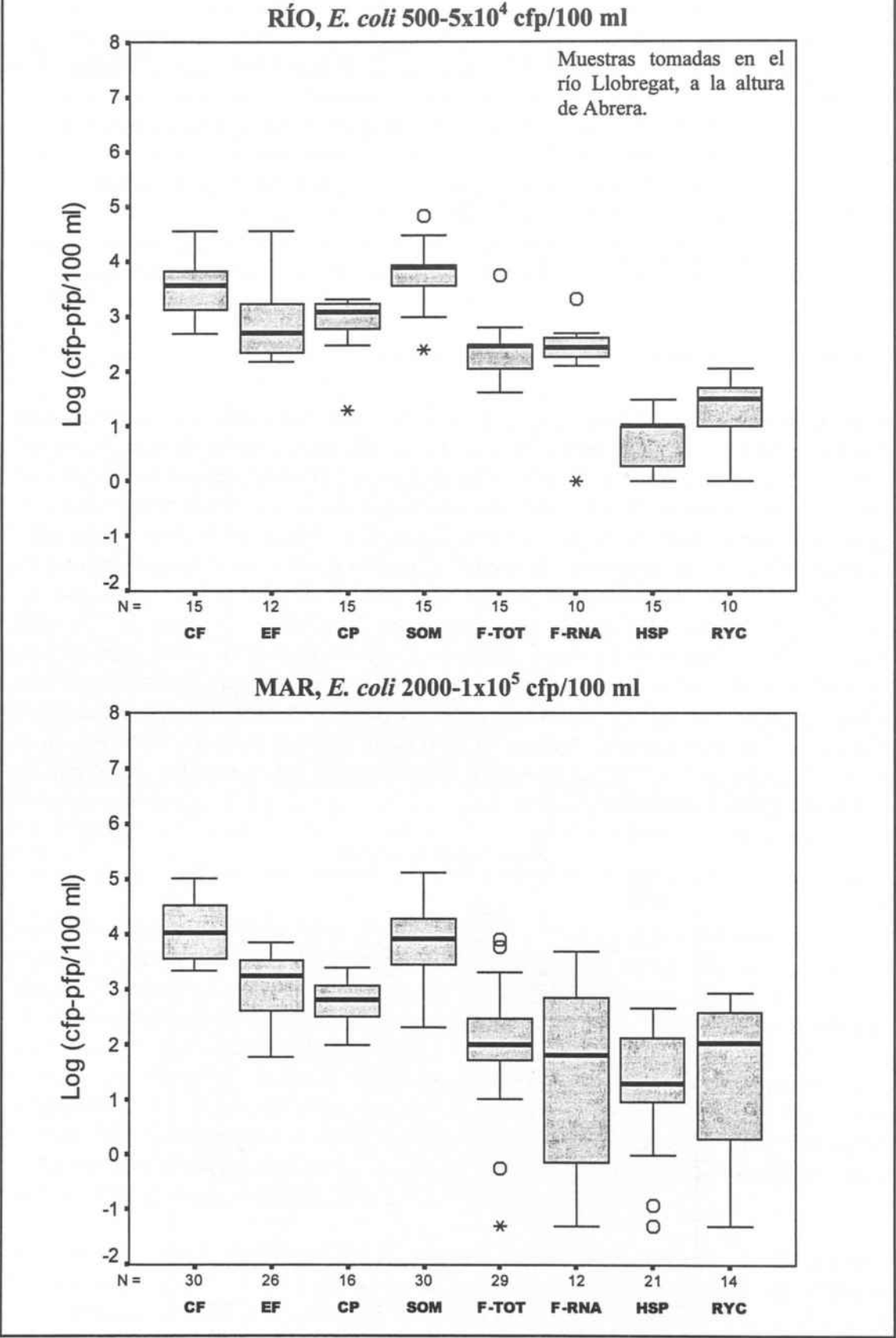
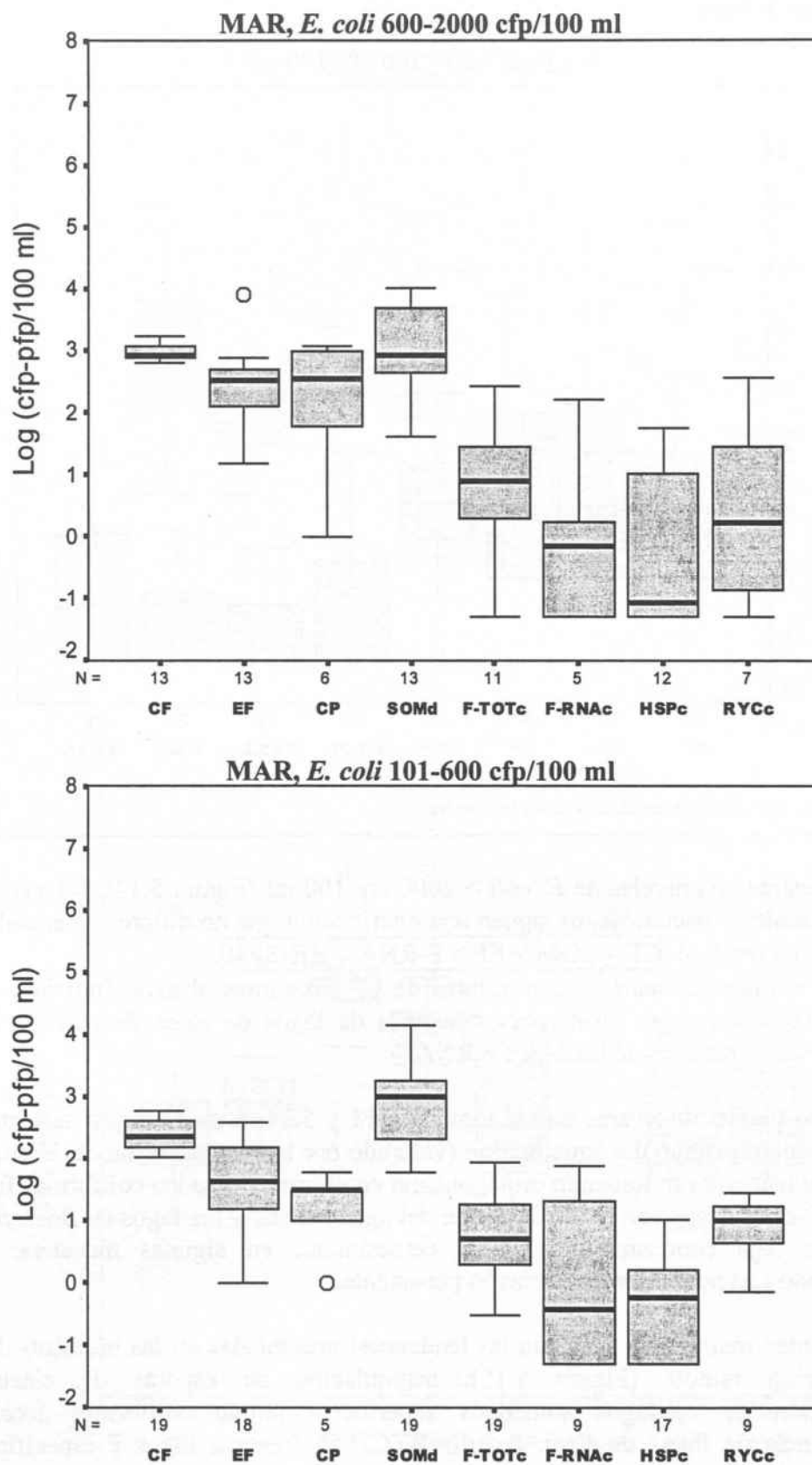
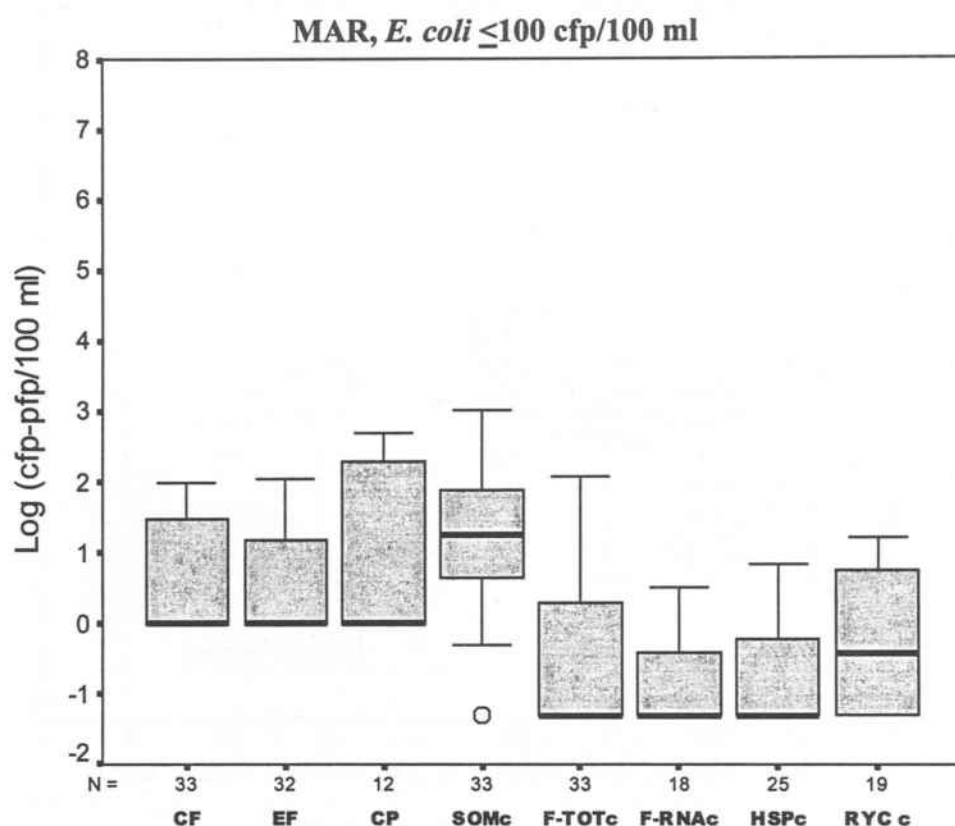


Figura 5.13. Niveles de bacterias indicadoras (CF,EF), esporas de clostridios (CP) y bacteriófagos fecales (SOM, F-TOT, F-RNA, HSP, RYC) obtenidos en muestras marinas que cumplen el valor imperativo para aguas de baño.



d: fagos detectados en la muestra directa; c: fagos cuantificados después de concentrar la muestra.

Figura 5.14. Representación en diagramas de cajas de los valores de bacterias indicadoras (CF,EF), esporas de clostridios (CP) y bacteriófagos fecales (SOM, F-TOT, F-RNA, HSP, RYC) obtenidos en muestras marinas que cumplen el valor guía para aguas de baño.



c: fagos cuantificados después de concentrar la muestra.

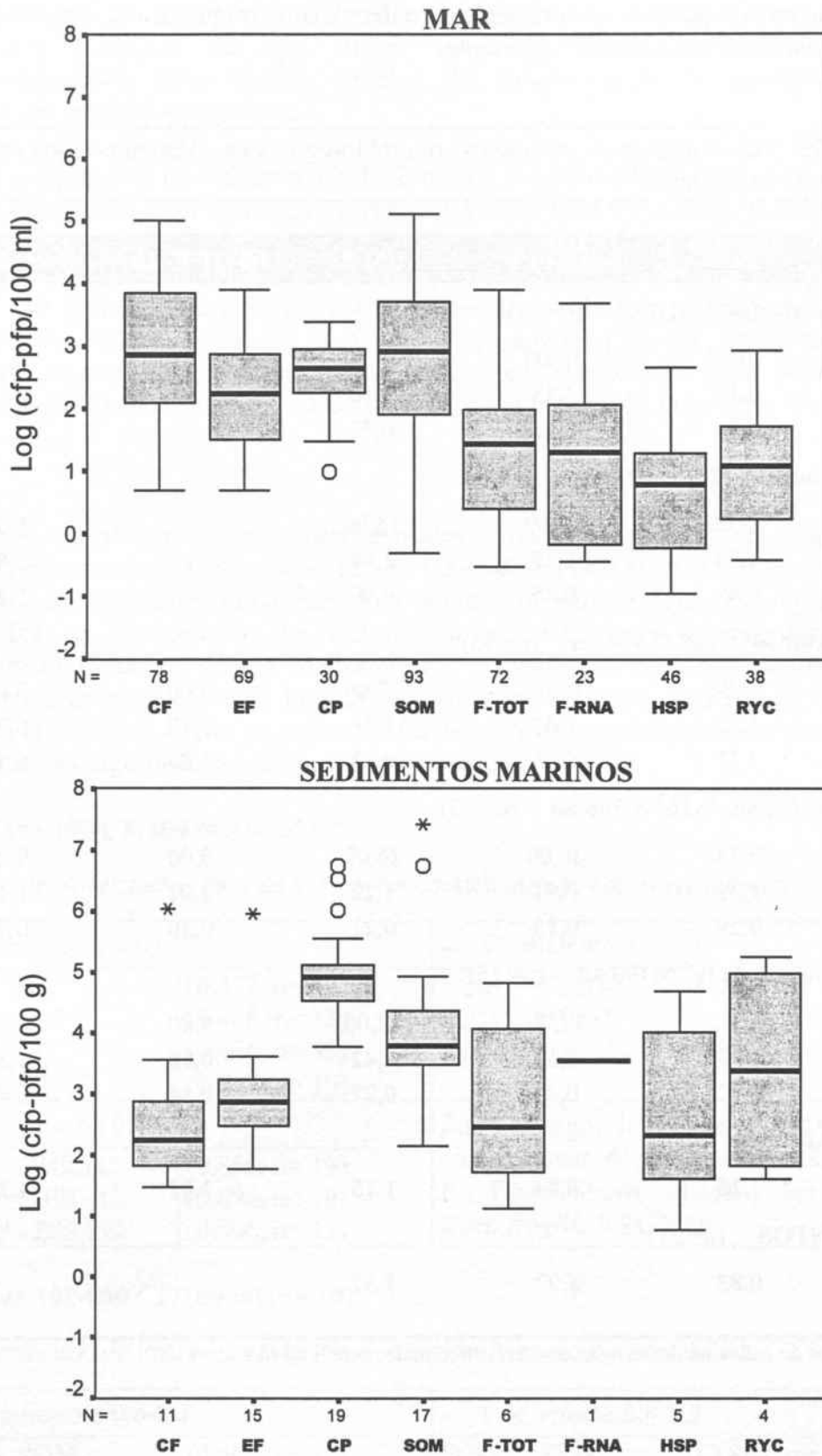
En las muestras con niveles de *E. coli* > 2000 cfp/100 ml (Figura 5.12), los valores de bacterias fecales y bacteriófagos siguen una distribución que no difiere sustancialmente de la del agua residual: $CF \geq SOM > EF > F-RNA > BfHSP40$.

Además, las muestras marinas con valores de CF superiores al nivel imperativo para aguas de baño presentan unas concentraciones de fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 iguales o superiores a las de los fagos F-RNA.

Tal y como puede observarse en las Figuras 5.13 y 5.14, a medida que disminuye el grado de contaminación del agua marina (valorado por la concentración de *E. coli*), los colifagos somáticos van tomando protagonismo en detrimento de los coliformes fecales, los fagos F-específicos van desapareciendo del agua marina y los fagos de *Bact. fragilis* aunque en baja concentración, siguen detectándose en algunas muestras, como reconociendo una posible contaminación persistente.

En sedimentos marinos se acentúan las tendencias presentadas en las muestras de mar con polución remota (Figura 5.15): acumulación de esporas de clostridios, concentración de colifagos somáticos superior a la de coliformes fecales y predominancia de fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 frente a fagos F-específicos de RNA.

Figura 5.15. Valores de bacterias indicadoras (CF, EF), esporas de clostridios (CP) y bacteriófagos fecales (SOM, F-TOT, F-RNA, HSP, RYC) obtenidos en 95 muestras de mar y 21 muestras de sedimentos de la costa del Área Metropolitana de Barcelona.



Al considerar las concentraciones globales de microorganismos indicadores en muestras marinas de la columna de agua y de sedimentos (Figura 5.15), se observa que la mediana para bacteriófagos es como mínimo un logaritmo superior en sedimentos que en agua (excepto para los fagos F-RNA). Los EF también se encuentran en concentraciones superiores en sedimentos, a diferencia de lo que ocurre con los CF que parecen sobrevivir peor en dicho ambiente.

Tabla 5.15. Relaciones entre parámetros microbiológicos en diferentes tipos de aguas de diferentes calidades.

	CF/EF	SOM/CF	SOM/EF	FTOT/F-RNA	F-RNA/RYC
MAR, <i>E. coli</i> ≤100 N/100 ml (n= 33)					
n	10,00	15,00	13,00		
x	1,19	1,23	1,26		
sd	0,31	0,51	0,70		
MAR, <i>E. coli</i> 101-600 N/100 ml (n= 19)					
n	15,00	19,00	15,00		5,00
x	1,39	1,20	1,69		1,89
sd	0,40	0,25	0,49		1,20
MAR, <i>E. coli</i> 601-2000 N/100 ml (n= 13)					
n	13,00	13,00	13,00	3,00	3,00
x	1,39	1,03	1,34	2,17	0,75
sd	0,57	0,25	0,32	1,94	0,32
MAR, <i>E. coli</i> 2000-1x10⁵ N/100 ml (n= 30)					
n	26,00	30,00	26,00	9,00	9,00
x	1,39	0,97	1,28	1,02	1,12
sd	0,29	0,18	0,21	0,30	0,43
RÍO, <i>E. coli</i> 500-5x10⁴ N/100 ml (n= 15)					
n	12,00	15,00	12,00	9,00	8,00
x	1,25	1,11	1,42	0,96	1,83
sd	0,22	0,20	0,27	0,14	0,40
RESIDUAL (n= 13)					
x	1.23	0.94	1.15	1.01	1.24
SEDIMENTOS (n= 21)					
x	0.83	1.72	1.37		

Los términos de cada una de las relaciones se han tomado como logaritmos.

La Tabla 5.15 resume algunas de las relaciones entre parámetros microbiológicos que pueden establecerse dentro de cada grupo de calidad de muestras analizadas. Los datos individuales se transformaron a logaritmo y después se calcularon distintas combinaciones de cocientes entre bacterias, entre bacteriófagos y entre bacterias y bacteriófagos. Se han seleccionado sólo los grupos de muestras y cocientes con relaciones positivas, ya que, dada las bajas concentraciones de algunos microorganismos en el medio acuático, la transformación a logaritmos brinda numerosos resultados negativos.

Puede comprobarse que la razón SOM/CF es la que ofrece información sobre la calidad y tipo de muestra: en el agua residual la relación es de 0.94 y a medida que disminuye la contaminación del agua superficial, el cociente aumenta. También se observa que en muestras marinas con menos polución, la proporción de fagos F-RNA respecto a los fagos que denominamos F-específicos totales (total de fagos detectados sobre *S. typhimurium* WG49) disminuye (F-TOT/F-RNA aumenta), lo que significaría que en muestras con contaminación persistente se detectan fagos somáticos de *Salmonella* (o menos probablemente fagos F-específicos de DNA) con más frecuencia que fagos F-RNA.

Los datos de bacterias y fagos pertenecientes a muestras agrupadas en función de la calidad microbiológica, tal y como se han estudiado en este apartado, fueron sometidos a análisis de correlaciones bivariadas (los valores 0 directos se sustituyeron por 1 y los 0 obtenidos en concentrados se sustituyeron por 0.05 para su transformación a logaritmos). Cuando los datos se ajustaban a una distribución normal, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson y cuando los datos no seguían una normal, se calculó el coeficiente Rho de Spearman (estadística no paramétrica). Los resultados de correlaciones significativas se presentan a continuación.

□ Mar <100 CF/100 ml (n= 33)

La Rho de Spearman señala los siguientes coeficientes de correlación con $p < 0.01$:

• Coeficiente < 0.6		• Coeficiente 0.7-0.8	
CF - EF	(0.477, n= 32)	SOM - FTOT	(0.791, n= 33)
CF - SOM	(0.486, n= 33)	SOM - BfHSP	(0.743, n= 25)
CF - FTOT	(0.464, n= 33)	FTOT - BfHSP	(0.723, n= 25)
CF - BfRYC	(0.597, n= 19)		
• Coeficiente 0.8-0.9		Sin embargo, los fagos F-RNA sólo se correlacionan débilmente al nivel 0.05 con los F-específicos totales y los fagos de <i>Bact. fragilis</i> RYC2056.	
SOM - BfRYC	(0.856, n= 19)		
FTOT - BfRYC	(0.896, n= 19)		
BfHSP - BfRYC	(0.906, n= 11)		

□ Mar 101-600 CF/100 ml (n= 19)

La correlación de Pearson señala relaciones significativas al nivel 0.01:

• Coeficiente 0.6-0.7		• Coeficiente 0.8-0.9	
CF - SOM	(0.602, n= 19)	SOM - FTOT	(0.868, n= 19)
SOM- BfHSP	(0.690, n= 17)		

❑ **Mar 600-2000 CF/100 ml (n= 13)**

La correlación de Pearson señala relaciones significativas al nivel 0.01:

• Coeficiente 0.7-0.8		• Coeficiente 0.8-1.0	
FTOT - BfHSP	(0.772, n= 10)	CP - SOM	(0.925, n= 6)
		SOM - FTOT	(0.853, n= 11)
		BfHSP- BfRYC	(0.983, n= 6)

Los fagos F-RNA en estas muestras no se correlacionan con ningún parámetro estudiado, como tampoco lo hacen los CF y los EF.

❑ **Mar 2000-1x10⁵ CF/100 ml (n= 30)**

La correlación de Pearson señala relaciones significativas al nivel 0.01:

• Coeficiente < 0.6		• Coeficiente 0.6-0.7	
CF - FTOT	(0.504, n= 29)	CF - EF	(0.628, n= 26)
FTOT- BfHSP	(0.588, n= 20)	FTOT- BfRYC	(0.684, n= 13)
• Coeficiente 0.7-0.8		• Coeficiente 0.8-1.0	
EF - SOM	(0.724, n= 26)	EF - FRNA	(0.939, n= 11)
EF - FTOT	(0.784, n= 25)	SOM - FTOT	(0.846, n= 29)
SOM - BfHSP	(0.766, n= 21)	BfHSP- BfRYC	(0.859, n= 8)
FTOT- FRNA	(0.775, n= 12)		
FRNA- BfRYC	(0.794, n= 12)		

❑ **Río (punto de Abrera) 500-2000 CF/100 ml (n= 5)**

Sólo se presenta una alta correlación entre F-TOT y F-RNA.

❑ **Río (punto de Abrera) 2000-3.5x10⁴ CF/100 ml (n= 10)**

No hay correlaciones significativas.

5.4 DISCUSIÓN

5.4.1 INTRODUCCIÓN-RESUMEN

En la introducción de esta memoria ya hemos comentado que las descargas de agua residual sin tratar y/o tratadas, tanto en aguas superficiales continentales como en ambientes marinos y estuarios, representan un riesgo sanitario frente a posibles microorganismos patógenos que pueden llegar al hombre a través del consumo de agua y marisco o con la utilización del agua para fines recreativos (Lucena *et al.*, 1994). Numerosos brotes de origen hídrico han sido atribuidos a la presencia de virus entéricos (enterovirus, rotavirus, astrovirus, calicivirus, virus de la Hepatitis A, virus de Norwalk y otros virus redondos pequeños) y protozoos parásitos (*Giardia* y *Cryptosporidium*) que han sorteado las barreras físicas y químicas impuestas para la producción de agua potable en los países desarrollados (Ribas, 1991; West, 1991; Gerba *et al.*, 1996; Levy *et al.*, 1998). De forma análoga, se han asociado diversos brotes víricos a la ingesta de marisco crudo o poco cocinado (Wanke and Guerrant, 1990; Desenclos *et al.*, 1991). Dado que los organismos filtradores se alimentan por concentración de material particulado del agua cercana, mejillones, ostras y almejas pueden actuar como vectores de patógenos si las aguas de cría están contaminadas (Goyal *et al.*, 1979). También se dispone de una evidencia considerable de enfermedad asociada con el uso recreativo de las aguas superficiales (Palmateer *et al.*, 1991; Von Schirnding *et al.*, 1992; Fewtrell *et al.*, 1992; Fleisher *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998; WHO, 1998).

En el presente trabajo, nuestra atención ha sido centrada básicamente en el estudio de aguas marinas. Las aguas utilizadas para la acuicultura y propósitos recreativos son controladas microbiológicamente utilizando sistemas indicadores bacterianos (Figueras *et al.*, 1997; Godfree *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 1999). Bajo la legislación europea actual (Directiva para aguas de marisco 79/923/CE; Directiva para aguas de baño 76/160/CE) los grupos de coliformes totales y fecales son adoptados como indicadores de la posible presencia de patógenos humanos en aguas contaminadas con agua residual. La posesión de aguas de baño de excelente calidad representa para los países europeos un motor importante de atracción turística. La Campaña de la Bandera Azul -una iniciativa de la organización no gubernamental Fundación para la Educación Ambiental en Europa (FEEE)- otorga estos galardones en reconocimiento internacional a las playas de los municipios que presentan su candidatura. Los criterios de otorgamiento tienen en cuenta factores muy diversos, como, por ejemplo: agua de calidad microbiológica excelente, cumplimiento de la legislación ambiental y de la ley de costas, vigilancia y primeros auxilios, servicios para el usuario (papeleras, duchas, lavabos, teléfonos, etc.), actividades de educación y difusión ambientales. Pero, realmente, ¿el cumplimiento de los estándares microbiológicos establecidos en la Directiva 76/160/CE garantiza un nivel apropiado de protección de la salud pública?. De hecho, la evidencia epidemiológica a partir de estudios de todo el mundo sugiere firmemente que la transmisión de enfermedades menores tales como gastroenteritis es factible en playas que se consideran conformes con los estándares microbiológicos especificados en la Directiva (Kay *et al.*, 1994; Fleisher *et al.*, 1996). En reconocimiento a este problema, la Organización Mundial de la Salud (WHO) ha iniciado un proceso de desarrollo de "Principios generales" para las aguas recreativas. Una serie de reuniones en Bad Elster (1996), Jersey (1997) y Surrey (1998) ha dado lugar a un nuevo borrador de Principios

generales o Guía que se ha abierto para su consulta en 1998. Estos principios generales están basados en evidencia epidemiológica reciente y utiliza modelos de carga de enfermedad para definir criterios microbiológicos numéricos para las aguas recreativas. Los principios generales en el borrador de la OMS (WHO) son más rigurosos que los estándares de la UE y están reanudándose los debates europeos y norteamericanos sobre los estándares apropiados para las aguas recreativas, siendo los estreptococos fecales los indicadores preferidos en el agua marina. Claramente estos cambios podrían tener implicaciones significativas en el diseño de los proyectos de tratamiento de agua residual actualmente bajo construcción o ya proyectados para alcanzar los estándares actuales en vez de los revisados por la UE o, incluso, los nuevos criterios de la OMS. Una respuesta racional a este ambiente flexible podría ser el diseño de plantas de desinfección dentro de los nuevos esquemas de depuración de aguas residuales como son los procesos con luz ultravioleta y la microfiltración, que producen un efluente con niveles muy bajos de indicadores fecales bacterianos. Aún así, hay una creciente evidencia de que la atención al tratamiento de los efluentes de agua residual únicamente, no asegurará el cumplimiento de los estándares microbiológicos en muchas localidades costeras (Wyer *et al.*, 1997). Se constatan principalmente dos razones para el no-cumplimiento en localidades con un efluente tratado (Kay *et al.*, 1999). La primera son las entradas microbiológicas con las aguas de tormentas que a menudo comprenden agua residual diluida (pero bruta) de sistemas de alcantarillado combinados. La segunda son las entradas en las aguas recreativas cercanas a la costa de ríos y torrentes que producen descargas bacterianas episódicas, en función del régimen fluvial. En cualquier caso, los niveles de indicadores y patógenos presentes en estos efluentes disminuye con el aumento de la distancia a los puntos de descarga, debido a factores como dilución, sedimentación, predación e inactivación.

Varios estudios han mostrado que no hay una correlación consistente entre el número de indicadores bacterianos y la presencia de patógenos víricos (Goyal, 1983; Bosch *et al.*, 1986; Morínigo *et al.*, 1990). Los métodos para la detección y enumeración directa de los virus entéricos implicados en enfermedades de origen hídrico son difíciles y requieren laboratorios especializados. En la Directiva para la calidad de las aguas de baño se incluye un valor imperativo para enterovirus de 0 pfp por 10 litros de muestra, siendo el 95 % de las muestras analizadas durante la temporada de baño pero este estándar tiene bastantes objeciones, entre las cuales destacamos algunas: (i) los enterovirus en aguas de baño son relativamente menos preocupantes a nivel sanitario que otros grupos de virus entéricos, (ii) no se dispone de métodos adecuados de concentración y cuantificación para el control de enterovirus en aguas de baño, (iii) la anotación en la Directiva sobre los requerimientos de control es ambigua y ha sido interpretada de diferentes formas, etc. Los problemas en la interpretación e implementación del estándar para enterovirus han tenido como consecuencia que muchos Estados Miembros no hayan implantado programas regulares de control de virus.

Los bacteriófagos aparecen como candidatos a sustituir el estándar actual para enterovirus en aguas de baño (Havelaar, 1993). Numerosos estudios proponen a los bacteriófagos fecales como organismos modelo para los virus entéricos, además de la función de índice de contaminación fecal (IAWPRC, 1991). Los bacteriófagos son relativamente fáciles de detectar en ambientes acuáticos y muestran tasas de supervivencia y comportamientos más parecidos a los virus entéricos que las bacterias coliformes. Los potenciales indicadores incluyen a los colifagos somáticos

bacteriófagos F-específicos de RNA y fagos de *Bact. fragilis* y deben ser juzgados basándose en información detallada sobre su ecología en diferentes ambientes.

En nuestro trabajo nos propusimos la obtención de información sobre los niveles de bacteriófagos en aguas recreativas, fundamentalmente marinas, y sus relaciones con los indicadores bacterianos. Dada las bajas concentraciones de fagos en las aguas naturales, evaluamos la aplicación de diferentes métodos de concentración y optimizamos el método de floculación inorgánica por $Mg(OH)_2$, descrito previamente por Schulze y Lenk (1983). En el caso de que fagos y bacterias indicadoras (esto es, *E. coli*) estuvieran estrechamente correlacionados, se estaría obteniendo el mismo tipo de información a partir de unos u otros parámetros; si se trata de una débil correlación o ausencia de ella, entonces los fagos están proporcionando una información nueva. Se espera que los fagos adviertan sobre patógenos más persistentes como son pe. los virus y, si esto fuera cierto, el análisis de los resultados del muestreo de aguas de baño debería ofrecer relaciones *E. coli*/bacteriófagos más bajas que las encontradas en la fuente de contaminación (agua residual). De hecho, los resultados obtenidos en las aguas naturales estudiadas en capítulos precedentes manifiestan una inactivación diferencial entre microorganismos que se hace más evidente en las aguas con concentraciones de *E. coli* inferiores a 100 N/100 ml. En este capítulo revisamos dichos resultados, comprobando que pueden ser explicados atendiendo a las diferencias en las tasas de supervivencia de los microorganismos estudiados en el ambiente marino, así como a fenómenos de dilución respecto al foco de contaminación.

5.4.2 MICROBIOLOGÍA DEL AGUA RESIDUAL

Este estudio ofrece la ventaja de haber cuantificado en las mismas muestras, indicadores bacterianos (coliformes fecales, estreptococos fecales y esporas de *C. perfringens*), bacteriófagos fecales (colifagos somáticos, fagos F-RNA, fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y RYC2056) y enterovirus cultivables, siguiendo normativas ISO y protocolos estandarizados, lo que permite establecer relaciones entre microorganismos y análisis estadístico.

Así, en el análisis microbiológico de las muestras tomadas a la entrada de una planta depuradora físico-química que recoge las aguas residuales equivalentes a 1400000 habitantes, obtenemos unos resultados comparables a los descritos previamente por otros autores que estudiaron estas mismas aguas (Tartera *et al.*, 1989; Araujo *et al.*, 1997; Lasobras, 1997). Lasobras y col. (1999) muestran valores de coliformes fecales, estreptococos fecales y fagos de *Bact. fragilis* HSP40 del mismo orden de magnitud a los presentados en este trabajo (CF= 7.4; EF= 6.1; BfHSP40= 3.4; datos expresados en logaritmos de las cfp ó pfp en 100 ml); no ocurre lo mismo con los colifagos somáticos y los fagos F-específicos, que son un logaritmo más altos en nuestro estudio (SOM= 5.72 frente a 6.98; F-TOT= 4.9 frente a 6.05). Además de las fluctuaciones en las concentraciones de microorganismos del agua residual atribuibles a las desigualdades estacionales y horarias del muestreo, estas diferencias de un logaritmo en la detección de colifagos podrían deberse a la utilización de células huésped distintas. En efecto, Lasobras y col. utilizaron las cepas *E. coli* CN13 (Payment and Franco, 1993) y *E. coli* HS pF ampR (Debartolomeis and Cabelli, 1991) para la detección de colifagos somáticos y fagos F-específicos respectivamente, a diferencia de nosotros que

utilizamos *E. coli* WG5 y *S. typhimurium* WG49. Sin embargo, en Málaga Córna y col. (1991) encuentran valores prácticamente idénticos a los referidos en nuestro trabajo; cabe señalar que estos autores trabajan con las mismas cepas huésped que nosotros para la detección de colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* HSP40. Estas observaciones se confirman, para el caso de los colifagos somáticos, con los datos de Muniesa y col. (1999) que reparan en un cambio de número y tipo de colifagos detectados al cambiar la composición del medio de crecimiento de la bacteria huésped. Otros estudios también advierten de la conveniencia de la cepa de *S. typhimurium* WG49 frente a la cepa de *E. coli* HS para la detección, cuantificación y genotipado de los fagos F-RNA (Jofre *et al.*, 1999; Mooijman *et al.*, 1999; Schaper and Jofre, 2000).

Los valores de bacterias indicadoras y bacteriófagos fecales en el agua residual cruda de diferentes áreas geográficas de Europa parecen bastante constantes. Los 18 laboratorios participantes en el proyecto europeo SMT4-CT95-1603 "Bacteriófagos en aguas de baño" (1995-1999), obtuvieron unas concentraciones medias de microorganismos en el agua residual urbana relativamente similares:

• <i>E. coli</i>	10^7	cfp/100 ml
• Enterococos	10^6	cfp/100 ml
• Colifagos somáticos	2×10^6	pfp/100 ml
• Fagos F-específicos	5×10^5	pfp/100 ml
• Fagos F-RNA	4.5×10^5	pfp/100 ml
• Fagos de <i>Bact. fragilis</i> HSP40	$<10 \cdot 10^4$	pfp/100 ml*
• Fagos de <i>Bact. fragilis</i> RYC2056	2.4×10^4	pfp/100 ml

*Valores que dependen del origen geográfico de las muestras.

Resultados comparables han sido reportados en Sudáfrica (Grabow *et al.*, 1993), Nueva Zelanda (Turner and Lewis, 1995) o Estados Unidos (Chung *et al.*, 1998). En realidad, las concentraciones de CF, EF, SOM, F-TOT, F-RNA y Bf en las aguas residuales de origen doméstico son relativamente constantes en todo el mundo (Havelaar, 1993).

La aplicación del test de correlaciones bivariadas en nuestros resultados, transformados a logaritmo, señala relaciones estrechas entre bacterias y bacteriófagos, con excepción de los fagos de *Bact. fragilis* y coliformes fecales que no aparecen correlacionados. Sin embargo en un estudio de Vilaginès y col. (1997), realizado en el área de París, los autores no encuentran correlaciones estadísticamente significativas entre coliformes fecales, estreptococos fecales, *Salmonella*, fagos F-RNA y enterovirus en el agua residual bruta (como tampoco las hallan en efluente de planta depuradora ni en agua de río). Otro trabajo distinto en Francia, realizado por Gantzer y col. (1998), constata correlaciones significativas ($p < 0.01$) entre la concentración de colifagos somáticos o fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y la presencia de enterovirus infecciosos o la presencia de genomas de enterovirus en tres tipos de aguas residuales tratadas. No obstante estas relaciones, los autores remarcan que el grupo de colifagos se presentaba como un indicador pobre de las fluctuaciones en la concentración de enterovirus, a

diferencia de los fagos de *Bact. fragilis* que se mostraron como buenos indicadores durante los fallos en el tratamiento de depuración. De forma similar, Cornax y col. (1991) obtienen elevados coeficientes de correlación entre todos los parámetros microbiológicos analizados en muestras altamente polucionadas recogidas cerca de una descarga de agua residual en la playa Misericordia (Málaga).

Las relaciones logarítmicas entre los distintos parámetros microbiológicos en el agua residual apuntan desigualdades en la densidad de microorganismos descargados con las heces humanas y animales, pero una forma más intuitiva de observar las diferencias en la concentración de microorganismos es considerando los valores relativos sin transformar a logaritmos. Así por ejemplo, en la Tabla 5.15 vemos que la concentración de colifagos somáticos es 1400 veces mayor que la concentración de fagos de *Bact. fragilis* HSP40 y 10 veces superior a la de fagos F-RNA.

Tabla 5.15. Relaciones numéricas entre parámetros microbiológicos medidos en el agua residual de Barcelona.

	CF/X	SOM/X	EF/X	F-RNA/X	X/HSP	X/ENT
CF	1				4240	10^6
SOM	3	1			1400	3.5×10^5
EF	25	8	1		173	4.3×10^4
F-TOT	27	8.5	1	0.88	165	4.1×10^4
FRNA	29	9.7	1.2	1	145	3.6×10^4
CP	88	29	3.6	3	48	1.2×10^4
RYC	438	145	18	15	10	2.4×10^3
HSP	4239	1406	173	145	1	251
ENT	10^6	3.5×10^5	4.3×10^4	3.6×10^4		1

X representa al parámetro que inicia la fila.

Cada término de una división representa la media geométrica del parámetro correspondiente (cfp ó pfp en 100 ml).

Estas relaciones están en concordancia con las calculadas por Tartera y col. (1989) en el agua residual, salvo las relaciones con los enterovirus en las que consiguen un logaritmo menos de diferencia que nosotros; los fagos F-específicos no son contemplados en dicho estudio. La media de los enterovirus en el trabajo de Tartera y col., más alta que la que aquí presentamos, está calculada con un rango de muestras que contienen de 0 a 2400 pfp en 100 ml y esta podría ser una explicación de por qué dichos autores encuentran un logaritmo menos de diferencia entre enterovirus y fagos de *Bact. fragilis* HSP40, *C. perfringens* o coliformes fecales.

Araujo y col. (1997) sostienen que en muestras donde la contaminación fecal es reciente, como son las correspondientes a agua residual y aguas de ríos contaminados por agua residual, los niveles de los tres grupos de fagos son muy constantes; la elevada correlación existente entre los valores de colifagos somáticos, fagos F-específicos y fagos de *Bact. fragilis* permite la aplicación de ecuaciones de regresión bien ajustadas.

Puede ocurrir que en las aguas residuales tratadas algunos grupos de bacteriófagos no se relacionen de forma constante con los coliformes fecales, *E. coli* o enterococos (Chung *et al.*, 1998) debido pe. a que la desinfección del efluente secundario tratado (cloración) cause reducciones diferenciales de los indicadores bacterianos y fagos. Por ello, las características específicas y la calidad de la fuente de contaminación fecal debe ser considerada para poder interpretar de forma fiable las relaciones entre los indicadores de contaminación fecal y el impacto de la fuente de contaminación fecal en las aguas receptoras. A continuación presentamos los resultados del estudio de Lasobras (1997) donde se evalúan las reducciones sufridas por los microorganismos presentes en el agua residual cruda (equivalente a la que nosotros hemos estudiado) en los efluentes de dos EDAR, una con tratamiento físico-químico (en la que en la época de verano se utiliza como floculante $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y se eleva el $\text{pH} > 10$) y otra con tratamiento biológico:

Tratamiento	Porcentajes de reducción				
	CF	EF	SOM	F-TOT	BfHSP40
Físico-químico	84.96	73.80	10.39	67.05	5.69
F-Q con $\text{Ca}(\text{OH})_2$	99.85	92.28	96.61	98.18	91.78
Biológico	92.77	96.20	93.82	98.25	98.54

Adaptación de Lasobras, 1997.

Ya que las aguas estudiadas en nuestro trabajo están afectadas por aguas residuales tratadas y sin tratar, a efectos prácticos y para tener una idea de lo que ocurre en el medio ambiente, las relaciones entre microorganismos en diferentes tipos de muestras las hemos comparado con las obtenidas en el agua residual bruta.

5.4.3. SUPERVIVENCIA DE BACTERIÓFAGOS EN EL MEDIO MARINO

El tema de la supervivencia de los virus en aguas naturales ha sido objeto de diversas revisiones (Akin *et al.*, 1971; Bitton, 1978; Katzenelson, 1978; Kapuscinski and Mitchell, 1980; Block, 1983; Gironés, 1986; Ribas, 1991; Abad, 1994; Lasobras, 1997) no sólo por la importancia del control de la presencia de virus entéricos en el ambiente acuático sino también para comprobar la capacidad de los diferentes patógenos víricos para persistir en dicho ambiente, donde pueden representar un mayor o menor riesgo sanitario. El número de factores que pueden afectar la supervivencia de un virus entérico en el agua es muy elevado. Esto implica que para la interpretación de lo que realmente ocurre bajo condiciones naturales es preciso diseñar protocolos experimentales muy definidos de cara a evaluar la influencia, sin interferencias, de un solo factor. Por ello, los estudios relativos a la supervivencia de virus en el agua son de difícil realización. Los principales factores de tipo físico son: luz, temperatura, presión hidrostática, adsorción y agregación. Los factores químicos que influyen en mayor medida en la inactivación de los virus son el pH, la carga iónica, los iones individuales, los metales pesados, las moléculas orgánicas y el oxígeno disuelto. Entre los factores bióticos se halla la propia naturaleza de los virus, las actividades de bacterias y algas (producción de exoenzimas, polipéptidos, polisacáridos y ácidos grasos) y la

depredación por protozoos. Se ha de tener en cuenta que muchos de los factores mencionados interaccionan entre sí.

En nuestro estudio enfocamos la atención en la supervivencia de bacterias indicadoras y sobretodo bacteriófagos fecales. Los factores que influyen en la supervivencia de las bacterias indicadoras fecales en el mar serían la disponibilidad de nutrientes, la salinidad, la temperatura, el pH, la predación microbiana y la radiación solar (Sinton *et al.*, 1994). El último factor aparece como el más importante. La porción UV-B del espectro solar es la más bactericida, causando daño directo (fotobiológico) sobre el DNA. A longitudes de onda por encima de 329 nm los mecanismos fotoquímicos toman más importancia, actuando normalmente a través de fotosensibilizadores para dañar las membranas celulares, siendo más perjudiciales en presencia de oxígeno. La penetración de la luz solar en el mar disminuye con la disminución de la longitud de onda, lo que tiende a incrementar la contribución del daño fotoquímico. Los estudios de Sinton y col. (1994) y de Davies-Colley y col. (1994) mostraron que se requería una mayor exposición a la luz solar para inactivar a los enterococos en el mar, en comparación con los coliformes fecales, y que la inactivación de ambos indicadores disminuía con el aumento de la profundidad en el mar. Este patrón de profundidad corresponde a la atenuación de las longitudes de onda UV-A (Davies-Colley *et al.*, 1994) y es consistente con los resultados de experimentos con filtros ópticos (Sinton *et al.*, 1994). Un concepto que está tomando importancia en los estudios de impacto de las aguas residuales abocadas en el mar es el de VT90. La VT90 se describe como la tasa de decaimiento de bacterias viables y en comparación con la T90 (tiempo necesario para la disminución del recuento de bacterias cultivables en un logaritmo decimal) suele ser mucho más alta (Guillaud *et al.*, 1997).

Se han reportado una serie de factores ambientales que interaccionan con la supervivencia de bacteriófagos (y otros virus) en el mar. Estos incluyen salinidad (Ayres, 1977), temperatura (Chung and Sobsey, 1993), unión a coloides (Gerba and Schailberger, 1975) y sustancias antivíricas exudadas por microbios marinos (Gironés, 1986). La luz también parece afectar de forma decisiva la infectividad de los bacteriófagos en el mar (Suttle and Chen, 1992) aunque, al comparar algunos estudios, los resultados son conflictivos. Así pe. Kapuscinski y Mitchell (1983) encontraron que MS2 era más resistente a la luz solar que ϕ X174 y T7, mientras que en estudios llevados a cabo por el *Water Research Centre* del Reino Unido así como en el trabajo realizado por Sinton y col. en Nueva Zelanda (Sinton *et al.*, 1999), los colifagos somáticos se mostraron más resistentes a la inactivación en el mar que los fagos F-RNA. En dichos estudios, los fagos fueron más resistentes a la luz solar que *Escherichia coli* o coliformes fecales. Otros estudios de supervivencia de fagos, bien conducidos en el laboratorio (Jofre *et al.*, 1986; Gironés *et al.*, 1989; Chung and Sobsey, 1993), bien conducidos en el campo (Gironés, 1986) no han medido la radiación solar.

Nuestros experimentos de supervivencia "*in situ*" no fueron diseñados al efecto de determinar y cuantificar los factores inactivantes en el mar. El objetivo era observar la resistencia (medida como cultivabilidad/infectividad con las técnicas habituales de análisis rutinario) de bacterias fecales, esporas de clostridios y bacteriófagos de bacterias entéricas en un ambiente natural "controlado"; la información así producida podría ser contrastada con los datos obtenidos de muestras ambientales. De forma parecida, Sinton y col. (1999) evalúan la resistencia de colifagos somáticos, fagos F-RNA y coliformes fecales en agua de mar con un 2 % de agua residual cruda en varios

experimentos en el campo (área de Lincoln, Nueva Zelanda) y también calculan los parámetros de inactivación para fagos F-DNA, fagos de *Bact. fragilis* y enterococos en uno de los experimentos. En los ensayos durante el período de luz, las cámaras conteniendo una profundidad de 560 mm de agua están abiertas por la parte superior (Sinton *et al.*, 1999). Aunque el referenciado procedimiento experimental no coincide exactamente con el nuestro, Sinton y col. trabajan con los microorganismos modelo en los que hemos centrado nuestro interés y valoran de una forma clara las diferentes cinéticas de inactivación, por lo cual en esta discusión comparamos a menudo nuestros resultados globales con los de dichos autores.

Analizando los resultados que obtuvimos, la tendencia observada en todos los ensayos fue la siguiente:

mayor resistencia	$CP > SOM > BfHSP40 \approx BfRYC2056 > F-TOT \approx EF > F-RNA > CF$	menor resistencia
----------------------	--	----------------------

Todos los microorganismos estudiados presentaron valores de T_{90} superiores en los experimentos de invierno respecto a los dirigidos en verano (Tabla 5.6) y, aunque no hacemos distinción entre períodos de oscuridad y períodos de luz, este resultado está en concordancia con los datos obtenidos por Sinton y col. (1999).

Reafirmando los resultados reportados por Burkhardt III y col. (2000), las tasas de inactivación de *C. perfringens* son las más bajas registradas en relación a bacterias indicadoras fecales y bacteriófagos entéricos y no parecen afectados significativamente por la temperatura. Esta gran capacidad de supervivencia es precisamente uno de los inconvenientes de *C. perfringens* como indicador de contaminación fecal en ambientes costeros (Goyal, 1983; Lucena *et al.* 1996), mientras que dicha característica de resistencia ha sido valorada para la propuesta del análisis de clostridios en el control de calidad de las aguas potables incorporada finalmente en la nueva Directiva europea (98/83/CE). Según Payment y Franco (1993), los clostridios sulfito-reductores serían un buen modelo para el seguimiento de la eliminación de parásitos en las plantas potabilizadoras.

En contraposición al comportamiento de las esporas de clostridios, observamos que los coliformes fecales son los microorganismos fecales que peor resisten en el ambiente marino, tal y como ha sido constatado en diversos trabajos (Borrego *et al.*, 1983; Evison, 1988; Davies-Colley *et al.*, 1994; Sinton *et al.*, 1999; Burkhardt III *et al.*, 2000). Es ampliamente reconocido que la concentración de estreptococos fecales disminuye más despacio que la de coliformes fecales en aguas marinas costeras (Córnaux *et al.*, 1991; Davies-Colley *et al.*, 1994; Godfree *et al.*, 1997). En nuestro trabajo, las T_{90} obtenidas para EF en invierno son 2.1-2.4 veces superiores a las de CF; no ocurre lo mismo con el experimento realizado en verano, en el que las T_{90} de ambos microorganismos están próximas. Las curvas de inactivación de coliformes fecales exhiben un cambio de pendiente, en conformidad con los trabajos de Sinton y col. (1994, 1999) y Davies-Colley y col. (1994). Tales autores describen una expresión cinética que reconoce el punto de inflexión en las curvas de supervivencia de coliformes y enterococos fecales. En cambio, las curvas de bacteriófagos fueron exponenciales, de acuerdo a estudios ya publicados (Sinton *et al.*, 1999; Burkhardt III *et al.*, 2000).

Los fagos F-RNA no parecen mucho más resistentes que los coliformes fecales bajo las condiciones experimentales estudiadas. Apreciamos que los fagos de *Bact. fragilis* son más resistentes en el medio marino que los fagos F-RNA, resultado consistente con los reportados por otros autores con fagos de laboratorio en experimentos de laboratorio y en el campo (Jofre *et al.*, 1986; Gironés, 1986; Gironés *et al.*, 1989; McLaughlin and Rose, 2000) y con fagos salvajes en el laboratorio o en el campo (Kator and Rhodes, 1993; Chung and Sobsey, 1993; Lucena *et al.*, 1995; Sinton *et al.*, 1999). Las relaciones entre colifagos somáticos y fagos F-RNA, claramente favorecedoras al primer grupo, ya habían sido examinadas por Moriñigo y col. (1992). Los estudios de Sinton y col. (1999) y Lucena y col. (1995) afianzan nuestras observaciones donde los colifagos somáticos se sitúan por encima de los fagos F-RNA y fagos de *Bact. fragilis* en cuanto a persistencia en el mar.

Diferentes autores han identificado la radiación solar y/o la temperatura como los parámetros más significativos que afectan a las tasas de inactivación de los indicadores fecales en el mar (Suttle and Chen, 1992; Wommack *et al.*, 1996; Sinton *et al.*, 1999; Burkhardt III *et al.*, 2000). Tal y como se diseñó nuestro estudio, los microorganismos evaluados estaban contenidos en sacos de diálisis de celulosa a una profundidad aproximada de 40 cm en agua de mar con una turbidez media de 5 NTU. Esto significa que, bajo estas condiciones, la radiación que afecta a los microorganismos corresponde a una luz solar más atenuada que ha perdido parte de las longitudes de onda más cortas y que permite una penetración de las longitudes de onda más largas a las cuales los fagos F-RNA y los coliformes fecales son más susceptibles. Además, Sinton y col. (1999) comprueban que los colifagos somáticos son sensibles a longitudes de onda por debajo de 318 nm (UV-B), lo que explicaría la mayor resistencia de este grupo de bacteriófagos durante nuestros experimentos de supervivencia. En los experimentos "*in situ*" realizados a distintas profundidades en el mar, Gironés (1986) no observó diferencias en la estabilidad de los virus en sacos de diálisis a 20 cm y a 170 cm de la superficie y consideró que el efecto de la radiación ultravioleta del sol a través de los sacos de diálisis debía ser poco importante. En cualquier caso, nuestros resultados apuntan relaciones lineales entre la irradiación solar media diaria y colifagos somáticos, fagos F-RNA y fagos de *Bact. fragilis*. Algunos autores prefieren utilizar el parámetro S_{90} (MJ/m²), insolación que produce el 90% de inactivación, porque consideran que es más robusto que el parámetro tradicional T_{90} para comparar estudios ya que la radiación solar varía notoriamente con el ciclo diurno, las estaciones y las condiciones climáticas (Davies-Colley *et al.*, 1994; Sinton *et al.*, 1994, 1999).

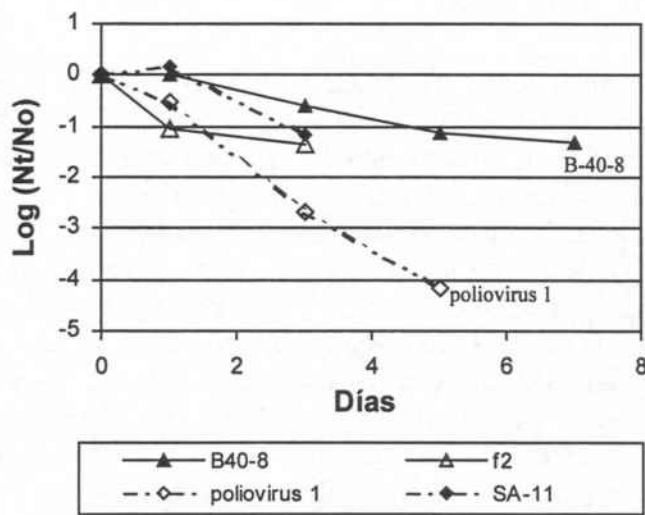
La temperatura afecta virtualmente a todos los factores que contribuyen a la reducción microbiana en el ambiente de forma positiva (Havelaar, 1993), información que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio: mayor inactivación de indicadores bacterianos y bacteriófagos fecales a temperaturas más altas (T_{90} en verano más bajas que en invierno). Por otro lado, se ha descrito que a temperaturas de agua más bajas, la susceptibilidad de los CF a los efectos de la luz solar es mayor, pero que hay un umbral de energía acumulada (aproximadamente 300 J/cm²) por encima del cual la inactivación del indicador no es predecible con una regresión lineal (Burkhardt III *et al.*, 2000). Esta interpretación podría ser una explicación a los cocientes entre las T_{90} de invierno y de verano, que son más pequeños en el caso de CF (1.3) que para el resto de parámetros microbiológicos (desde el 1.8 obtenido con clostridios hasta el 3.3 calculado con las tasas de inactivación de *Bact. fragilis*). En nuestro trabajo encontramos que los valores de T_{90} obtenidos para F-RNA se correlacionaban significativamente (pendiente

negativa) con la temperatura del agua, obteniéndose un buen ajuste del modelo de regresión lineal. De hecho, varios estudios confirman la inestabilidad de los fagos F-RNA en agua de mar cálida (25°C) y un incremento relativo de la estabilidad con la disminución de la temperatura del agua (Chung and Sobsey, 1993; Lewis, 1995; Burkhardt III *et al.*, 2000; McLaughlin and Rose, 2000). La inactivación más rápida de colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis* experimentada a temperaturas más altas también es consistente con otros trabajos (Sinton *et al.*, 1999).

Lasobras y col. (1997) sugieren que la diferente persistencia de los bacteriófagos en el ambiente está relacionada con la morfología de los fagos. Estos autores encuentran que los colifagos somáticos predominantes en el agua residual presentan la morfología característica de la familia *Myoviridae*, mientras que en muestras con contaminación persistente (aguas de diferentes fases de una ETAP, del grifo, de pozos y manantiales, efluentes clorados de EDAR y agua de mar) la morfología predominante es la *Siphoviridae* con cola flexible; estos datos son corroborados en la publicación de Muniesa y col. (1999). Lasobras y col. también observan que el porcentaje de fagos F-específicos detectados con la cepa de *E. coli* HS en muestras de agua con contaminación persistente disminuye significativamente respecto al agua residual (de 97.7 a 76.9 %) con el concomitante incremento en el porcentaje de colifagos somáticos. El porcentaje de colifagos somáticos fue incluso mayor (36 %) en las 37 muestras de mar analizadas. Estos autores concluyen que los fagos *Siphoviridae* parecen ser uno de los grupos de fagos más resistentes a la inactivación y en este contexto, la utilización de la cepa de *Bact. fragilis* HSP40, que detecta un grupo homogéneo de fagos predominantemente *Siphoviridae*, sería conveniente para las investigaciones de supervivencia natural o resistencia a tratamientos del agua. Otras cepas, como *E. coli* CN13 o *E. coli* HS detectarían grupos más heterogéneos de fagos y el resultado final de los estudios de supervivencia sería debido a una suma de diferentes cinéticas de inactivación.

A todo esto, ¿la persistencia de bacteriófagos entéricos en el mar es similar a la de posibles virus patógenos?. Diversos trabajos han estudiado la supervivencia en agua marina de virus entéricos y alguno de los grupos de bacteriófagos candidatos a microorganismo indicador bajo las mismas condiciones experimentales.

Figura 5.18. Supervivencia de bacteriófagos y virus en agua de mar, experimentos “*in situ*” (Gironés 1986).



En los estudios de Gironés (1986), los fagos de *Bact. fragilis* resistían mejor que los colifagos F-específicos y que algunos virus entéricos (Fig. 5.18). Los experimentos “*in situ*” durante el mes de mayo en el puerto de Garraf (temperatura del agua 15°C, 2400 CF/100ml) permitieron calcular las siguientes T_{90} (días): f2= 3.2; B40-8= 3.6; poliovirus 1= 1.5 y rotavirus SA-11= 2.1 (Gironés, 1986).

Resultados similares con estos virus se registran en la publicación de Jofre y col. (1986) tanto en experimentos de laboratorio como en el campo. En estudios realizados en el *United Kingdom Water Research Centre* (WRC, 1991), durante los experimentos conducidos en el laboratorio en la oscuridad y a 10°C, los rotavirus resistían más que los poliovirus, seguidos de los colifagos somáticos que a su vez eran más persistentes que los fagos F-RNA; cuando la temperatura del agua aumentaba a 20°C, las tasas de inactivación de poliovirus 1 superaban a las de colifagos somáticos. Chung y Sobsey (1993), en condiciones de laboratorio y oscuridad, a 25°C reportaron una mayor resistencia de fagos de *Bact. fragilis* seguidos del virus de la hepatitis A (HAV), poliovirus 1 (P1), rotavirus (RV) y finalmente los fagos F-específicos (F+); a 5°C los fagos de *Bact. fragilis* continuaron siendo los más persistentes, seguidos de RV, F+, HAV y por último P1. Lewis (1995) encontró un patrón de pérdida de infectividad similar para MS2 y P1 en agua de mar, con un efecto más rápido a 25°C que a 4°C. Callahan y col. (1995) sugieren que las diferencias reportadas en la inactivación del mismo tipo de virus en agua de mar a partir de diferentes estudios es probablemente una consecuencia de las diferencias metodológicas y no a verdaderas diferencias en la actividad virucida de las aguas de mar. Dichos autores realizaron estudios de supervivencia en el laboratorio a 20°C y oscuridad con agua de mar de tres áreas geográficas diferentes (California, Hawaii y Carolina del Norte) y encontraron que la supervivencia era mayor para los fagos somáticos de *Salmonella* (SS) con T_{99} (reducción de 2 log₁₀) de 35.5 días. Los fagos F-RNA y P1 fueron inactivados relativamente rápido, con T_{99} de 5.0 y 3.1 respectivamente. Las reducciones de HAV fueron intermedias entre fagos SS y fagos F-RNA, con T_{99} de 6.0 días. Otros patógenos de origen hídrico que podrían constituir un riesgo para la salud de los bañistas, además de bacterias patógenas y virus animales, son los protozoos parásitos como *Giardia* y *Cryptosporidium*. En este sentido, Jonhson y col. (1997) examinaron la supervivencia de los quistes de *Giardia muris*, ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, poliovirus 1 y *Salmonella typhimurium* en aguas marinas. La supervivencia de los microorganismos variaba en función de la presencia de luz, salinidad y calidad del agua (determinada por la concentración de enterococos y turbidez). Todos los microorganismos sobrevivieron más tiempo en la oscuridad que expuestos a la luz solar, siendo el orden de supervivencia con luz el siguiente: *Cryptosporidium* > poliovirus > *Giardia* > *Salmonella*.

En definitiva, los colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis* presentan tasas de inactivación similares o incluso superiores a la de varios virus entéricos de interés sanitario en ambientes marinos costeros. La supervivencia superior de colifagos somáticos, encontrada de forma consistente en nuestros experimentos, justifica la reconsideración de este grupo de bacteriófagos como indicadores fecales, y posiblemente víricos, en aguas marinas.

5.4.4 BACTERIAS INDICADORAS Y BACTERIÓFAGOS EN SEDIMENTOS MARINOS

En las aguas estuarias tanto los sedimentos como el material en suspensión han estado implicados en la supervivencia de bacterias (Hood and Ness, 1982; Doyle *et al.*, 1992) y especialmente virus (Gerba *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 1978; LaBelle and Gerba 1979; LaBelle and Gerba., 1980; Rao *et al.*, 1984; Sobsey *et al.*, 1988; Chung and

Sobsey, 1993). Una revisión de estudios que han mostrado el efecto protector que los sedimentos confieren a los virus, tanto en experimentos de laboratorio como en muestras ambientales, la encontramos en el trabajo de Lasobras (1997). En términos de significación para la salud pública, los valores de microorganismos modelo en el sedimento en una localización particular pueden ser un mejor indicador de la calidad del agua en un periodo de tiempo largo que los valores bacterianos y víricos en el agua de la zona (Lasobras, 1997). Por ejemplo, coliformes fecales y enterovirus han sido correlacionados en muestras de sedimento (LaBelle *et al.*, 1980); sin embargo, no se han obtenido correlaciones positivas entre indicadores bacterianos y virus en la columna de agua (Gerba *et al.*, 1979; LaBelle *et al.*, 1980).

El muestreo de sedimentos no está sujeto a directivas de la UE y puede encontrarse con problemas e inconsistencias. Algunos de éstos, relacionados con la variabilidad del sedimento por sí mismo (pe. guijarroso, fangoso o arenoso), otros relacionados con los métodos de recogida del sedimento. El muestreo de sedimentos puede realizarse con pistón, que permite la obtención de un sedimento estratificado pero presenta el inconveniente de proporcionar poca muestra. Con la draga o cuchara puede obtenerse más muestra que con el pistón, pero cuando se trata de sedimentos arenosos, se desestructuran las capas o, cuando el sedimento superficial es limoso, al subir la draga se produce un efecto de lavado. El testigo de caja proporciona gran cantidad de sedimento estructurado, pero se trata de un equipo sofisticado generalmente disponible en barcos oceanográficos. Una vez obtenido, los microorganismos en el sedimento son transferidos a una suspensión mediante algún mecanismo físico y/o químico. Por estos motivos metodológicos, la comparación de los estudios de sedimentos es complicada (Bradley *et al.*, 1999; F. Lucena, com. pers. 2000).

En el análisis de sedimentos marinos que hemos llevado a cabo, la variabilidad de la carga microbiológica entre muestras junto con la localización de las estaciones de muestreo revelan que la contaminación fecal en la mayoría de las muestras estudiadas es debida a un efecto acumulativo más que a la proximidad de la fuente de contaminación fecal. En realidad, los niveles de bacteriófagos y bacterias fecales en sedimentos recogidos en el tanque de sedimentación primaria en una planta de tratamiento de agua residual doméstica, son bastante constantes y la sedimentación parece afectar de la misma forma a los diferentes grupos de fagos (Araujo *et al.*, 1997). Dada la ausencia de correlaciones entre microorganismos en las muestras analizadas en nuestro estudio, podemos considerar que bacterias y bacteriófagos han estado sometidos a una serie compleja de procesos naturales que incluirían transporte, sedimentación e inactivación (Lucena *et al.*, 1996).

Varios estudios muestran una concentración más elevada de microorganismos en los sedimentos que en la columna de agua correspondiente (Tartera *et al.*, 1989; Alcantara and Almeida, 1995; Araujo *et al.*, 1997; Legnani *et al.*, 1998) y nuestros resultados globales en mar y en sedimentos (Figura 5.17) también confirman estas observaciones.

Sin duda, los actores destacados en estas muestras de sedimentos son las esporas de clostridios, que encontramos de forma consistente en el rango de 10^4 - 10^6 /100 g, presentando una relación media con los colifagos somáticos (segundos protagonistas en este escenario) SOM/CP de 0.82 frente al valor de 1.27 encontrado en el agua residual (términos de la proporción transformados a $\log_{10}$). De hecho, varios estudios de

sedimentos marinos identifican a *C. perfringens* como un parámetro conservador que indica contaminación fecal persistente (Goyal, 1983; Hill *et al.*, 1993; Lucena *et al.*, 1996). También observamos que la relación CF/EF es menor en comparación a la obtenida en el agua residual; los EF predominan sobre los CF, de forma análoga a lo que sucedía en los experimentos de supervivencia en el medio marino del apartado anterior. Schwartzbrod y col. (1987) analizaron sedimentos marinos del sector Besós y del sector Llobregat, encontrando en un 67 % de las muestras del primer sector, niveles de EF superiores o iguales a CF y en un 100 % de las muestras del segundo sector, los EF superaron a los CF. Estos autores detectaron bajas concentraciones de enterovirus en dichas muestras. Legnani y col. (1998), en un estudio de agua marina, sedimentos y marisco en la costa Adriática cercana a Rimini, constatan un aumento en el porcentaje de muestras positivas para EF y en la concentración media de estos microorganismos en sedimentos respecto a la columna de agua, siendo este incremento incluso superior en mejillones y almejas. Además dichos autores, al igual que nosotros, obtienen un porcentaje de positividad superior para colifagos somáticos en sedimentos comparado con estreptococos y coliformes fecales.

Por otro lado, los datos obtenidos muestran un cambio en las proporciones entre bacteriófagos. En nuestro estudio los fagos F-RNA prácticamente no son recuperados de sedimentos marinos. Sin embargo, Bradley y col. (1999) encuentran un incremento relativo de fagos F+ en relación a los números de colifagos somáticos y fagos de *Bact. fragilis* en sedimentos tomados en el ambiente marino de Plymouth Sound, respecto a la columna de agua, pero no especifican si se trata de F-totales o F-RNA. Es posible que el método que nosotros hemos utilizado para la extracción de fagos a partir de sedimentos no sea el más eficiente para el grupo de fagos F-RNA (Jofre *et al.*, 1989). En cualquier caso, de seis muestras en las que detectamos fagos F-específicos, sólo una de ellas presentaba un 5 % de fagos F-RNA respecto a los fagos F-totales cuantificados. Resultados parecidos fueron reportados por Rhodes y Kator (1991) que encontraron valores relativamente altos de fagos somáticos de *Salmonella* en sedimentos del área de Chesapeake Bay, en detrimento de los fagos F-RNA. Alcantara y Almeida (1995) analizaron sedimentos en el área marina de Ria de Aveiro (Portugal) y los colifagos F-RNA fueron raramente encontrados mientras que la gran mayoría de fagos F-específicos eran fagos DNA. Estas autoras observaron la misma tendencia de predominancia de los fagos sexuales DNA en marisco. Podría decirse que los fagos F-RNA pierden la capacidad infectiva en sedimentos marinos antes que los grupos de fagos de *Bact. fragilis* y colifagos somáticos, de forma parecida a lo que sucede en los experimentos de supervivencia en el mar (ver apartado 5.4.3).

Por lo que a la relación colifagos somáticos:fagos de *Bact. fragilis* se refiere, las proporciones no parecen variar significativamente respecto al agua residual. Aunque la media de las relaciones, tomando los términos en forma logarítmica, puede parecer favorecedora a los colifagos somáticos comparada con el agua residual (Tabla 5.10), esto no es cierto si se tienen en cuenta los valores individuales y sin transformar a logaritmos. Así, en ninguna muestra analizada los niveles de colifagos somáticos superan en más de 1080 veces los niveles de fagos de *Bact. fragilis* HSP40. Incluso podría decirse que los fagos de *Bact. fragilis* aumentan en proporción respecto a los colifagos somáticos, de forma parecida a las observaciones de Lucena y col. (1996) en sedimentos marinos con niveles de contaminación relativamente altos del área de Barcelona. En realidad, la utilización de fagos de *Bact. fragilis* para evaluar contaminación en sedimentos requeriría una metodología de elución y concentración de

este eluido que situara los límites de detección por debajo de los que en este trabajo presentamos (alrededor de 50 pfp/100 g).

5.4.5 ENTEROVIRUS EN MUESTRAS MARINAS

5.4.5.1 Metodología

• Concentración

El análisis de virus entéricos en muestras marinas requiere un paso previo de concentración (Lucena *et al.*, 1983). No hay un método oficial recomendado por la UE para la concentración de virus del medio marino, por lo que diferentes países tienen métodos adaptados (pe. adsorción a y elución de filtros microporosos de nitrato de celulosa en el Reino Unido, adsorción-elución a lana de vidrio en Francia o ultrafiltración en Italia). En análisis de rutina se prefieren métodos de filtración porque son más prácticos y operativos que otras técnicas (pe. que la floculación o la hidroextracción en PEG).

La concentración sobre lana de vidrio sodocálcica, soporte de carga mixta, presenta la ventaja de que la adsorción de los virus tiene lugar al pH natural del agua (Vilaginès *et al.*, 1993). En un estudio colaborativo con 13 laboratorios franceses, iniciado por el grupo de trabajo de microbiología del agua AFNOR (*Association Française de Normalisation*), se valoró la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica de lana de vidrio para el aislamiento de virus en agua de distribución y agua de mar (Vilaginès *et al.*, 1997). Los resultados mostraron que este método es fiable y ha sido propuesto y aceptado como un estándar francés para la evaluación de enterovirus en aguas (Norme XP T90-451, 1996).

Nosotros realizamos algunos ensayos preliminares con membranas electronegativas para valorar la recuperación de poliovirus 1 añadido a muestras de mar antes de proceder a los estudios de campo. Seguimos el protocolo de trabajo utilizado en el laboratorio de Exeter, Reino Unido (*Environment Agency, National Laboratory Service*), para la concentración de enterovirus en análisis rutinarios (A. Gawler, com. per.) con ligeras modificaciones: preacondicionamiento de 5 litros de muestra de agua marina con 100 ml de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.14 M. Filtración por presión con nitrógeno (0.2-0.3 bares) a través de un prefiltro de fibra de vidrio GF/F (Whatman) y una membrana de nitrato de celulosa de 0.45 μm de poro y 90 mm de diámetro (Sartorius) siendo el tiempo de filtración de 30-40 min. Elución de las membranas con 40 ml de eluyente (0.15 M tampón glicina, 3 % extracto de carne, pH 9-9.5) dos veces en el mismo sentido de la filtración (0.5-0.6 bares). Neutralización del concentrado con HCl 0.1 N. Titulación de la muestra directa y del concentrado por el método estándar de calvas en monocapa. Después de varios intentos y de ensayar diferentes cambios en el proceso mecánico de elución, no conseguimos un buen porcentaje de recuperación de poliovirus 1 en el proceso de concentración de 5 litros por filtración con membranas electronegativas; sin embargo, en la escala de 1 litro y con filtración por vacío sí que obtuvimos recuperaciones alrededor del 30 % (datos no mostrados).

Finalmente decidimos aplicar el método de concentración con polvo de vidrio (Lucena *et al.*, 1991), utilizado en nuestro laboratorio como parte del procedimiento rutinario en el control de enterovirus en muestras ambientales. El método polvo de vidrio, tal y como se describe en Lucena (1981), tiene un rendimiento en la concentración del 40-50 % con volúmenes de hasta 250 litros de agua potable, un factor de concentración de 5000 y una duración total de la operación (25 l) de 30 min. Con este método el adsorbente (polvo de vidrio) se mantiene en suspensión en el agua durante el proceso de adsorción con lo que se evita la colmatación del filtro. Ha permitido la concentración de enterovirus de muestras de 25 litros de aguas superficiales hasta 50 ml (Lucena *et al.*, 1983). Desde el punto de vista técnico, el método parece apropiado en los estudios de contaminación vírica del agua de mar (Lucena, 1981; Lucena *et al.*, 1982, 1983, 1985). Por ejemplo, Lucena y col. (1985) encontraron un 17 % de aislamientos positivos en las playas de Badalona y Barceloneta y un 8 % en Gavá, a concentraciones medias de 0.015 unidades infecciosas en 100 ml (0.0025-0.045).

A pesar de que las técnicas de polvo de vidrio (y lana de vidrio) permiten obtener buenas recuperaciones de virus entéricos a partir de diferentes tipos de agua, estos métodos de concentración no son válidos para bacteriófagos (Senouci and Schwartzbrod, 1996).

• Detección

La detección de enterovirus en los concentrados tradicionalmente depende del crecimiento en cultivo celular (CC) con la producción de un efecto citopático observable que precisa al menos siete días antes de registrar un resultado negativo (Bosch *et al.*, 1986). Las técnicas basadas en la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) prometen resultados más rápidos, específicos y sensibles (Puig *et al.*, 1994; Wyn-Jones *et al.*, 1995) pero estos métodos detectan un genoma vírico, que puede proceder o no de un virus infectivo, además de ser sensibles a la interferencia con materiales tóxicos (Murrin and Slade, 1997). En los últimos cinco años, el método combinado de cultivo celular y amplificación de ácidos nucleicos está ganando adeptos entre los virólogos ambientales. La combinación CC y RT-PCR facilita la detección de aquellos virus de crecimiento lento y de los que no producen efecto citopatogénico en cultivos celulares además de reducir los efectos de inhibición sobre la reacción de PCR y permitir el análisis de mayores volúmenes muestrales que la amplificación directa (Reynolds *et al.*, 1996; Abad *et al.*, 1997; Chapron *et al.*, 2000). Desde el punto de vista técnico, este último método es el más complejo y su coste es como mínimo el equivalente al de detección mediante cultivo celular (Sobsey, 1997). En realidad, no se dispone aún de un método para el control rutinario ambiental de virus entéricos eficaz, sensible, específico, sencillo, reproducible y económico.

Así, optamos por el cultivo celular con células BGM (*Buffalo green monkey*) para nuestro estudio de enterovirus, ya que en nuestro laboratorio se trabaja con esta línea continua desde hace más de dos décadas (Lucena, 1981). Comparamos los resultados de la enumeración de un stock de poliovirus tipo 1 obtenidos mediante la técnica de calvas estándar (Bosch *et al.*, 1986; APHA, 1995) y mediante el ensayo de células en suspensión (HMSO, 1995), este último estandarizado en el Reino Unido. Obtuvimos (en 4 experimentos y 45 placas totales; datos no mostrados) una media de 2.07 veces más calvas contabilizadas por el método de células en suspensión que por el método estándar

sobre monocapa (la prueba T mostró diferencias significativas entre los recuentos obtenidos por ambas metodologías con $p < 0.05$). Pese a dichos resultados, consideramos que los inconvenientes del método de células en suspensión (Tabla 5.16) se verían acentuados con el análisis de muestras ambientales y decidimos detectar enterovirus en concentrados de agua de mar por el método estándar de calvas en monocapa y por inoculación de la muestra en medio líquido sobre tapetes celulares bien formados de la línea BGM (APHA, 1995), a sabiendas de que estábamos contando aproximadamente la mitad de los enterovirus cultivables. En cualquier caso, el método estándar de calvas en monocapa era válido para cubrir los objetivos pretendidos: tener idea de los niveles de enterovirus en ambientes marinos y estudiar posibles relaciones con otros microorganismos indicadores.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se está ensayando una técnica que combina la concentración de virus entéricos en suspensiones acuosas por adsorción a membranas electronegativas de 3 μm y la cuantificación en cultivo celular por recuento de calvas protagonizadas por los virus adheridos en la superficie del filtro. Esta metodología, que aprovecha el crecimiento de las células sobre la superficie de filtros de nitrato de celulosa, permite la detección de virus en ambientes con baja concentración vírica, se utiliza sin descontaminación de la muestra (aunque se añade ceftazidima además de los antibióticos típicamente utilizados en cultivo celular) y recupera un 50 % más de virus que con el método estándar de calvas en monocapa (Papageorgiou *et al.*, 2000; L. Mocé com. pers.).

Tabla 5.16. Desventajas del método de células en suspensión frente al método estándar para la enumeración de enterovirus sobre la línea celular BGM.

Células en suspensión	Estándar monocapa
• <u>Preparación de las células.</u> A partir de 4 frascos de 175 cm^2 de tapiz celular, obtenemos 8 placas para análisis de muestra (2×10^7 células/placa). Método tedioso, cada vez que se hace un análisis se debe centrifugar el contenido de los frascos para concentrar las células. • <u>Inoculación de la muestra.</u> La muestra se incuba junto a las células, no se elimina antes de añadir el medio post-infección y se agraban posibles problemas de toxicidad y/o contaminación; esto justifica la utilización de más antibióticos. • <u>Lectura de los resultados.</u> Poco contraste con el colorante vital rojo neutro para la cuantificación de las calvas	• <u>Preparación de las células.</u> A partir de un frasco de 175 cm^2 de tapiz celular conseguimos en 2 días 10 placas y además regeneramos el tapete celular en el frasco. Se comprueba que el tapete celular en las placas está bien formado y se inocula la muestra. • <u>Inoculación de la muestra.</u> Después de la incubación de la muestra con las células, la muestra se elimina antes de añadir el medio post-infección. • <u>Lectura de los resultados.</u> Buena visualización de las calvas con el fijador cristal violeta.

Observaciones realizadas en los ensayos de comparación de la enumeración de poliovirus 1 con la técnica de células en suspensión y con el método estándar de calvas en monocapa (datos numéricos no mostrados en el capítulo de resultados).

5.4.5.2 Niveles de enterovirus en el ambiente marino. Interpretación de los resultados.

Las concentraciones típicas de virus entéricos humanos en el agua residual bruta municipal están entre 10 y 1000 unidades infecciosas por 100 ml y los tipos de virus presentes variarán dependiendo de qué virus entéricos estén circulando en la población (Sobsey, 1997). El tratamiento primario y secundario de las aguas residuales, resultando en una reducción del 80% en la concentración de virus, puede dar lugar a un efluente conteniendo una media de 6-12 pfp/100 ml (Slade and Ford, 1983; Reynolds *et al.*, 1995). Dichas concentraciones de enterovirus a la entrada y a la salida de una planta depuradora de aguas residuales municipales coinciden con las encontradas por nuestros compañeros en la planta de Sant Adrià de Besòs utilizando la técnica descrita en Papageorgiou y col. (L. Mocé, com. pers.).

En realidad, los virus encontrados en aguas superficiales próximas a grandes núcleos urbanos son un reflejo del estado sanitario de la población (Lucena *et al.*, 1983). A título de ejemplo, mostramos los datos publicados en Lucena y col. (1986).

Tabla 5.17. Proporciones relativas de las cepas virales aisladas. El muestreo se realizó dos veces al mes en las playas de Badalona, Barceloneta y Gavá, y en los ríos Besòs y Llobregat. Los porcentajes fueron calculados a partir de 143 cepas aisladas

	1979		1980		Río
	Badalona	Resto playas	Badalona	Resto playas	
Poliovirus tipo vacunal	67 %	23 %	50 %	25 %	33 %
Poliovirus tipo salvaje	11 %	49 %	50 %	50 %	51 %
Otros enterovirus	22 %	28 %	0 %	25 %	16 %

Adaptada de Lucena y col. (1986).

En la playa de Badalona, en el año 1979, se encontró un incremento significativo en los niveles de la cepa tipo vacunal de poliovirus respecto al resto de cepas salvajes regularmente aisladas en las playas del área de Barcelona. Un programa de vacunación masiva frente a la poliomielitis, llevado a cabo en Badalona a principios de 1979 y que afectaba a gente joven, condujo a este aumento en la presencia de la cepa vacunal de poliovirus en la playa. Una vez más, estos hallazgos muestran que la supervivencia y transmisión de virus en sistemas acuáticos representan un riesgo potencial para la salud.

Los microorganismos descargados con el agua residual bruta y/o tratada sufren fenómenos de dilución y/o inactivación cuando llegan al mar y los datos recogidos en nuestro estudio de enterovirus en el ambiente marino así lo manifiestan. En el análisis de 10 muestras tomadas en la costa barcelonesa durante el mes de julio de 1999, encontramos un 70 % de positivos para enterovirus cultivables, en concentraciones que oscilaron de 0.023 a 0.217 pfp en 100 ml. Sorprendentemente, estos resultados están

dentro del mismo orden de magnitud que los niveles de enterovirus obtenidos en el trabajo de Lucena y col. (1982), que también observaron un 70 % de muestras de playas (tomadas en Badalona, Barceloneta y Castelldefels) positivas para virus, a concentraciones que oscilaron de 0.015 a 0.160 unidades infecciosas en 100 ml. Los datos de ambos trabajos (1999 y 1982) son comparables porque se han obtenido utilizando las mismas técnicas de concentración (adsorción-elución a polvo de vidrio) y detección (línea celular BGM). Además, la media geométrica de CF en nuestras muestras fue de 4×10^3 cfp/100 ml, similar a la encontrada en las playas de esta misma área 10 años atrás antes de los planes de saneamiento del litoral (Vidal *et al.*, 1998). De esta forma justificamos la estrategia experimental planteada, búsqueda de muestras relativamente polucionadas (cercanas a focos de contaminación fecal como pe. salidas de los ríos Besós y Llobrega o emisarios), que nos ha evitado muchos resultados negativos y nos ha permitido discutir relaciones entre enterovirus, bacterias indicadoras y fagos fecales.

Por otro lado, en el laboratorio de Exeter (Reino Unido) en la primavera de 1999 analizaron muestras de playas y determinaron los niveles de indicadores bacterianos, bacteriófagos fecales y enterovirus cultivables en las mismas muestras (A. Gawler, com. pers.). Los virus (animales y de bacterias) fueron concentrados a partir de 10 litros por el método de adsorción a y elución de filtros electronegativos (membranas de 142 mm de nitrato de celulosa y porosidad 0.45 μ m) con la utilización de prefiltro. El 30 % de las playas aptas para el baño (<10-545 *E. coli*/100 ml) resultaron positivas para enterovirus (9 de 30 muestras), que se encontraron en concentraciones de 0.01 a 0.06 pfp en 100 ml. No se encontraron relaciones entre enterovirus y el resto de parámetros microbiológicos analizados. El significado sanitario de la presencia de estos virus en las aguas recreativas está por determinar.

Continuando con el análisis de nuestros resultados en relación con los fenómenos de dilución y/o inactivación, dos muestras (H e I, Tabla 5.13) presentaron un cociente SOM/CF próximo a 1 y la reducción logarítmica respecto al agua residual que sufrieron todos los microorganismos analizados fue similar (próxima a 2), por lo que podría decirse que ocurrió fundamentalmente dilución. Las muestras D y J, con los cocientes SOM/CF más altos registrados en este lote experimental (1.44 y 1.55 respectivamente), son un claro ejemplo de los fenómenos de inactivación o autodepuración que afectan de forma desigual a los distintos microorganismos. En dichas aguas donde ha ocurrido inactivación, la ordenación de los microorganismos según la reducción sufrida, de mayor a menor, es la que sigue: $CF > F\text{-RNA} > EF > BfRYC > ENT > SOM$ y coincide con el orden de inactivación encontrado en los experimentos de supervivencia "*in situ*".

De estos resultados obtenidos en el análisis de muestras naturales y de los experimentos de supervivencia "*in situ*" en el mar, se desprende que los coliformes fecales y los fagos F-RNA son los microorganismos indicadores más afectados por los fenómenos de inactivación en el medio marino. Los fagos F-RNA quedarían descartados como indicadores de contaminación vírica en el ambiente marino, pues incluso no fueron detectados en dos muestras que resultaron positivas para enterovirus (B y E, Figura 5.13). A diferencia de los fagos F-RNA, los fagos de *Bact. fragilis* estuvieron presentes en todas las muestras positivas para enterovirus.

Los colifagos somáticos se muestran como los microorganismos más persistentes en el mar, seguidos de los fagos de *Bact. fragilis* y los estreptococos fecales. Los enterovirus parecen resistir menos que los colifagos somáticos en el conjunto de muestras marinas analizadas, en concordancia a los experimentos de supervivencia realizados por varios autores (Borrego *et al.*, 1987; Callahan *et al.*, 1995). Aceptando que la reducción de microorganismos observada en las aguas naturales afectadas de contaminación fecal humana se debe a fenómenos de dilución y de autodepuración, es deseable que el microorganismo indicador sea más perdurable que el patógeno y que sea fácilmente cuantificable; precisamente a estos requerimientos responden los colifagos somáticos.

Las normativas para aguas de baño definen los estándares de calidad, que en el caso de la Unión Europea se centran básicamente en los coliformes fecales -100 cfp/100 ml, valor guía en la Directiva 76/160/CE- y en Estados Unidos en los estreptococos fecales -33 cfp/100 ml para aguas marinas según la EPA (1986). La consecución de estos valores umbrales, simplificando la situación real, implica las siguientes reducciones logarítmicas respecto al agua residual:

	Agua residual cfp/100 ml	Normativas cfp/100 ml	Reducción en el mar
CF	10^7	10^2	5 logaritmos
EF	10^6	10^2	4 logaritmos
Enterovirus	10^2 - 10^3 pfp/litro	0 pfp/10 litros*	4 logaritmos

*Directiva 76/160/CE

Para el cumplimiento con el estándar de enterovirus en la Directiva europea, se debe garantizar una reducción igual o superior a 4 logaritmos respecto al agua residual, tal y como muestra el esquema anterior. Si bien es cierto que la normativa exige una reducción superior del grupo coliforme, también es importante tener presente que estos microorganismos están sujetos a tasas de inactivación más elevadas. El concepto de "falsa seguridad" aparecería cuando en un agua apta para el baño ($CF < 100$ cfp/100 ml) aún podrían estar presentes microorganismos patógenos más resistentes.

Los EF parecen ser más adecuados como indicadores bacterianos que los CF en el medio marino (columna de agua y sedimentos) pero los estudios de supervivencia "*in situ*" han mostrado que son menos resistentes que los fagos de *Bact. fragilis* o los colifagos somáticos. La controversia radica en la elección de uno de estos dos grupos de fagos para asegurar la calidad del agua recreativa.

	Agua residual pfp/100 ml	Reducción mínima de 4 logaritmos	Agua de mar pfp/100 ml
• SOM	10^6	→	10^2
• BfRYC2056	10^4	→	1-0.1

Los enterovirus no parecen sobrevivir mejor que los fagos de *Bact. fragilis* en el medio marino (Jofre *et al.*, 1986; Gironés, 1986; Lucena *et al.*, 1994) pero la detección de fagos de *Bact. fragilis* en 100 ml sí que podría alertar de la posible presencia de otros virus entéricos. Así, un test de presencia/ausencia de fagos de *Bact. fragilis* RYC2056 en 100 ml informaría de la presencia o no de contaminación fecal humana más o menos persistente. Por otro lado, la cuantificación de colifagos somáticos permite valorar reducciones superiores a 4 logaritmos. En este sentido, la enumeración de colifagos en 10 ml sería suficiente para determinar el grado de dilución y autodepuración sufrido por los microorganismos de origen fecal. Queda claro que los fagos de *Bact. fragilis* presentan la ventaja de la especificidad y que el grupo de colifagos somáticos aporta la ventaja metodológica. Abandonamos la discusión de este apartado con la pregunta, ¿en el medio marino, cuantificación de colifagos somáticos o detección de fagos de *Bact. fragilis*?

5.5 CONCLUSIONES

1. El potencial de los bacteriófagos para la determinación de la calidad microbiológica de las aguas de baño merece ser considerado, ya que su comportamiento en las aguas naturales es diferente al comportamiento de los indicadores bacterianos y, por tanto, aportan información adicional interesante.
2. En el mar, los coliformes fecales son los microorganismos indicadores que exhiben una tasa de supervivencia más baja; en el lado opuesto de resistencia se sitúan las esporas de clostridios sulfito-reductores que persisten periodos prolongados en ambientes acuáticos (agua y sedimentos). Los enterococos fecales se inactivan más lentamente que los coliformes fecales. En sedimentos marinos, el predominio de los enterococos fecales sobre los coliformes fecales es más evidente que en la columna de agua.
3. Los bacteriófagos F-específicos de RNA son el grupo de fagos entéricos que más rápidamente se inactiva en el medio marino, con tasas de decaimiento ligeramente inferiores a las de coliformes fecales. Los fagos que infectan a *Bacteroides fragilis* presentan tasas de supervivencia superiores a las de coliformes fecales y enterococos fecales. Los colifagos somáticos aparecen como el grupo de bacteriófagos de bacterias entéricas más resistente en ambientes marinos, aunque a poca distancia de los fagos de *Bact. fragilis*.
4. La reducción sufrida por los enterovirus cultivables en ambientes marinos relativamente contaminados respecto al agua residual, parece mayor que la observada para colifagos somáticos y menor que la constatada para fagos de *Bact. fragilis* RYC2056.
5. Los fagos de *Bact. fragilis* parecen ser el grupo de bacteriófagos más específico, principalmente en agua de mar con bajos niveles de *E. coli*. Debido a que este grupo de fagos se encuentra en bajas concentraciones en las aguas naturales, se requiere un paso previo de concentración para su detección.
6. Los colifagos somáticos permiten valorar el grado de dilución y/o inactivación sufrido por los microorganismos de origen fecal que llegan a las aguas de baño. Dada la sencilla metodología para su detección y los números encontrados (que en muchos casos pueden contarse en la muestra directa), los colifagos somáticos merecen ser considerados como potenciales indicadores.
7. Las relaciones numéricas entre bacterias y bacteriófagos aportan información adicional, sobretudo la relación colifagos somáticos:coliformes fecales, por lo que deberían ser consideradas como indicadores potenciales, aunque se requiere más información para poder definir criterios claros.

- aprox.: Aproximadamente.
- ATCC: *American Type Culture Collection*, colección americana de cultivos tipo.
- BE: *Beef extract*, extracto de carne.
- com. pers.: Comunicación personal.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico (ADN).
- dsDNA: DNA de doble cadena.
- EDAR: Estación depuradora de aguas residuales.
- EPA: *Environmental Protection Agency*.
- ETAP: Estación de tratamiento de aguas potables.
- ISO: *International Organization for Standardization*, Organización Internacional para la estandarización.
- NCTC: *National Collection of Type Cultures*, colección nacional de cultivos tipo.
- PNT: Procedimiento Normalizado de Trabajo.
- por ej.: Por ejemplo.
- RM: *Reference material*, material de referencia.
- RNA: Ácido ribonucleico (ARN).
- RNasa: Enzima que degrada el RNA.
- UE: Unión Europea.
- WHO: *World Health Organisation* (OMS: Organización Mundial de la Salud).

Microorganismos

- ϕ X174: Colifago somático de la familia *Microviridae*.
- B40-8: Bacteriófago de *Bact. fragilis* HSP40 (*Siphoviridae*).
- B56-1: Bacteriófago de *Bact. fragilis* RYC2056 (*Siphoviridae*).
- B56-3: Bacteriófago de *Bact. fragilis* RYC2056 (*Siphoviridae*).
- BfHSP: Bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis* HSP40.
- BfRYC: Bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis* RYC2056.
- CF: Coliformes fecales.
- CP: Esporas de clostridios sulfito-reductores.
- CT: Coliformes totales.
- EF: Enterococos fecales.

- ❑ ENT: Enterovirus cultivables sobre células BGM.
- ❑ F-DNA: Bacteriófagos F-específicos de DNA.
- ❑ F-RNA: Bacteriófagos F-específicos de RNA.
- ❑ F-TOT: Bacteriófagos F-específicos totales.
- ❑ MAR9: Colifago somático de la familia *Myoviridae*.
- ❑ MS2: Fago F-específico de RNA (*Leviviridae*).
- ❑ SOM: Colifagos somáticos.

Métodos

- ❑ BGM: Línea celular continua de riñón de mono verde (*Buffalo Green Monkey*).
- ❑ CC: Cultivo celular.
- ❑ DAL: *Double agar layer*, doble capa de agar.
- ❑ DO: Densidad óptica.
- ❑ DO₆₀₀: Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm.
- ❑ MF: *Membrane filtration*, filtración en membrana.
- ❑ MPN: *Most Probable Number*, número más probable.
- ❑ PCR: *Polimerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.
- ❑ RT-PCR: Retrotranscripción y PCR.

Términos estadísticos

- ❑ cv: Coeficiente de variación.
- ❑ max: Valor máximo de una serie.
- ❑ mg: Media geométrica.
- ❑ min: Valor mínimo de una serie.
- ❑ n: Número de casos (experimentos o muestras).
- ❑ NT: *Not tested*, análisis no realizado (tablas de resultados).
- ❑ sd: Desviación estándar.
- ❑ x: Media aritmética (promedio), también aparece como *media*.

Unidades de medida

- ❑ cfp: *Colony forming particles*, unidades formadoras de colonias equivalente a CFU o UFC.
- ❑ μm : Micrómetros.
- ❑ nm: Nanómetros.
- ❑ NTU: Unidades nefelométricas de turbidez.
- ❑ pfp: *Plaque forming particles*, unidades formadoras de calvas equivalente a PFU o UFP.
- ❑ r.p.m.: Revoluciones por minuto.

Laboratorios europeos

- ❑ IPL: *Institute Pasteur de Lille*.
- ❑ RIVM: *National Institute of Public Health and the Environment, Microbiological Laboratory for Health Protection, Bilthoven, The Netherlands*.
- ❑ UB: Universidad de Barcelona (Dep. Microbiología, Fac. Biología).

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

REFERENCIAS

... ..

... ..

1. **Abad, F.X.** (1994). Supervivencia y desinfección de virus entéricos en el ambiente. Tesis doctoral. Dep. Microbiología, Fac. Biología, UB.
2. **Akin, E.W., Benton, W.H. and Hill, W.F.** (1971). Enteric viruses in ground and surface waters: a review of their occurrence and survival. In *Viruses and water quality: occurrence and control*. Snoeyink, V. (ed.) p 59. Univ. of Illinois. Urbana-Champaign.
3. **Alcântara, F. and Almeida, M.A.** (1995). Virological quality of the Ria de Aveiro: validity of potential microbial indicators. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 29(3-4), 419-425.
4. **Alonso, MC., Sánchez, J.M., Moriñigo, M.A., and Borrego, J.J.** (1994). A direct membrane filter method for enumerating somatic coliphages in drinking water. *Microbiología SEM* 10, 285-296.
5. **American Public Health Association** (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA. Washington. D.C. USA.
6. **Araujo, R., Lasobras, J., Lucena, F. and Jofre, J.** (1993). Methodological improvements for the recovery of *B. fragilis* phages and coliphages from environmental samples. *Wat. Sci. Tech.* 27 (3-4), 119-122.
7. **Araujo, R., Lasobras, J., Puig, A., Lucena, F. and Jofre, J.** (1997). Abundance of bacteriophages of enteric bacteria in different freshwater environments. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 125-128.
8. **Araujo, R., Puig, A., Lasobras, J., Lucena, F. and Jofre, J.** (1997). Phages of enteric bacteria in fresh water with different levels of faecal pollution. *J. Appl. Microbiol.* 82, 281-286.
9. **Armon, R. and Kott Y.** (1993). A simple, rapid and sensitive presence/absence detection test for bacteriophage in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 490-496.
10. **Armon, R. and Kott Y.** (1995). Distribution comparison between coliphages and phages of anaerobic bacteria (*Bacteroides fragilis*) in water sources, and their reliability as fecal pollution indicators in drinking water. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 215-222.
11. **Armon, R., Araujo, R., Kott, Y., Lucena, F. and Jofre, J.** (1997). Bacteriophages of enteric bacteria in drinking water, comparison of their distribution in two countries. *J. Appl. Microbiol.* 83, 627-633.
12. **Armon, R., Arella, M. and Payment, P.** (1987). A highly efficient second-step concentration technique for bacteriophages and enteric viruses using ammonium sulfate and Tween 80. *Can. J. Microbiol.* 34, 651-655.
13. **Asghari, A., Farrah, S.R. and Bitton, G.** (1992). Use of hydrogen peroxide treatment and crystal violet agar plates for selective recovery of bacteriophages from natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(4), 1159-1163.
14. **Ayres, P.A.** (1977). Coliphages in sewage and the marine environment. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 6, 275-298.
15. **Bandaranayake, D.R., Turner, S.J., McBride, G.B., Lewis, G.D. and Till, D.G.** (1995). Health effects of bathing at selected New Zealand Marine Beaches. New Zealand.
16. **Battigelli, D.A., Sobsey, M.D. and Lobe, D.C.** (1993). The inactivation of Hepatitis A virus and other model viruses by UV irradiation. *Wat. Sci. Tech.* 27, 339-342.
17. **Berg, G.** (1983). Viral pollution of the environment. Editor Gerald Berg, Ph.D. CRC Press, Florida.

18. Bergh, Ø., Borsheim, K.Y., Bratbak, G. and Haldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340, 467-468.
19. Bitton, G. (1978). Survival of enteric viruses. In *Water pollution microbiology*. Mitchell, R. (ed.) Vol 2, p 273. Wiley. New York.
20. Bitton, G., Chang, L.T., Farrah, S.R. and Clifford, K. (1981). Recovery of coliphages from wastewater effluents and polluted lake water by the magnetite-organic flocculation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(1), 93-96.
21. Block, J.C. (1983). Viruses in environmental water. In *Viral pollution of the environment*. Berg, G. (ed.) p 117. CRC Press. Boca Raton.
22. Boehme, J., Frisher, M.E., Jiang, S.C., Kellogg, C.A., Pichard, S., Rose, J.B., Steinway, C. and Paul, J.H. (1993). Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97, 1-10.
23. Borrego, J.J. and Figueras, M.J. (1997). Microbiological quality of natural waters. *Microbiología SEM* 13, 413-426.
24. Borrego, J.J. and Romero, P. (1985). Coliphage survival in seawater. *Wat. Res.*, 19 (5), 557-562.
25. Borrego, J.J., Arrabal, F., Vicente A. de, Gómez, L.F. and Romero P. (1983). Study of microbial inactivation in the marine environment. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 55, 297-302.
26. Borrego, J.J., Córnaux, R., Moriñigo, M.A., Martínez-Manzanares, E. and Romero P. (1990). Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Wat. Res.* 24 (1), 111-116.
27. Borrego, J.J., Cornax, R., Preston, D.R., Farrah, S.R., McElhaney, B. and Bitton, G. (1991). Development and application of new positively charged filters for recovery of bacteriophages from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(4), 1218-1222.
28. Borrego, J.J., Moriñigo, M.A., De Vicente, A., Cornax, R. and Romero, P. (1987). Coliphages as indicator of faecal pollution in water: Its relationship with indicator and pathogenic microorganisms. *Wat. Res.* 21(12), 1473-1480.
29. Børsheim, Y., Bratbak, G. and Haldal, H. (1990). Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 352-66.
30. Bosch, A. (1995). The survival of enteric viruses in the water environment. *Microbiología SEM* 11: 393-396.
31. Bosch, A., Lucena, F., Gironés, R. and Jofre, J. (1986). Survey of viral pollution in Besos River. *J. Water Pollut. Control Fed.* 58, 87-91.
32. Bosch, A., Pintó, R.M., Blanch, A. and Jofre, J. (1988). Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Wat. Res.* 22(3), 343-348.
33. Bosch, A., Tartera, C., Gajardo, R., Diez, J.M. and Jofre, J. (1989). Comparative resistance of bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* to inactivation by chlorination or ultraviolet radiation. *Wat. Sci. Tech.* 21 (3), 221-226.
34. Bradley, G., Carter, J., Gaudie, D. and King, C. (1999). Distribution of the human faecal bacterium *Bacteroides fragilis*, its bacteriophages and their relationship to current sewage pollution indicators in bathing water. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 85, 90S-100S.

35. **Brock, T. D.** (1983). Membrane filtration. A User's Guide and Reference Manual. Springer-Verlag 1983.
36. **Brown, T.S., Malina, J.F. and Moore, B.D.** (1974). Virus removal by diatomaceous earth filtration. *J. Am. Water Works Assoc.* 66, 98-102.
37. **Burkhardt III, W., Calci, K.R., Watkins, W.D., Rippey, S.R. and Chirtel, S.J.** (2000). Inactivation of indicator microorganisms in estuarine waters. *Wat. Res.* 34(8), 2207-2214.
38. **Burrows, R. Neves, M.J.V., Larsen, T., Carratelli, E.P. and Veltri, P.** (1998). European attitude to the disposal of wastewater in the sea: the case for a (European) network for sea outfall research. *Wat. Sci. Tech.* 38 (12), 317-321.
39. **Cabelli, V.J.** (1983). Health effects criteria for marine recreational waters. Research Triangle Park, EPA, EPA-600/1-80-031, 98pp.
40. **Cabelli, V.J., Dufour, A.P., Levin, M.A., McCabe, L.J. and Haberman, P.W.** (1979). Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches. *Amer. J. Pub. Health* 69, 690-696.
41. **Cabelli, V.J., Dufour, A.P., McCabe, L.J. and Levin, M.A.** (1982). Swimming-associated gastroenteritis and water quality. *American Journal of Epidemiology*, 115(4) 606-616.
42. **Cabelli, V.J., Dufour, A.P., McCabe, L.J., Levin, M.A.** (1983). A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. *J. Water Pollut. Control Fed.* 55(10), 1306-1314.
43. **Callahan, K.M., Taylor, D.J. and Sobsey, M.D.** (1995). Comparative survival of hepatitis A virus, polioviruses and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 189-193.
44. **Camper, A.K., LeChevallier, M.W., Broadaway, S.C. and McFeters, G.A.** (1985). Evaluation of procedures to desorb bacteria from granular activated carbon. *Journal of Microbiological. Methods* 3, 187-198.
45. **Chapron, C.D., Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Frades, C.N. and Margolin, A.B.** (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the Information Collection Rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6), 2520-2525.
46. **Cheung, W.H.S., Hung, R.P.S., Chag, K.C.K. and Kleevens, J.W.L.** (1990). Epidemiological study of beach water pollution and health-related bathing water standards in Hong Kong. *Wat. Sci. Tech.* 23(1-3), 243-252.
47. **Cheung, W.H.S., Chang, K.C.K. and Hung, R.P.S.** (1991). Variations in microbial indicator densities in beach water and health-related assessment of bathing water quality. *Epidemiol. Infect.* 106, 329-344.
48. **Chung, H. and Sobsey, M.D.** (1993). Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Wat. Sci. Tech.* 27 (3-4), 425-429.
49. **Chung, H., Jaykus, L.A., Lovelace, G. and Sobsey, M.D.** (1998). Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. *Wat. Sci. Tech.* 38 (12), 37-44.
50. **Cochlan, W.P., Wikner, J., Steward, G.F., Smith, D.C. and Azam, F.** (1993). Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92, 77-87.
51. **Corbett, S.J., Rubin, G.L., Curry, G.K. and Kleinbaum, D.G.** (1993). The health effects of swimming at Sidney beaches. The Sydney Beach Users Advisory Group. *Am. J. Public Health* 83(12), 1701-1706.

52. Cornax, R., Moriñigo, M.A., Balebona, M.C., Castro, D. and Borrego, J.J. (1991) Significance of several bacteriophage groups as indicators of sewage pollution in marine waters. *Wat. Res.* 25(6), 673-678.
53. Cornax, R., Moriñigo, M.A., Paez, I.G., Muñoz, M.A. and Borrego J.J. (1990). Application of direct plaque assay for detection and enumeration of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* from contaminated water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10), 3170-3173.
54. Crabtree, K.D., Gerba, C.P., Rose, J.B. and Haas, C.N. (1997). Waterborne adenovirus: a risk assessment. *Wat. Sci. Tech.* 35 (11-12), 1-6.
55. CSIR (1995). Medical Research Council & Council for Scientific and Industrial Research (CSIR). Pathogenic micro-organisms/epidemiological-microbiological study. Fial report 1991-1995. South Africa.
56. Davies-Colley, R.J., Bell, R.G. and Donnison, A.M. (1994). Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms within sewage effluent diluted in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 2049-2058.
57. Debartolomeis, J. and Cabelli, V.J. (1991). Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1301-1305.
58. Desenclos, J.C., Klontz, K.C., Wilder, M.H., Naiman, O.V., Margolis, H.S. and Gunn, R.A. (1991). A multistate outbreak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. *Am. J. Public Health* 81, 1268-1272.
59. Díez, J.M. (1992). Detección de virus en muestras ambientales mediante sondas no radiactivas. Tesis doctoral. Dep. Microbiología, Fac. Biología. Universidad de Barcelona.
60. Doré, W.D., Henshilwood, K. and Lees, D.N. (1998). The development of management strategies for control of virological quality in oysters. *Wat. Sci. tech.*, 38(12), 29-35.
61. Dufour, A.P. (1984). Health effects criteria for fresh recreational waters. EPA 600/1-84-004, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268.
62. Dutka, B.J., El Shaarawi, A., Martins, M.T. and Sanchez, P.S. (1987). North and South American studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. *Wat. Res.* 21(9), 1127-1134.
63. EEC (1975). Directive du Conseil concernant la qualité des eaux de baignade du 8 decembre 1975. *Journal Officiel de Communantes Européennes*, L 31/1.
64. EEC (1994). Proposal for a council Directive concerning the quality of bathing waters (94/C112/03). Brussels.
65. El Sharkawi, F. and Hassan, MNER. (1979). The relation between the state of pollution in Alexandria swimming beaches and the occurrence of typhoid among bathers. *Bulletin of the High Institute of Public Health Alexandria*, IX, 337-351.
66. Enriquez, C.E. and Gerba, C.P. (1995). Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea and waste water. *Appl. Environ. Microbiol.* 29(11), 2554-2560.
67. Environmental Protection Agency (1986). Ambient water quality criteria for bacteria. EPA 44015-84-002.
68. Erb, P., Nasser, A.M. and Fattal, B. (1995). Detection of F+ bacteriophage in large volumes of water by a membrane filter method (MFM). *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 211-214.
69. Evison, L.M. (1988). Comparative studies on the survival of indicator organisms and pathogens in fresh and sea water. *Wat. Sci. Technol.* 20, 309-315.

70. Ewert, D.L. and Paynter, M.J.B. (1980). Technique for determining total bacterial virus counts in complex aqueous systems. . Appl. Environ. Microbiol 39(1), 253-260.
71. Farrah, S.R. (1982). Quematical factors influencing adsorption of bacteriophage MS2 to membrane filters. Appl. Environ. Microbiol. 43(3), 659-663.
72. Farrah, S.R. and Bitton, G. (1978). Elution of poliovirus adsorbed to membrane filters. Appl. Environ. Microbiol. 36(6), 982-984.
73. Farrah, S.R. and Preston, D.R.(1985). Concentration of viruses from water by using cellulose filters modified by in situ precipitation of ferric and aluminum hydroxides. Appl. Env. Microb. 50, 1502-1504.
74. Farrah, S.R., Gerba, C.P., Wallis, C. and Melnick, J.L. (1976). Concentration of viruses from large volumes of tap water using leated membrane fitters. Appl. Environ. Microbiol. 31, 221-226.
75. Farrah, S.R., Preston, D.R., Toranzos, G.A., Girard, M., Erdos, G.A. and Vasuhdivan, V. (1991). Use of modified diatomaceous earth for removal and recovery of viruses in water. Appl. Environ. Microbiol. 57(9), 2502-2506.
76. Fattal, B., Peleg-Olevsky Agurshy, T. and Shuval, H.I. (1987). The association between sea water pollution as measured by bacterial indicators and morbidity of bathers at Mediterranean beaches in Israel. Chemosphere 16, 565-570.
77. Ferley, J.P., Zmirou D. and Balducci, F. (1989). Epidemiological significance of microbiological pollution criteria for river recreational waters. International Journal of Epidemiology 18(1), 198-205.
78. Fewtrell, L. Godfree, A.F., Jones, F., Kay, D., Salmon, R.L. and Wyer, M.D. (1992). Health effects of white-water canoeing. Lancet, 339, June 27.
79. Fields, H.A. and Metcalf, T.G. (1975). Concentration of adenovirus from seawater. Water Res. 9, 357-364.
80. Figueras, M.J., Polo, F., Inza, I. and Guarro, J. (1997). Past, Present and Future Perspectives of the EU Bathing Water Directive. Marine Pollution Bulletin, Vol. 34, No. 3, pp 148-156.
81. Fleisher, J.M., Kay, D. Wyer, M. and Merrett H. (1996). The enterovirus test in the assessment of recreational water-associated gastroenteritis. Wat. Res. 30(10), 2341-2346.
82. Fleisher, J.M., Kay, D., Salmon, R.L., Jones, F., Wyer, M.D. and Godfree A.F. (1996). Marine waters contaminated with domestic sewage: nonenteric illnesses associated with bather exposure in the United Kingdom. American Journal of Public Health, 86(9), 1228-1234.
83. Ford, T.E. and Colwell, R.R. (1995). A global decline in microbiological safety of water: a call for action. A report from The American Academy of Microbiology.
84. Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. and Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth Report of the International Committe on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology. Supplementum 2. Springer-Verlag. Wien.
85. Fujioka, R.S. (1997). Indicators of marine recreational water quality. In Manual of environmental microbiology (Edited by Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V.), 176-183. ASM Press, Washington, D.C.
86. Fujito, B.T. and Lytle, C.D. (1996). Elution of viruses by ionic and nonionic surfactants. Appl. Environ. Microbiol. 62(9), 3470-3473.

87. **Gantzer, C., Lucena, F., Schwartzbrod, L. and Jofre, J.** (1998). Indicateurs de contamination virale du milieu hydrique: mythe ou réalité?. *Virologie*, 2(2): 117-125.
88. **Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M and Schwartzbrod, L.** (1998). Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11), 4307-4312.
89. **Genthe, B., Kfir, R. and Franck, M.** (1995). Microbial quality of a marine tidal pool. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 299-302.
90. **Gerba, C.P.** (1987). Phage as indicators of fecal pollution. In *Phage ecology*. (Edited by Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Bitton, G.), p. 197-209. Wiley series, New York.
91. **Gerba, C.P. and Schailberger, G.E.** (1975). The effect of particulates on virus survival in seawater. *J. Water Pollut. Control Fed.* 47, 93-103.
92. **Gerba, C.P., Farrah, S.R., Goyal, S.M., Wallis, C. and Melnick, J.L.** (1978). Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 35(3), 540-548.
93. **Gerba, C.P., Rose, J.B. and Singh, S.N.** (1985). Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 15, 213-236.
94. **Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N. and Crabtree, K.D.** (1996). Waterborne rotavirus: a risk assessment. *Wat. Res.* 30(12), 2929-2940.
95. **Gironés, R.** (1986). Supervivencia de virus entéricos humanos en aguas superficiales. Tesis doctoral. Dep. Microbiología, Fac. Biología, UB.
96. **Gironés, R., Jofre, J. and Bosch, A.** (1989). Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *J. Environ. Qual.* 18, 34-39.
97. **Gironés, R., Jofre, J., Bosch, A.** (1990). Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can. J. Microbiol.* 35, 1015-1021.
98. **Gironés, R., Puig, M., Allard, A., Lucena, F., Wadell, G. and Jofre, J.** (1995). Detection of adenovirus and enterovirus by PCR amplification in polluted waters. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 351-357.
99. **Godfree, A.F., Jones, F. and Kay, D.** (1990). Recreational water quality. The management of environmental health risks associated with sewage discharges. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 414-422.
100. **Godfree, A.F., Kay, D. and Wyer, M.D.** (1997). Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 83, 110S-119S.
101. **Goyal, S.M.** (1983). Indicators of viruses. In *Viral pollution of the environment*, ed. Berg, G. pp 211-230. Florida, CRC Press.
102. **Goyal, S.M.** (1987). Methods in phage ecology. In *Phage ecology*. (Edited by Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Bitton, G.), 267-287. Wiley series, New York.
103. **Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Melnick, J.L.** (1979). Human enteroviruses in oysters and their overlaying waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 572-581.
104. **Goyal, S.M., Zerda, K.S. and Gerba, C.P.** (1980). Concentration of coliphages from large volumes of water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 85-91.
105. **Grabow, W.O.K. and Coubrough, P.** (1986). Practical direct plaque assay for coliphages in 100 ml samples of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 430-433.
106. **Grabow, W.O.K., Holtzhausen C.S. and DeVilliers J.C.** (1993). Research on bacteriophages as indicators of water quality. Pretoria, South Africa, Water Research Commission. Project Report 321, 147pp.

107. **Grabow, W.O.K., Neubrech, T.E., Holtzhausen, C.S. and Jofre, J.** (1995). *Bacteroides fragilis* and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 223-230.
108. **Grant, W.D., and Long, P.E.** (1989). *Microbiología ambiental*. Editorial Acribia, S.A.
109. **Gray, J.J., Green, J., Cunliffe, C., Gallimore, C., Lee, J.V., Neal, K. and Brown, D.W.** (1997). Mixed genogroup SRSV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. *J. Med. Virol.* 52(4), 425-429.
110. **Guelin, A.** (1952). Application de la recherche des bacteriophages a l'étude des eaux polluees. I. La survie des enterobacteriacees dans les eaux. II. Bacteriophages des eaux a grandes et petites plages. *Ann. Ins. Pasteur, Paris.* 82, 78-89.
111. **Guillaud, J.F., Derrien, A., Gourmelon, M. and Pommepuy, M.** (1997). T90 as a tool for engineers: interest and limits. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 277-281.
112. **Guttman-Bass, N. and Catalano-Sherman, J.** (1985). Effects of Humic Materials on Virus Recovery from Water. *Appl. Envir. Microb.* 49(5): 1260-1264.
113. **Guttman-Bass, N. and Catalano-Sherman, J.** (1986). Humic Acid Interference with Virus Recovery by Electropositive Microporous Filters. *Appl. Env. Microb.* 52(3): 556-561.
114. **Haas, C.N., Rose, J.B. Gerba, C. and Regli, S.** (1993). Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Analysis* 13, 545-552.
115. **Haile, W. et al.** (1996). An epidemiological study of possible health effects of swimming in Santa Monica Bay. Final report. California.
116. **Hall, R.M. and Sobsey, M.D.** (1993). Inactivation of hepatitis A virus and MS2 by ozone and ozone-hydrogen peroxide in buffered water. *Wat. Sci. Tech.* 27, 371-378.
117. **Handford, P.M.** (1974). A new medium for the detection and enumeration of *C. perfringens* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 37, 559-570.
118. **Hara, S., Terauchi, K. and Koike, I.** (1991). Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(9), 2731-2734.
119. **Havelaar, A.H.** (1987). Bacteriophages as model organisms in water treatment. *Microbiol. Sci.* 12, 362-364.
120. **Havelaar, A.H.** (1993) A Bacteriophage standard for bathing waters?. Final report dd. 8 December 1993.
121. **Havelaar, A.H.** (1993). Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *ASM News* 59, 614-619.
122. **Havelaar, A.H. and Hogeboom, W.M.** (1984). A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 439-447.
123. **Havelaar, A.H., Furuse, K. and Hogeboom, W.M.** (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 255-262.
124. **Havelaar, A.H., Heisterkamp, S.H., Hoekstra, J.A. and Mooikman, K.A.** (1992). Performance characteristics of methods for the bacteriological examination of water. IAWPRc Water Quality International '92. Washington, D.C., 24-30 May 1992. Symposium on health related water microbiology. Keynote paper A. Final Draft D. 21-05-92.
125. **Havelaar, A.H., van Olphen, M. and Drost, Y.** (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2956-2962.

126. **Havelaar, H. A. and Pot-Hogbeboom W.M.** (1988). F-specific RNA-bacteriophages as model viruses in water hygiene: Ecological aspects. *Wat. Sci. Tech.* 20, 399-407.
127. **Hernández, J.F., Delattre, J. M. and Maier, E.A.** (1995). Sea water microbiology: performance of methods for the microbiologicla examination of bathing water Part I. Report EUR 16601 EN, pp. 52-56. European Commission, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
128. **Hernández, J.F., Guibert, J.M. Delattre, J.M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R. and Sinegre, F.** (1991). Miniaturized fluorogenic assay for enumeraion of *E. coli* and *Enterococci* in marine water. *Wat. Sci. Tech.* 24, 137-141.
129. **Hernández-Delgado, E.A. and Toranzos, G.A.** (1995). *In situ* replication studies of somatic and male-specific coliphages in a tropical pristine river. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 247-250.
130. **Hill, R.T., Knight, I.T., Anikis, M.S. and Colwell, R.R.** (1993). Benthic distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-ocean dump site. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 47-51.
131. **Hill, W.F., Jakubowski, W., Akin, E.W. and Clarke, N.A.** (1976). Detection of viruses in water: sensitivity of the tentative standard method for drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 254-261.
132. **HMSO** (1995). Methods for the isolation and identification of human enteric viruses. Methods for the examination of waters and associated materials. HMSO, London.
133. **Ho, B.S.W., Tam, T.-Y., Hutton, P. and Yam, W.C.** (1995). Detection and enumeration of *Giardia* cysts in river waters of Hong Kong by flocculation-percoll/sucrose gradient-immunofluorescence method. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 431-434.
134. **Homma, A., Sobsey, M.D., Wallis, C. and Melnick, J.L.** (1973). Virus concentration from sewage. *Water Res.* 7, 945-950.
135. **Hsu, F.-C., Shieh, Y.-S. C., Van Duin, J., Beekwilder, M.J. and Sobsey, M.D.** (1995). Genotyping male-specific RNA coliphages by hibridization with oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11), 3960-3966.
136. **Hurst C.J., Dahling, D.R., Safferman, R.S. and Goyke T.** (1984). Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. *Can. J. Microbiol.* 30, 1253-1263.
137. **Hurst, C.J.** (1997). Detection of viruses in environmental waters, sewage, and sewage sludges. In *Manual of environmental microbiology* (Edited by Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V.), 168-175. ASM Press, Washington, D.C.
138. **Hurst, C.J., Benton, W.H. and Stetler, R.E.** (1989). Detecting viruses in water. *J. Am. Water Works Ass.* 9, 71-80.
139. **Hurst, C.J., Gerba, C.P. and Cech, I.** (1980). Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl. Envir. Microb.* 40(6), 1067-1079.
140. **IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology** (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25: 529-545.
141. **ISO 10705-1** (1995). Water Quality -Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages.

142. ISO 10705-2. Water Quality -Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages.
143. ISO 10705-3. Water Quality -Detection and enumeration of bacteriophages. Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water.
144. ISO 10705-4. Water Quality -Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*.
145. **Jagals, P., Grabow, W.O.K. and de Villiers, J.C.** (1995). Evaluation of indicators for assessment of human and animal faecal pollution of surface run-off. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 235-241.
146. **Jiang, S.C. and Paul, J.H.** (1994). Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 104, 163-172.
147. **Jofre et al.** (1999). Occurrence and levels of bacteriophages and bacterial indicators in bathing water in the EU. European Union Contract n° SMT4-CT95-1603 (DG12-RSTM). University of Barcelona. Department of Microbiology. Spain; Institute Pasteur of Lille, Water & Environment Dpt, France and The National Institute of Public Health and the Environment (RIVM) Bilthoven, The Netherlands.
148. **Jofre, J.** (1991). Les bactériophages dans les milieux hydriques. . In *Virologie des milieux hydriques* (Coordinated by Louis Schwartzbrod), 253-276. Tec & Doc-Lavoisier, Paris.
149. **Jofre, J. et al.** (2000). Evaluation of methods for detecting bacteriophages in bathing waters in Europe. IAWQ. Health related water microbiology. Paris 2000 (conference).
150. **Jofre, J., Blasi, M., Bosch, A. and Lucena, F.** (1989). Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. *Wat. Sci. Tech.* 21(3), 15-19.
151. **Jofre, J., Bosch, A., Lucena, F., Gironés, R. and Tartera, C.** (1986). Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. *Wat. Sci. Tech.* 18 (10), 167-173.
152. **Jothikumar, N. and Cliver, D.O.** (1997). Elution and reconcentration of coliphages in water from positively charged membrane filters with urea-arginine phosphate buffer. *J. Virol. Methods* 65, 281-286.
153. **Jothikumar, N., Dwarkadas, A. and Khanna, P.** (1990). A simple elution and reconcentration technique for viruses concentrated on membrane filters from drinking water samples. *Water Res.* 24, 367-372.
154. **Jothikumar, N., Khanna, P., Paulmurugan, R., Kamatchiammal, S. and Padmanabhan, P.** (1995). A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 55, 401-415.
155. **Kapuscinski, R.B. and Mitchell, R.** (1980). Processes controlling virus inactivation in coastal waters. *Wat. Res.* 14, 363.
156. **Kapuscinski, R.B. and Mitchell, R.** (1983). Sunlight-induced mortality of viruses and *Escherichia coli* in coastal seawater. *Environ. Sci. Technol.* 17, 1-6.
157. **Kator, H. and Rhodes, M.** (1993). Evaluation of male-specific coliphages as candidate indicators of fecal contamination in point and nonpoint source impacted shellfish growing areas. Gloucester Point, VA: Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary.
158. **Katzenelson, E.** (1978). Survival of viruses. In *Indicators of viruses in water and food*. Berg, G. (ed.) 38-50. Ann Arbor Science Publishers.

159. **Katzenelson, E., Fattal, B. and Hostovesky, T.** (1976). Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 638-639.
160. **Kay, D., Wyer, M.D., Crowther, J. and Fewtrell, L.** (1999). Faecal indicator impacts on recreational waters: budget studies and diffuse source modelling. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 85, 70S-82S.
161. **Kay, d., Fleisher, J.M., Salmon, R.L., Wyer, M.D., Godfree, A.F., Zelenauch-Jacquotte, Z. and Shore, R.** (1994). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing; results from randomized exposure. *Lancet*, 344(8927), 905-909.
162. **Keefe, B. and Green, J.** (1989). Coliphages as indicators of faecal pollution at three recreational beaches on the Firth of Forth. *Wat. Res.* 23(8), 1027-1030.
163. **Keswick, B.H., Gerba, C.P., Dupont, H.L. and Rose, J.B.** (1984). Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl. Env. Microb.*, 47(6): 1290-1294.
164. **Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. and Betzer, N.** (1974). Bacteriophages as viral pollution indicators. *Wat. Res.* 8, 165-177.
165. **Kramer, M.H., Sørhage, F.E., Goldstein, S.T., Dalley, E., Wahlquist, S.P. and Herwaldt, B.L.** (1998). First reported outbreak in the United States of cryptosporidiosis associated with a recreational lake. *Clin. Infect. Dis.* 26(1), 27-33.
166. **Kueh, S.S.W., Tam, T-Y and Lee, T.** (1995). Epidemiological study of swimming-associated illnesses relating to bathing-beach water quality. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 1-4.
167. **Lainé, S., Poujol, T., Dufay, S., Baron, J. and Robert, P.** (1998). Treatment of stormwater to bathing water quality by dissolved air flotation, filtration and ultraviolet disinfection. *Wat. Sci. Tech.* 38 (12), 99-105.
168. **Lasobras, J.** (1997). Detección de bacteriófagos de bacterias entéricas asociados a sólidos en ambiente. Tesis doctoral, Dep. Microbiología, Fac. Biología. UB.
169. **Lasobras, J., Dellundé, J., Jofre, J. and Lucena, F.** (1999). Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *J. Appl. Microbiol.* 86, 723-729.
170. **Lasobras, J., Muniesa, M., Frías, J., Lucena, F. and Jofre, J.** (1997). Relationship between the morphology of bacteriophages and their persistence in the environment. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 129-132.
171. **Leclerc, M., Davriese, L.A., and Mossel, D.A.** (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 459-466.
172. **Lee, J.V., Dawson, S.R., Ward, S., Surman, S.B. and Neal, K.R.** (1997). Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 165-170.
173. **Legnani, P., Leoni, E., Lev, D., Rossi, R., Villa, G.C. and Bisbini, P.** (1998). Distribution of indicator bacteria and bacteriophages in shellfish and shellfish-growing waters. *J. Appl. Microbiol.* 85, 790-798.
174. **Levy, D.A., Bens, M.S., Craun, G.F., Calderon, R.L. and Herwaldt, B.L.** (1998). Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1995-1996. *Mor. Mortal. Wkly Rep. CDC Surveill. Summ.* 47(5), 1-34.
175. **Lewis, G.D.** (1995). F-specific bacteriophage as an indicator of human viruses in natural waters and sewage effluents in northern New Zealand. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 231-234.

176. **Li, J.W., Wang, X.W., Rui, Q.Y., Song, N., Zhang, F.G., Ou, Y.C. and Chao F.H.** (1998). A new and simple method for concentration of enteric viruses from water. *Journal of Virological Methods* 74, 99-108.
177. **Lightfoot, N.E.** (1989). A prospective study of swimming related illness at six freshwater beaches in Southern Ontario. Unpublished PhD Thesis. University of Toronto, Canada, 275 pp.
178. **Logan, K.G., Rees, G.E., Seeley, N.D. and Primrose, S.B.** (1980). Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: evaluation of positively charged, microporous filters. *J. Virol. Methods*, 1, 87-97.
179. **Lucena, F., Araujo, R. and Jofre, J.** (1996). Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. *Wat. Res.* 30 (11), 2812-2816.
180. **Lucena, F., Bosch, A., Gironés, R. i Jofre, J.** (1983). Virus entèrics a aigües urbano-industrials. *Treb. Soc. Cat. Biol.* 35, 71-79.
181. **Lucena, F., Bosch, A., Jofre, J. and Schwartzbrod, L.** (1985). Identification of viruses isolated from sewage, riverwater and coastal seawater in Barcelona. *Water Res.* 19(10), 1237-1239.
182. **Lucena, F., Divizia, M., Biziagos, E., Crance, J.M. and Deloince, R.** (1991). Extraction et concentration des virus des milieux hydriques. *In: Virologie des milieux hydriques* (Coordinated by Louis Schwartzbrod), 71-106. Tec & Doc-Lavoisier, Paris.
183. **Lucena, F., Finance, C., Jofre, J., Sancho, J. and Schwartzbrod, L.** (1982). Viral pollution determination of superficial waters (river water and seawater) from the urban area of Barcelona (Spain). *Water Res.* 16, 173-177.
184. **Lucena, F., Lasobras, J., McIntosh, D., Forcadell, M. and Jofre, J.** (1994). Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of *Bacteroides fragilis* phages and coliphages in mussels. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7), 2272-2277.
185. **Lucena, F., Lasobras, J., Muñoz, R., Araujo, R. and Jofre, J.** (1995). Bacteriophage persistence in the sea environment. *Wat. Sci. Tech.* 31 (5-6), 195-198.
186. **Lucena, F., Muniesa, M., Puig, A., Araujo, R., Jofre, J.** (1995). Simple concentration method for bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in drinking water. *J. Virol. Methods.* 54, 121-130.
187. **Lucena, F., Schwartzbrod, L. and Bosch, A.** (1986). The effect of a mass poliomyelitis vaccination program on the occurrence of enteroviruses in seawater. *Zbl. Bakt. Hyg. B* 183, 67-69.
188. **Lucena-Gutiérrez, Francisco** (1981). Aportación de una nueva metodología en la concentración de virus en aguas. Tesis doctoral. Dep. Microbiología, Fac. Biología, UB.
189. **Ma, J.F., Naranjo, J. and Gerba, C.P.** (1994). Evaluation of MK Filters for Recovery of Enteroviruses from Tap Water. *Appl. Env. Microb.*, 60(6), 1974-1977.
190. **Maiello, A., Guidetti, A., Poncetta, D., Ossola, O., Guidetti, L., Buttinelli, G., Fiore, L., Moiraghi and Ruggerini, A.** (1997). Enteroviruses in the recreational waters of lake Orta.
191. **Manero, A. and Blanch, A.** (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10), 4425-4430.
192. **Margaleff, R.** (1974). *Ecología. De. Omega.*

193. **Mariño, F.J., Martínez-Manzanares, E., Moriño, M.A. and Borrego, J.J.** (1995). Applicability of the recreational water quality standard guidelines. *Wat. Sci. Tech.* 31 (5-6), 27-31.
194. **Mariño, F.J., Moriño, M.A., Martínez-Manzanares, E. and Borrego, J.J.** (1995). Microbiological-epidemiological study of selected marine beaches in Malaga (Spain). *Wat. Sci. Tech.* 31 (5-6), 5-9.
195. **McIlvaine, T.C.** (1921). Buffer solutions for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49, 183.
196. **McLaughlin, M.R. and Rose, J.B.** (2000). Evaluation of the *Bacteroids fragilis* phage assay as an alternative indicator of sewage pollution. IWA. Health related water microbiology. Paris, 2000.
197. **Melnick, J.L.** (1991). Structure and classification of viruses, In: Belshe, R.B. (editor). *Textbook of human virology*, 2nd ed. St Louis: Mosby Year Book, 1-23.
198. **Méndez, J.** (1999). Validación de un método de concentración, aplicado a aguas de bebida, de colifagos somáticos, bacteriófagos F-específicos ARN, bacteriófagos de *Bacteroides fragilis* HSP40 y de *Bacteroides fragilis* RYC2056. Según la normativa ISO/WD 10705-3:1996. Máster en Biología experimental, UB.
199. **Metcalf, T.G., Melnick, J.L. and Estes, M.K.** (1995). Environmental virology. from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology- a trip of over 50 years. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:461-487.
200. **Miller, A.J., Eblen, B.S., Oser, A. and Burkhardt III, W.** (1998). Application and evaluation of male-specific bacteriophage as a process integrity or faecal contamination indicator in a pork slaughterhouse environment. *J. Appl. Microbiol.* 85, 898-904.
201. **Mooijman, K.A. and Havelaar, A.H.** (1997). Application of microbiological (certified) Reference Materials. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 467-470.
202. **Mooijman, K.A., Bahar, M. and Havelaar, H.A.** (1999). Detection and enumeration of F-specific bacteriophages. Bilthoven, The Netherlands: National Institute of Public Health and the Environment (RIVM). Report n° 285690. 36 pp.
203. **Moriño, M.A., Cornax, R., Muñoz, A., Romero, P. and Borrego J.J.** (1990). Relationships between *Salmonella* spp and indicator microorganisms in polluted natural waters. *Wat. Res.* 24(1), 117-120.
204. **Moriño, M.A., Wheeler, D., Berry, C., Jones, C., Muñoz, M.A., Cornax, R. and Borrego J.J.** (1992). Evaluation of different bacteriophage groups as faecal indicators in contaminated natural waters in southern England. *Wat. Res.* 26(3), 267-271.
205. **Morris, R.** (1991). The EC bathing water virological standard: is it realistic? *Wat. Sci. Tech.* 24, 49-52.
206. **Morris, R. and Waite, W.M.** (1980). Evaluation of procedures for recovery of viruses from water. *Wat. Res.* 14, 791-793.
207. **Mossel, D.A.A.** (1982). Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. *Antonie van Leeuwenhoek* 48, 609-611.
208. **Mujeriego J.** (1989). Quality of recreational waters: current knowledge and future perspectives. In: Wheeler D. Richardson M.L., Bridges J. (editors). *Watershed '89 -The future for water quality in Europe*. Oxford: Pergamon Press, 71-85.

209. **Mujeriego, R., Bravo, J.M. and Feliu, M.T.** (1982). Recreation in coastal waters, public health implications. VIèmes Journées Etud. Polluions, Cannes, CIESM, 585-94.
210. **Muniesa, M.** (1998). Bacteriófagos portadores del gen de la toxina Stx-2 en aguas. Tesis doctoral. Dep. Microbiología, Fac. Biología, UB.
211. **Muniesa, M., Lucena, F. and Jofre, J.** (1999). Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J. Appl. Microbiol.* 87.
212. **Murrin, K. and Slade, J.** (1997). Rapid detection of viable enteroviruses in water by tissue culture and semi-nested Polimerase Chain Reaction. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 429-432.
213. **Muscillo, M., Aulicino, F.A., Patti, A.M., Orsini, P., Volterra, L. and Fara, G.M.** (1994). Molecular techniques for the identification of enteric viruses in marine waters. *Wat. Res.* 28(1), 1-7.
214. **Muscillo, M., Carducci, A., La Rosa, G., Cantiani, L. and Marianelli, C.** (1997). Enteric virus detection in Adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis. *Wat. Res.* 31(8), 1980-1984.
215. **Nicand, E., Teyssou, R., Buisson, Y.** (1998). Le risque fécal viral en 1998. *Virologie* 2(2): 103-116.
216. **Nieuwstad, ThJ., Havelaar, H.A. and Van Olphen, M.** (1991). Hydraulic and microbiological characterization of reactors for ultraviolet disinfection of secondary wastewater effluent. *Wat. Res.* 25, 775-783.
217. **Nieuwstad, ThJ., Mulder, E.P., Havelaar, H.A. and Van Olphen, M.** (1988). Elimination of microorganisms from wastewater by tertiary precipitation followed by filtration. *Wat. Res.* 22, 1389-1397.
218. **Norme XP T 90-451** (1996). Recherche des enterovirus: Méthode par concentration sur laine de verre et détection par culture cellulaire. AFNOR, Tour Europe, 92049 Paris La Défense Cedex, France, March 1996.
219. **Padan, E., Shilo, M. and Kislev, N.** (1967). Isolation of "cyanophage" from freshwater ponds and their interaction with *Plectonema boryanum*. *Virology* 32, 234-246.
220. **Pallin, R., Wyn-Jones, A.P., Place, B.M. and Lightfoot, N.F.** (1997). The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Met.* 67, 57-67.
221. **Palmateer, G.A., Dutka, B.J., Janzen, E.M., Meissner, S.M. and Sakellaris, M.G.** (1991). Coliphage and bacteriophage as indicators of recreational water quality. *Wat. Res.* 25 (3), 355-357.
222. **Papageorgiou, G., Mocé-Llivina, L., Méndez, J., Akkelidou, D., Lucena, F. and Jofre, J.** (2000). Counting culturable virus adsorbed to cellulose nitrate membrane filters as a simple method for counting viruses in raw sewage and sewage effluents. IAWQ. Health related water microbiology. Paris 2000 (poster).
223. **Papageorgiou, G.T., Mocé-Llivina, L., Christodoulou, C.G., Lucena, F., Akkelidou, D., Ioannou, E. and Jofre, J.** (2000). A simple methodological approach for counting and identifying culturable viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(1), 194-198.
224. **Patti, A.M., Aulicino, F.A., Santi, A.L., Muscillo, M., Orsini, P., Bellucci, C., La Rosa, G., Mastroeni, I. and Volterra, L.** (1996). Enteric virus pollution of Tyrrhenian areas. *Water, Air and Soil Pollution* 88, 261-267.

225. **Paul, J.H., Jiang, S.C. and Rose, J.B.** (1991). Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8), 2197-2204.
226. **Paul, J.H., Rose, J.B., Jiang, S.C., London, P., Xhou, X. and Kellogg, C.** (1997). Coliphage and indigenous phage in Mamala Bay, Oahu, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(1), 133-138.
227. **Paul, J.H., Rose, J.B., Jiang, S.C., Kellogg, C. A. and Dickson, L.** (1993). Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 718-724.
228. **Payment, P. and Franco, E.** (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2418-2424.
229. **Pike, E.B.** (1994). Health effects of sea bathing (WMI 9021) – Phase III: Final report to the Department of the Environment. Report N° DoE 3412/2, pub. Water Research Centre plc, Medmenham, UK, 1-38.
230. **Pina, S. Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. and Gironés, R.** (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (9), 3376-3382.
231. **Piriou, Ph. CIRSEE** (1996). Protocole de comparaison de l'efficacité des cuves a ultrasons pour le décrochage des biofilms.
232. **Preston, D.R., Vasudevan, T.V., Bitton, G., Farrah, S.R. and Morel, J-L** (1988). Novel approach for modifying microporous filters for virus concentration from water. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6), 1325-1329.
233. **Primrose, S. B. and Day, M.** (1977). Rapid concentration of bacteriophages from aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.* 42, 417-421.
234. **Primrose, S.B., Seeley N.D., Logan, K.B. and Nicolson, J.W.** (1982). Methods for studying aquatic bacteriophage ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(3), 694-701.
235. **Public Health Laboratory Service** (1959). Sewage contamination of coastal bathing waters in England and Wales: a bacteriological and epidemiological study. *J. of Hygiene* 43, 435-472.
236. **Puig, A.** (1998). Influència de l'hoste en la recuperació de bacteriòfags de *Bacteroides fragilis* en el medi ambient. Tesis doctoral. Dep. Microbiologia, Fac. Biologia, UB.
237. **Puig, A., Jofre, J. and Araujo, R.** (1997). Bacteriophages infecting various *Bacteroides fragilis* strains differ in their capacity to distinguish human from animal faecal pollution. *Wat. Sci. Tech.* 35 (11-12), 359-362.
238. **Puig, A., Queralt, N., Jofre, J. and Araujo, R.** (1999). Diversity of *Bacteroides fragilis* strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4), 1772-1776.
239. **Puig, M.** (1998). Caracterització molecular dels bacteriòfags de *Bacteroides fragilis*, proposats com a possibles indicadors de contaminació fecal vírica d'origen humà. Tesis doctoral. Dep. Microbiologia. Fac. Biologia, UB.
240. **Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A. Wadell, G. and Gironés, R.** (1994). Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Waters by nested PCR Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(8), 2963-2970.

241. **Rajala, R.L. and Heinonen-Tanski, H.** (1998). Survival and transfer of faecal indicator organisms of wastewater effluents in receiving lake waters. *Wat. Sci. Tech.* 38 (12), 191-194.
242. **Rao, V.C. and Melnick, J.L.** (1986). Environmental virology. American Society for Microbiology.
243. **Rathbone, P.A., Livingstone, D.J. and Calder, M.M.** (1998). Surveys monitoring the sea and beaches in the vicinity of Durban, South Africa: a case study. *Wat. Sci. Tech.* 38 (12), 163-170.
244. **Rees, G.** (1993). Health implications of sewage in coastal waters –the British case. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 14-19.
245. **Regli, S., Rose, J.B., Haas, C.N. and Gerba, C.P.** (1993). Modeling the risk from *Giardia* and viruses in drinking water. *J. Am. Wat. Works Assoc.* 83, 76-84.
246. **Reynolds, K.A., Gerba, C.P. and Pepper, I. L.** (1995). Detection of enteroviruses in marine waters by direct RT-PCR and cell culture. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 31, no. 5-6, pp. 323-328.
247. **Reynolds, K.A., Gerba, C.P. and Pepper, I.L.** (1996). Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1424-1427.
248. **Rheinheimer, G.** (1992). Aquatic Microbiology, 4 th edition. Wiley.
249. **Ribas, F.** (1991). Detección de virus entéricos en aguas naturales y potabilizadas y en residuos del proceso de potabilización. Tesis doctoral. Departament de Microbiologia UB-AGBAR.
250. **Ribas, F., Huguet, J.M. and Perramon, J.** (1986). Controle d'entérovirus dans l'approvisionnement à Barcelone par l'eau de surface du fleuve Llobregat. *Aqua.* 1, 33-44.
251. **Rippey, S.R. and Watkins, W.D.** (1992). Comparative rates of disinfection of microbial indicator organisms in chlorinated sewage effluents. *Wat. Sci. Tech.* 26, 2185-2189.
252. **Rose, J., Haas, C.N. and Regli, S.** (1991). Risk assessment and control of waterborne giardiasis. *Am. J. Pub. Hlth* 1, 709-713.
253. **Rose, J.B. and Sobsey, M.D.** (1993). Quantitative risk assessment for viral contamination of shellfish and coastal waters. *J. Food Protect.* 56, 1043-1050.
254. **Rose, J.B., Dickson, L.J., Farrah, S.R. and Carnahan, R.P.** (1996). Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Wat. Res.* 30(11), 2785-2797.
255. **Rose, J.B., Singh, S.N. Gerba, C.P. and Kelley, L.M.** (1984). Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5), 989-992.
256. **Sabater-Tobella, J. y Vilumara-Torrallardona, A.** (1988). Buenas prácticas de laboratorio (GLP). Ediciones Díaz de Santos, S.A.
257. **Sabatino, C.M. and Maier, S.** (1980). Differential inactivation of three bacteriophages by acid and alkaline pH used in the membrane adsorption-elution method of virus recovery. *Can. J. Microbiol.* 26, 1403-1407.
258. **Sackett, D.L., Haynes, R.B., Guyatt, G.H., Tugwell, P.** (1992). Epidemiología clínica. Ciencia básica para la medicina clínica 2ª ed., Cap 4: Interpretación de los datos diagnósticos. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires.
259. **Saliba, L.J. and Helmer, R.** (1990). Health risks associated with pollution of coastal bathing waters. *Wld hlth statis. quart.* 43, 177-187.

260. **Schaper, M. and Jofre, J.** (2000). Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *J. Virol. Methods* 89, 1-10.
261. **Schulze, E. and Lenk, J.** (1983). Concentration of coliphages from drinking water by $Mg(OH)_2$ flocculation. *Naturwissenschaften*. E. 70, S. 612 (1983). Springer-Verlag.
262. **Schwab, K.J., De Leon, R. and Sobsey, M.D.** (1995) Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2): 531-537.
263. **Schwab, K.J., De Leon, R. and Sobsey, M.D.** (1996). Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6): 2086-2094.
264. **Schwartzbrod, J., Lucena, F., Bosch, A., Beril, C., Schwartzbrod, L. and Pares R.** (1987). The role of continental and waste water in microbiological contamination of marine sediment. *Journal Français d'Hydrologia*, 18(2-3), 141-156.
265. **Schwartzbrod, L. and Lucena-Gutiérrez, F.** (1978). Concentration des entérovirus dans les eaux par adsorption sur poudre de verre: proposition d'un appareillage simplifié. *Microbia* 4, 55-58.
266. **Seeley, N.D. and Primrose, S.B.** (1979). Concentration of bacteriophages from natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 46, 103-116.
267. **Seeley, N.D. and Primrose, S.B.** (1982). The isolation of bacteriophages from the environment. *J. Appl. Bacteriol.* 53, 1-17.
268. **Seyfried, P.L., Tobin, R.S., Brown, N.E. and Ness, P.F.** (1985). A prospective study of swimming related illness. I. Swimming associated health risk. *American Journal of Public Health* 75(9), 1068-1070.
269. **Shields, P.A., and Farrah, S.R.** (1983). Influence of salts on electrostatic interactions between poliovirus and membrane filters. *Appl. Env. Microb.* 45(2), 526-531.
270. **Shields, P.A., and Farrah, S.R.** (1986). Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(1), 211-213.
271. **Shields, P.A., Ling, T.F., Tjatha, V., Shah, D.O. and Farrah, S.R.** (1986). Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating bacteriophages in water. *Wat. Res.* 20, 145-151.
272. **Simkova, A. and Cervenka, J.** (1981). Coliphages as ecological indicators of enteroviruses in various water systems. *Bull. WHO* 59, 611-618.
273. **Singh, S.N. and Gerba, C.P.** (1983). Concentration of coliphage from waer and sewage with charge-modified filter aid. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(1), 232-237.
- Cookson, J.T.** (1974). The chemistry of virus concentration by chemical methods. *Developments in Industrial Microbiology* 15, 160-173.
274. **Sinton, L.W., Davies-Colley, R.J. and Bell R.G.** (1994). Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2040-2048.
275. **Sinton, L.W., Donnison, A.M. and Hastie, C.M.** (1993). Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part II: Sanitary significance, survival, and use. *N. Zeal. J. Mar. Freshwat. Res.* 27, 117-137.

276. **Sinton, L.W., Finlay, R.K. and Lynch, P.A.** (1999). Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Env. Microb.* 65(8), 3605-3613.
277. **Sinton, L.W., Finlay, R.K. and Reid, A.J.** (1996). A simple filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100 ml water samples. *J. Microb. Meth.* 25, 257-269.
278. **Slade, J.S. and Ford, B.J.** (1983). Discharge to the environment of viruses in wastewater, sludges and aerosols. *In* Viral pollution of the environment. G. Berg Ed pp 3-18 CRC Press. Boca Raton, Florida.
279. **Sobsey, M.D. and Glass, J.S.** (1980). Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 201-210.
280. **Sobsey, M.D. and Glass, J.S.** (1984). Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5), 956-960.
281. **Sobsey, M.D. and Hickey, A.R.** (1985). Effects of Humic and Fulvic Acids on Poliovirus Concentration from Water by Microporous Filtration. *Appl. Env. Microb.* 49(2), 259-264.
282. **Sobsey, M.D. and Jaykus, L.A.** (1991). Human enteric viruses and depuration of bivalve molluscs. In: Otwell W.S., Rodrick, G.E., Martin, R.E. editors. *Molluscan shellfish depuration*. Boca Raton: CRC Press, 71-114.
283. **Sobsey, M.D. and Jones, B.L.** (1979). Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 588-595.
284. **Guttman-Bass, N., Hostovsky, N., Lugten, M. and Armon, R.** (1985). A comparison of current methods of poliovirus concentration from tap water. *Water Res.* 19, 85-88.
285. **Sobsey, M.D.**, (1997). Monitoring for Fecal Viruses in Ground Water.
286. **Sobsey, M.D., Schwab, K.J. and Handzel, T.R.** (1990). A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male-specific RNA coliphages. *Journal AWWA*, 52-59.
287. **Sobsey, M.D., Wallis, C. Henderson, M. and Melnick, J.L.** (1973). Concentration of enteroviruses from large volumes of water. *Appl. Microbiol* 26, 529-534.
288. **Sorber, C.A., Sagik, B.A. and Malina, J.F.** (1971). Monitoring of low-level virus in natural waters. *Appl. Microbiol.* 22, 334-338.
289. **Stetler, R.E.**, (1984). Coliphages as Indicators of Enterovirus. *Appl. Env. Microb.* 48(3), 668-670.
290. **Stevenson, A.H.** (1953). Studies of bathing water quality and health. *Am. J. Public Health* 43, 529-538.
291. **Straub, T.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P.** (1994). Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol* 40, 884-888.
292. **Sun, Z.P., Levi, Y., Kiene, L., Dumoutier, N. and Lucena, F.** (1997). Quantification of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in environmental water samples of Seine River. *Water, Air and Soil Pollution* 96, 175-183.
293. **Suttle, C.A.** (1994). The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. *Microb. Ecol.* 28, 237-243.
294. **Suttle, C.A. and Chen, F.** (1992). Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3721-372.

295. **Tartera, C.** (1986). Estudi dels bacteriòfags de *Bacteroides fragilis* com a indicadors de la contaminació fecal vírica. Tesis doctoral, Dep. Microbiologia, Fac. Biologia. UB.
296. **Tartera, C. and Jofre, J.** (1987). Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage polluted waters. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1632-1637.
297. **Tartera, C., Araujo, R., Michel, T. and Jofre, J.** (1992). Culture and Decontamination Methods Affecting Enumeration of Phages infecting *Bacteroides fragilis* in Sewage. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2670-2673.
298. **Tartera, C., Bosch, A. and Jofre, J.** (1988). The inactivation of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* by chlorine treatment and UV-irradiation. FEMS Microbiology Letters 56, 313-316.
299. **Tartera, C., Jofre, F. and Lucena, F.** (1988). Relationship between numbers of enteroviruses and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environmental samples. Environmental Technology Letters 9, 407-410.
300. **Tartera, C., Lucena, F. and Jofre, J.** (1989). Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 55 (10), 2696-2701.
301. **Thomas, D.N., Judd, S.J. and Fawcett, N.** (1999). Flocculation modelling: a review. Wat. Res. 33(7), 1579-1592.
302. **Thompson, S.S., and Yates, M.** (1999). Bacteriophage inactivation at the air-water-solid interface in dynamic batch systems. Appl. Environ. Microbiol. 65(3), 1186-1190.
303. **Tillett, H.E. and Lightfoot, N.F.** (1995). Quality control in environmental microbiology compared with chemistry: what is homogeneous and what is random?. Wat. Sci. Tech. 31(5-6), 471-477.
304. **Turner, S.J. and Lewis, G.D.** (1995). Comparison of F-specific bacteriophage, enterococci, and faecal coliform densities through a wastewater treatment process employing oxidation ponds. Wat. Sci. Tech. 31(5-6), 85-89.
305. **UNEP/WHO** (1983). Determination of fecal coliforms in sea-water by the membrane filtration culture method. Reference Method. Mar. Pollut. Stud. 2(Rev 1), 1-19. UNEP, Geneva. **Abad, F.X., Pintó, R.M., Villena, C., Gajardo, R. and Bosch, A.** (1997). Astrovirus survival in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 63 (8), 3119-3122.
306. **UNEP/WHO** (1988). Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and health effects. pub. United Nations Environment Programme; MAP Technical Reprt Series 20, Athens, Greece, 156pp. (Note: This study documents the same study as Fattal *et al.*, 1987).
307. **UNEP/WHO.** (1991). Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and rotavirus-induced gastroenteritis among bathers (1986-88). Athens, Greece, pub. United Nations Environment Programe. MAP Technical Report Series, 46, 64pp.
308. **UNEP/WHO.** (1991). Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on epidemiological study on bathers from selected

- beaches in Malaga, Spain (1988-1989), Athens, Greece, pub. United Nations Environment Programme. MAP Technical Report Series, 53, 127pp.
309. **Van Dijk, P.H.A., Lacey, R.F. and Pike, E.B.** (1996). Health effects of sea-bathing – further analysis of data from UK beach surveys. Final report to the Department of the Environment. Report N° 4126/3 DoE, 4126/3, Medmenham, UK, WRc plc.
 310. **Vidal, J.R., Jofre, J. and Lucena, F.** (1998). Is it possible to predict the time necessary for the recovery of water quality of a beach after a sporadic episode of faecal pollution?. IAWQ. Health related water microbiology. Vancouver, 1998 (conference).
 311. **Vilagines, P., Sarrette, B. and Vilagines, R.** (1982). Preformed magnesium hydroxide precipitate for second-step concentration of enteroviruses from drinking and surface waters. *Can J. Microbiol.* 28, 783-787.
 312. **Vilaginès, Ph. et al.** (1997). Round robin investigation of glass wool method for poliovirus recovery from drinking water and seawater. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 445-449.
 313. **Vilaginès, Ph., Sarrette, B., Husson, G. and Vilaginès, R.** (1993). Glass wool for virus concentration from water at ambient pH levels. *Wat. Sci. Tech.* 27(3-4), 299-306.
 314. **Vilaginès, Ph., Sarrette, B., Le Guyader, M., Cun, C. and Vilaginès, R.** (1997). Relationship between cultivable viruses, F-specific RNA phages and the principal fecal bacterial indicators in raw waters, treated wastewaters and surface waters. *Journal Européen d'Hydrologie* 28(2), 201-220.
 315. **Von Schirding, Y.E.R., Kfir, R., Cabelli, V., Franklin, L. and Joubert, G.** (1992). Morbidity among bathers exposed to polluted seawater. A prospective epidemiological study. *S. Afr. Med. J.* 81(6), 543-546.
 316. **Wait, D.A. and Sobsey, M.D.** (1983). Method for recovery of enteric viruses from estuarine sediments with chaotropic agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(2), 379-385.
 317. **Wanke, C.A. and Guerrant, R.L.** (1990). Viral hepatitis and gastroenteritis transmitted by shellfish and water. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 19, 435-438.
 318. **Ward, R.L., Knowlton, D.R. and Winston, P.E.** (1986). Mechanism of Inactivation of Enteric Viruses in Fresh Water. *Appl. Env. Microb.* 52(3), 450-459.
 319. **Wellings, F.M., Lewis, A.L. and Mountain, C.W.** (1976). Demonstration of solids-associated virus in wastewater and sludge. *Appl. Environ Microbiol.* 31, 354-358.
 320. **Wentsel, R.S., O'Neill, P.E. and Kitchens, J.F.** (1982). Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(2), 430-434.
 321. **West, P.A.** (1991). Human pathogenic viruses and parasites: emerging pathogens in the water cycle. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 70, 107S-114S.
 322. **WHO** (1974). WHO Technical Report Series N° 550, 1974 (Fish and shellfish hygiene: report of a WHO Expert Committee convened in cooperation with FAO).
 323. **WHO** (1997). Expert consultation on health impacts of recreational water and bathing beach quality, Bad Elster, Germany, 20-22 June 1996. EUR/ICP/EHPM 07 02 02, WHO EURO, Copenhagen.

324. **WHO** (1998). Guidelines for safe recreational-water environments. Vol 1: coastal and freshwaters. Draft for consultation, Genova October 1998. World Health Organization.
325. **Wichels, A., Biel, S.S., Gelderblom, H.R., Brinkhoff, T., Muyzer, G. and Schütt, C.** (1998). Bacteriophage diversity in the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11), 4128-4133.
326. **Wiggins, B.A. and Alexander, M.** (1985). Minimum bacterial density of bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 19-23.
327. **Willcox, R.M. and Fuhrman, J.A.** (1994). Bacterial viruses in coastal seawater: lytic rather than lysogenic production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114, 35-45.
328. **Wommack, K.E., Hill, R.T. and Colwell, R.R.** (1995). A simple method for the concentration of viruses from natural water samples. *J. Microbiol. Meth.* 22, 57-67.
329. **Wommack, K.E., Hill, R.T., Kessel, M., Russek-Cohen, E., and Colwell, R.R.** (1992). Distribution of viruses in the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2965-2970.
330. **Wommack, K.E., Hill, R.T., Muller, T.A. and Colwell, R.R.** (1996). Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4), 1336-1341.
331. **WTO** (1995). World Tourism Organisation, referencia tomada de WHO, 1998.
332. **Wyer, M.D., Fleisher, J.M., Gough, J. Kay, D. and Merrett, H.** (1995). An investigation into parametric relationships between enterovirus and faecal indicator organisms in the coastal waters of England and Wales. *Wat. Res.* 29(8), 1863-1868.
333. **Wyer, M.D., O'Neill, G., Kay, D., Crowther, J., Jackson, G. and Fewtrell, L.** (1997). Non-outfall sources of faecal indicator organisms affecting the compliance of coastal waters with Directive 76/160/EEC. *Wat. Sci. Tech.* 35(11-12), 151-156.
334. **Wyn-Jones, A.P., Pallin, R., Sellwood, J. and Tougianidou, D.** (1995). Use of the polymerase chain reaction for the detection of enteroviruses in river and marine recreational waters. *Wat. Sci. Tech.* 31(5-6), 337-344.
335. **Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawthore, L. and Treiber, G.** (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40, 734-744.
336. **Yates, M.V., Gerba, C.P. and Kelley, L.M.** (1985). Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(4), 778-781. **Belshe, R.B.** (1991). Textbook of human virology, 2nd ed. St Louis: Mosby Year Book (Belshe editor).

Anexo 1: Directiva 76/160/CEE

Legislación comunitaria vigente

DIRECTIVA DEL CONSEJO

de 8 de diciembre de 1975

relativa a la calidad de las aguas de baño

(76/160/CEE)

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS ,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y , en particular , sus artículos 100 y 235 ,

Vista la propuesta de la Comisión ,

Visto el dictamen del Parlamento Europeo (1) ,

Visto el dictamen del Comité económico y social (2) ,

Considerando que la protección del medio ambiente y de la salud pública exige reducir la contaminación de las aguas de baño y de la protección de éstas respecto de una ulterior degradación ;

Considerando que es necesario un control de las aguas de baño para alcanzar , en el funcionamiento del mercado común , los objetivos de la Comunidad en el ámbito de la mejora de las condiciones de vida , del desarrollo armónico de las actividades económicas en el conjunto de la Comunidad y de una expansión permanente y equilibrada ;

Considerando que en este ámbito existen determinadas disposiciones legales , reglamentarias o administrativas de los Estados miembros que tienen una incidencia directa sobre el funcionamiento del mercado común , pero que los poderes de acción necesarios en la materia no han sido previstos en el Tratado ;

Considerando que el Programa de acción de las Comunidades Europeas en materia de medio ambiente (3) prevé el establecimiento en común de objetivos de calidad que fijen los diferentes requisitos que debe reunir un medio y , en particular , la definición de los parámetros válidos para el agua , incluida el agua de baño ;

Considerando que para alcanzar dichos objetivos de calidad de los Estados miembros deberán fijar valores límite correspondientes a determinados parámetros ; que las aguas de baño deberán ajustarse a esos valores en un plazo de 10 años a partir de la notificación de la presente Directiva ;

Considerando que es necesario prever que las aguas de baño se considerarán , en determinadas condiciones , conformes con los valores de los parámetros correspondientes , incluso cuando un determinado porcentaje de muestras recogidas durante la temporada balnearia no respete los límites especificados en el Anexo ;

Considerando que para alcanzar cierta flexibilidad en la aplicación de la presente Directiva , los Estados miembros deberán contar con la posibilidad de prever excepciones ; que , sin embargo , estas excepciones no podrán ignorar las obligaciones que impone la protección de la salud pública ;

Considerando que los progresos de la técnica requieren una adaptación rápida de las prescripciones técnicas definidas en el Anexo ; que para facilitar la aplicación de las medidas necesarias a tal fin , es conveniente prever un procedimiento por el que se establezca una estrecha cooperación entre los Estados miembros y la Comisión en el seno de un Comité para la adaptación al progreso técnico ;

Considerando que la opinión pública manifiesta un creciente interés por las cuestiones

relativas al medio ambiente y a la mejora de su calidad ; que , por tanto , es conveniente informarle de manera objetiva acerca de la calidad de las aguas de baño ,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA :

Artículo 1

1 . La presente Directiva se refiere a la calidad de las aguas de baño , con excepción de las aguas destinadas a usos terapéuticos y de las aguas de piscina .

2 . Con arreglo a la presente Directiva , se entenderá por :

a) « aguas de baño » las aguas o parte de estas , continentales , corrientes o estancadas , así como el agua de mar , en las que el baño :

- esté expresamente autorizado por las autoridades competentes de cada Estado miembro , o

- no esté prohibido y se practique habitualmente por un número importante de bañistas ;

b) « zona de baño » el lugar donde se encuentren las aguas de baño ;

c) « temporada de baño » el período durante el cual sea previsible una afluencia importante de bañistas , teniendo en cuenta las costumbres locales , incluidas las eventuales disposiciones locales relativas a la práctica del baño , así como las condiciones meteorológicas .

Artículo 2

Los parámetros físicos, químicos y microbiológicos aplicables a las aguas de baño figuran en el Anexo que es parte integrante de la presente Directiva .

Artículo 3

1 . Los Estados miembros fijarán , para todas las zonas de baño o para cada una de ellas , los valores aplicables a las aguas de baño en lo que respecta a los parámetros que se indican en el Anexo .

En lo que se refiere a los parámetros para los que no figure ningún valor en el Anexo , los Estados miembros podrán no fijar valores en aplicación del párrafo primero en tanto no se hayan determinado las cifras .

2 . Los valores fijados en virtud del apartado 1 no podrán ser menos estrictos que los indicados en la columna I del Anexo .

3 . Cuando en la columna G del Anexo figure algún valor , con o sin valor correspondiente en la columna I del mismo Anexo , los Estados miembros tratarán de cumplirlo a modo de valor de guía , sin perjuicio de lo dispuesto en el artículo 7 .

Artículo 4

1 . Los Estados miembros adoptarán las disposiciones necesarias para que la calidad de las aguas de baño se ajuste a los valores límite fijados en virtud del artículo 3 en un plazo de diez años a partir de la notificación de la presente Directiva .

2 . Los Estados miembros velarán porque las zonas de baño habilitadas especialmente a tal fin que creen las autoridades competentes de los Estados miembros después de la notificación de la presente Directiva , los valores previstos en el Anexo se cumplan desde la apertura para el baño . No obstante , en las zonas de baño creadas en los dos años siguientes a dicha notificación no será necesario cumplir esos valores hasta el final de éste período .

3 . En casos excepcionales , los Estados miembros podrán conceder excepciones en lo que se refiere al plazo de diez años previstos en el párrafo 1 . Las justificaciones de estas excepciones , basadas en un plan de gestión de las aguas dentro de la zona de que se trate , deberán notificarse a la Comisión a la mayor brevedad y a más tardar en un plazo de seis años desde la notificación de la presente Directiva . La Comisión procederá a un examen en profundidad de estas justificaciones y , en su caso , presentará al Consejo propuestas adecuadas al respecto .

4 . En lo que se refiere al agua de mar próxima a fronteras , y a las aguas que atraviesen fronteras e influyan en la calidad de las aguas de baño de otro Estado miembro , los Estados ribereños determinarán de manera concertada las consecuencias que deban deducirse de los objetivos de calidad comunes establecidos para las zonas de baño . La Comisión podrá participar en dicha concertación .

Artículo 5

1 . A los efectos de la aplicación del artículo 4 , las aguas de baño se considerarán conformes con los párrafos correspondientes :

cuando las muestras de estas aguas , tomadas con arreglo a la frecuencia prevista en el Anexo en un mismo lugar de recogida , muestren que son conformes con los valores de los parámetros relativos a la calidad del agua de que se trate en :

- el 95 % de las muestras en el caso de parámetros conformes con los especificados en la columna I del Anexo ,
 - el 90 % de las muestras en los demás casos , excepto para los parámetros « coliformes totales » y « coliformes fecales » , cuyo porcentaje de las muestras podrá ser del 80 % .
- y cuando , en el 5 % , el 10 % o el 20 % de las muestras que , según los casos , no sean conformes :
- el agua no difiera en más del 50 % del valor de los parámetros considerados , con excepción de los parámetros microbiológicos , el pH y el oxígeno disuelto ,
 - las muestras sucesivas de agua tomadas con una frecuencia estadísticamente adecuada no difieran de los valores de los parámetros correspondientes .

2 . La superación de los valores previstos en el artículo 3 no se tendrá en cuenta en el cálculo de los porcentajes previstos en el párrafo 1 cuando sea consecuencia de inundaciones , catástrofes naturales o condiciones meteorológicas excepcionales .

Artículo 6

1 . Las autoridades competentes de los Estados miembros efectuarán los muestreos cuya frecuencia mínima se fija en el Anexo .

2 . Las muestras se tomarán en los lugares en los que la densidad media diaria de

bañistas sea más elevada . Las muestras se tomarán preferentemente a 30 centímetros por debajo de la superficie del agua , con excepción de las muestras de aceites minerales , que se tomarán en la superficie . La toma de muestras deberá iniciarse 15 días antes del comienzo de la temporada de baño .

3 . El examen local de las condiciones existentes aguas arriba en el caso de aguas continentales corrientes y de las condiciones ambientales en el caso de aguas continentales estancadas y del agua de mar deberá efectuarse minuciosamente y repetirse periódicamente a fin de determinar los datos geográficos y topográficos , el volumen y el carácter de todos los vertidos contaminantes y potencialmente contaminantes , así como sus efectos en función de la distancia con respecto a la zona de baño .

4 . Cuando la inspección efectuada por una autoridad competente o la recogida y el análisis de muestras revelen la existencia o la probabilidad de que existan vertidos de sustancias que puedan disminuir la calidad del agua de baño , será conveniente efectuar recogidas de muestras suplementarias . Asimismo , deberán efectuarse recogidas suplementarias cuando exista cualquier otro motivo para sospechar una disminución de la calidad del agua .

5 . Los métodos de análisis de referencia para los parámetros considerados se indican en el Anexo . Los laboratorios que utilicen otros métodos deberán garantizar que los resultados obtenidos son equivalentes o comparables a los indicados en el Anexo .

Artículo 7

1 . La aplicación de las disposiciones adoptadas en virtud de la presente Directiva no podrá en ningún caso tener por efecto permitir el aumento directo o indirecto de la degradación de la calidad actual de las aguas de baño .

2 . Los Estados miembros podrán en todo momento establecer libremente para las aguas de baño valores más estrictos que los previstos en la presente Directiva .

Artículo 8

Se prevén las siguientes excepciones a la presente Directiva :

a) para determinados parámetros señalados con el signo (0) en el Anexo , por razones de circunstancias meteorológicas o geográficas excepcionales ;

b) cuando las aguas de baño registren un enriquecimiento natural en determinadas sustancias que haga rebasar los límites fijados en el Anexo .

Se entenderá por enriquecimiento natural el proceso en virtud por el cual una masa de agua determinada recibe del suelo ciertas sustancias contenidas en éste , sin intervención del hombre .

En ningún caso , las excepciones previstas en el presente artículo podrán ignorar las obligaciones de protección de la salud pública .

Cuando un Estado miembro recurra a una excepción , informará inmediatamente de ello a la Comisión precisando los motivos y los plazos .

Artículo 9

Las modificaciones necesarias para adaptar la presente Directiva al progreso técnico se referirán :

- a los métodos de análisis ,
- a los valores paramétricos G e I que figuran en el Anexo .

Dichas modificaciones se adoptarán de conformidad con el procedimiento previsto en el artículo 11 .

Artículo 10

1 . Se crea un Comité para la adaptación al progreso técnico , denominado en lo sucesivo « Comité » , compuesto por representantes de los Estados miembros y presidido por un representante de la Comisión .

2 . El Comité establecerá su reglamento interno .

Artículo 11

1 . En caso de que se siga el procedimiento definido en el presente artículo , el presidente someterá las cuestiones al Comité , a iniciativa propia o a instancia del representante de un Estado miembro .

2 . El representante de la Comisión presentará al Comité un proyecto de las medidas que deberán adoptarse . El Comité emitirá su dictamen sobre este proyecto en un plazo que el presidente podrá fijar en función de la urgencia de la cuestión . El Comité se pronunciará por mayoría de cuarenta y un votos . Los votos de los Estados miembros se ponderarán con arreglo al párrafo 2 del artículo 148 del Tratado . El presidente no participará en la votación .

3 . a) La Comisión adoptará las medidas previstas cuando sean conformes con el dictamen del Comité .

b) Cuando las medidas previstas no sean conformes con el dictamen del Comité , o si no se hubiere recibido dictamen , la Comisión presentará sin demora al Consejo una propuesta relativa a las medidas que deberán adoptarse . El Consejo decidirá por mayoría cualificada .

c) Si transcurrido un plazo de tres meses a partir de la fecha en que la propuesta fue sometida al Consejo éste no hubiere decidido , la Comisión adoptará las medidas propuestas .

Artículo 12

1 . Los Estados miembros aplicarán las disposiciones legales reglamentarias y administrativas necesarias para cumplir la presente Directiva en un plazo de dos años a partir de su notificación . Informarán inmediatamente de ello a la Comisión .

2 . Los Estados miembros comunicarán a la Comisión el texto de las disposiciones básicas de Derecho interno que adopten en el ámbito regulado por la presente Directiva .

Artículo 13

Los Estados miembros comunicarán regularmente a la Comisión , y por primera vez transcurrido cuatro años desde la notificación de la presente Directiva , un informe de síntesis sobre las aguas de baño y sus características más significativas .

La Comisión publicará las informaciones obtenidas en la materia , con el consentimiento previo del Estado miembro interesado .

Artículo 14

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros .

Hecho en Bruselas , el 8 de diciembre de 1975 .

Por el Consejo

El Presidente

M. PEDINI

(1) DO n ° C 128 de 9 . 6 . 1975 , p. 13 .

(2) DO n ° C 286 de 15 . 12 . 1975 , p. 5 .

(3) DO n ° C 112 de 20 . 12 . 1973 , p. 3 .

ANEXO

REQUISITOS DE CALIDAD DE LAS AGUAS DE BAÑO

Requerimientos de la calidad microbiológica en la Unión Europea para las aguas de baño. Directiva del consejo de 8 de diciembre de 1975 (76/160/EEC).

	<i>Parámetros microbiológicos</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>Frecuencia mínima de muestreo</i>	<i>Métodos de análisis e inspección</i>
1	Coliformes totales / 100 ml	500	10 000	Quincenal (1)	Fermentación en tubos múltiples. Subcultivo de los tubos positivos a medio de confirmación. Recuento con arreglo al MPN (número más probable) o filtración en membrana y cultivo en un medio apropiado, por ejemplo, agar lactosado con tergitol, agar endo, caldo con teepol 0.4 %, subcultivo e identificación de las colonias sospechosas. Para los puntos 1 y 2, temperatura de incubación variable, según se busquen los coliformes totales o los coliformes fecales.
2	Coliformes fecales / 100 ml	100	2 000	Quincenal (1)	
3	Estreptococos fecales / 100 ml	100	-	(2)	Método de Litsky. Recuento con arreglo al MPN (número más probable) o filtración en membrana. Cultivo en un medio apropiado.
4	Salmonelas / litro	-	0	(2)	Concentración por filtración en membrana. Inoculación en medio estándar. Enriquecimiento, subcultivo en agar de aislamiento, identificación.
5	Enterovirus PFU / 10 litros	-	0	(2)	Concentración por filtración, por floculación o por centrifugación y confirmación.

G = guía, I = imperativo (obligatorio)

- (0) Superación de los límites previstos en caso de condiciones geográficas o meteorológicas excepcionales.
- (1) Cuando un muestreo efectuado en los años precedentes haya dado resultados considerablemente más favorables que los previstos en el presente Anexo y no se haya producido ninguna circunstancia que pueda haber disminuido la calidad de las aguas, las autoridades competentes podrán disminuir en un factor 2 la frecuencia de muestreo.
- (2) Concentración que deberán comprobar las autoridades competentes cuando una inspección efectuada en la zona de baño revele la posible presencia del parámetro o un deterioro de la calidad de las aguas.
- (3) Las autoridades competentes deberán comprobar estos parámetros cuando se registre tendencia a la eutrofización de las aguas.

	<i>Parámetros físico-químicos</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>Frecuencia mínima de muestreo</i>	<i>Métodos de análisis e inspección</i>
6	pH	-	6-9 (0)	(2)	Electrometría con calibración en los pH 7 y 9.
7	Color	-	Sin cambio anormal en el color (0)	Quincenal (1) (2)	Inspección visual o fotometría con patrones de la escala Pt. Co.
8	Aceites minerales mg/litro	≤ 0.3	Ausencia de película visible en la superficie del agua y ausencia de olor	Quincenal (1) (2)	Inspección visual y olfativa o extracción de un volumen suficiente y comprobación del peso del residuo seco.
9	Sustancias tensoactivas que reaccionan en presencia de azul de metileno mg/l (laryl-sulfato)	≤ 0.3	Ausencia de espuma persistente	Quincenal (1) (2)	Inspección visual o espectrofotometría de absorción con azul de metileno.
10	Fenoles (índices fenoles) mg/l C_6H_5OH	≤ 0.005	Ausencia de olor específico ≤ 0.05	Quincenal (1) (2)	Comprobación de la ausencia de olor específico debido al fenol o espectrofotometría de absorción. Método de la 4-aminoantipirina (4 A.A.P.).
11	Transparencia m	2	1 (0)	Quincenal (1)	Disco de Secchi.
12	Oxígeno disuelto % saturación de O_2	80-120	-	(2)	Método de Winkler o método electrométrico (oxigenómetro)
13	Residuos alquitranados y materias flotantes tales como maderas, plásticos, botellas, recipientes de vidrio, plástico o caucho y cualquier otro material. Restos o fragmentos.	Ausencia	-	Quincenal (1)	Inspección visual
14	Amoníaco mg / litro NH_4	-	-	(3)	Espectrofotometría de absorción, reactivo de Nessler, o método del azul indofenol.
15	Nitrógeno Kjeldahl mg / litro N	-	-	(3)	Metod de Kjeldahl

	<i>Otras sustancias consideradas como indicadoras de contaminación</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>Frecuencia mínima de muestreo</i>	<i>Métodos de análisis e inspección</i>
16	Pesticidas mg / litro (parathion, HCH, dieldrina)	-	-	(2)	Extracción mediante disolventes apropiados y determinación cromatográfica.
17	Metales pesados tales como: Arsénico As Cadmio Cd Cromo VI Cr VI Plomo Pb Mercurio Hg	-	-	(2)	Absorción atómica precedida eventualmente de extracción.
18	Cianuros mg / litro Cn	-	-	(2)	Espectrofotometría de absorción con ayuda de un reactivo específico.
19	Nitratos y fosfatos mg / litro NO_3 , PO_4	-	-	(2)	Espectrofotometría de absorción con ayuda de un reactivo específico.

Anexo 2: Detección y enumeración de bacteriófagos

Basado en el documento ISO 10705-1, corregido febrero 1997.

CALIDAD DEL AGUA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Parte 1: ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS F-ESPECÍFICOS DE RNA

1. OBJETIVO

Detección y enumeración de bacteriófagos F-específicos de RNA.

2. DEFINICIONES

Los bacteriófagos F-específicos son virus de bacterias capaces de infectar una cepa huésped específica con pili F o sexual. Producen calvas visibles (zonas claras) en un césped confluyente de la bacteria huésped crecida bajo condiciones de cultivo apropiadas. Para los fagos F-específicos de RNA el proceso infectivo es inhibido en presencia de 40 µg/ml (ocasionalmente 400) de RNasa en el medio.

Bacteriófagos F+ es lo mismo que bacteriófagos F-específicos.

Con el término "titular" nos referimos a enumerar los bacteriófagos de una muestra por el método de la doble capa de agar.

Bacteriófagos, virus de bacterias y "fagos" son términos sinónimos.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a todos los tipos de agua, sedimentos y lodos, así como sus diluciones. En el caso de números bajos de fagos, puede ser necesario un paso de concentración previo. El método también es aplicable a extractos de marisco.

La presencia de bacteriófagos F-específicos de RNA en una muestra de agua generalmente indica polución por agua residual contaminada con heces humana o animales. Su supervivencia en el ambiente, eliminación por los procesos de tratamiento de agua ampliamente utilizados y concentración o retención por marisco se parece a la de los virus entéricos de origen hídrico o alimenticio, por ejemplo los enterovirus, hepatitis A y rotavirus.

4. PRINCIPIO

La muestra se mezcla con un pequeño volumen de medio nutritivo semisólido. Se añade un cultivo de la cepa huésped y la mezcla se extiende sobre un medio nutritivo sólido. Una vez seca la capa de agar blando, las placas se incuban y al día siguiente se leen las calvas. Cuando es necesario, se lleva a cabo un examen simultáneo de placas en paralelo con RNasa añadida para confirmación por conteo diferencial. Los resultados se expresan en partículas formadoras de calvas por unidad de volumen (pfp/ml, pfp/l, etc.).

5. PRECAUCIONES

La cepa huésped utilizada es un mutante de *Salmonella typhimurium* de baja patogenicidad y debería ser manejada de acuerdo con los procedimientos de seguridad apropiados (nacionales o internacionales) para estas especies bacterianas. Los bacteriófagos F-específicos de RNA no son patógenos para el hombre ni animales pero son muy resistentes a la desecación. Se deben tomar precauciones apropiadas para evitar la contaminación cruzada de los materiales, particularmente cuando se examinan o manipulan cultivos de título alto o cuando se inoculan cultivos de la cepa huésped. Dichos procesos deberían realizarse en una vitrina o área separada del laboratorio.

El cloroformo es una sustancia carcinógena. Adoptar las medidas de seguridad necesarias o utilizar un método alternativo de eficacia equivalente.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Materiales básicos

Utilizar ingredientes de calidad uniforme y productos químicos de grado analítico para la preparación de los medios de cultivo y reactivos y seguir las instrucciones que se dan en el anexo. Para información sobre el almacenamiento ver ISO 8199. De forma alternativa, utilizar medio completo deshidratado y seguir estrictamente las instrucciones del fabricante.

Para la preparación de los medios, utilizar agua destilada o agua desionizada libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento bacteriano bajo las condiciones de trabajo, y en cumplimiento con ISO 3696.

6.2 Diluyente

Para hacer diluciones de la muestra, utilizar peptona salina u otro diluyente que cumpla con la ISO 6887 (Anexo)

6.3 Medios de cultivo y reactivos

6.3.1 Caldo de triptona, extracto de levadura y glucosa (TYGB)

6.3.2 Agar de triptona, extracto de levadura y glucosa (TYGA)

6.3.3 Agar blando de triptona, extracto de levadura y glucosa (ssTYGA)

6.3.4 Solución de ácido nalidíxico

6.3.5 Agar McConkey

6.3.6 RNasa de páncreas bovino, actividad específica aprox. 50 unidades/mg

6.3.7 Discos de antibiótico con ácido nalidíxico (130 µg; 9 mm) y kanamicina (100 µg; 9 mm)

6.3.8 Glicerol (glicerina)

6.3.9 Tampón de fagos

6.3.10 Peptona salina

6.3.11 Cloroformo

TYGB**Medio basal**

Tryptona	10 g
Extracto de levadura	1 g
NaCl	8 g
Agua destilada	1000 ml

- Ajustar pH de manera que después de autoclavar esté a 7.2 ± 0.1 a 25°C .
- Autoclavar a $(121 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.
- Guardar a 4°C en la oscuridad máximo 6 meses.

Solución calcio-glucosa

CaCl_2 anhidro	2.27 g
D-glucosa	10 g
Agua destilada	100 ml

- Disolver los ingredientes dentro de un contenedor estéril de volumen adecuado.
- Esterilizar por filtración a través de una unidad de filtración de membrana de $0.22\ \mu\text{m}$ (la solución estéril se puede guardar en tubos de plástico estériles de 10 ml).
- Guardar a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad máximo 6 meses.

Medio completo

Medio basal	50 ml
Solución calcio-glucosa	0.5 ml

- Añadir asépticamente la solución de calcio-glucosa al medio basal y mezclar bien. Se recomienda preparar cuando se vaya a utilizar. Si se prepara y no se utiliza inmediatamente, guardar en la oscuridad a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ máximo un mes.

TYGA**Medio base**

- Preparar igual como el medio líquido TYGB pero añadiendo a la lista de componentes agar (15 g por litro).
- Autoclavar.

Medio completo

Medio basal	1000 ml
Solución calcio-glucosa	10 ml

- Después de autoclavar y cuando está en forma líquida a unos 50 °C añadir 10 ml de la solución calcio-glucosa a un litro de agar TYGA en condiciones asépticas y distribuir en placas de petri de 9 cm. (opcionalmente también pueden utilizarse placas de 14 cm de diámetro) Dejar solidificar en una superficie plana. Guardar las placas en la oscuridad a $(5 \pm 3)^\circ \text{C}$ protegidas de la desecación máximo 6 meses.

Agar blando ssTYGA

Triptona	1 g
Extracto de levadura	0.1 g
NaCl	0.8 g
Agar	0.75 g
Agua destilada	100 ml

- Se distribuirá en volúmenes adecuados, según el volumen de agar blando que necesitamos en un día de trabajo. Es cómodo trabajar con botellas de 100 ml.
- Autoclavar.
- Dejar solidificar el agar en las botellas de Pirex y guardar en la oscuridad a $(5 \pm 3)^\circ \text{C}$ protegidas de la desecación máximo 6 meses.
- Cuando se necesite agar blando, se fundirá en el microondas (evitando que hierva) o en un baño maría. A una temperatura de $(48 \pm 2)^\circ \text{C}$ añadir **1 ml** de la solución de **calcio-glucosa en 100 ml** de medio y **0.4 ml** de solución de **ácido nalidíxico**.

Solución RNasa

Utilizar RNasa de páncreas bovino, actividad específica aprox. 50 unidades/mg (Kunitz).

RNasa	100 mg
Agua destilada	100 ml

- Disolver la RNasa en agua a 100 °C durante 10 min. (pe. en botella estéril de Pirex con 100 ml de agua destilada estéril, añadir los 100 mg de RNasa, cerrar la botella y meterla en un cazo con agua hirviendo).
- Distribuir 0.5 ml en eppendorfs estériles y guardar a $(-20 \pm 5)^\circ \text{C}$ máximo un año.

7. EQUIPO Y MATERIAL

Se utiliza equipamiento de laboratorio microbiológico que incluye:

- 7.1 Autoclave. Además de los materiales suministrados estériles, el vidrio y otros materiales se esterilizan a 121 °C durante 15 minutos.
- 7.2 Estufa o baño de agua a 37 °C (36 ± 2) equipado con un agitador rotatorio a (100 ± 10) rev min⁻¹.
- 7.3 Estufa a 55 °C para mantener temporalmente los agares fundidos.
- 7.4 Baño de agua controlado termostáticamente a 45 °C (45 ± 1).
- 7.5 Microondas para fundir el agar blando o baño de agua.
- 7.6 Congelador controlado a -20 °C (-20 ± 5).
- 7.7 Ultracongelador controlado termostáticamente a -70 °C (-70 ± 10).
- 7.8 Espectrofotómetro equipado con un filtro para el rango de 500 - 650 nm con un ancho de banda máximo de ± 10 nm, capaz de sostener cubetas de 1 cm de sección óptica y tubos de vidrio. En los trabajos experimentales que aparecen en esta memoria se ha utilizado un espectrofotómetro Spectronic 501 (Milton Roy Company).
- 7.9 pHímetro.
- 7.10 Frigorífico a 4 °C (5 ± 3)°C

Vidrio o material fungible estéril, incluyendo:

- 7.11 Placas de petri de 9 cm de diámetro (opcional: placas de 15 cm)
- 7.12 Pipetas automáticas de volumen graduable (40-200 µl, 200-1000 µl, 1000-5000 µl) y las puntas estériles adecuadas.
- 7.13 Pipetas Pasteur.
- 7.14 Botellas de vidrio de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml.
- 7.15 Unidades de filtración de membrana, tamaño de poro 0.2 µm, para descontaminar.
- 7.16 Viales de plástico de 1.5 ml de capacidad.
- 7.17 Varillas magnéticas.
- 7.18 Jeringas.
- 7.19 Tubos de plástico de 10 ml con tapón.
- 7.20 Tubos de cultivo de vidrio con tapones adecuados.
- 7.21 Frascos cónicos nefelométricos con brazo cilíndrico que encaje en el espectrofotómetro, de 250-300 ml con tapones de algodón o
- 7.22 cubetas para leer en el espectrofotómetro de 1 cm de sección óptica.
- 7.23 Asas de Drigalsky.

8. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS DE REFERENCIA

- Cepa huésped para la detección de fagos F-específicos de RNA:
Salmonella typhimurium cepa WG49, fagotipo 3 NaI^r (F' 42 lac::Tn5), NCTC 12484.
- Material de referencia (control positivo):
Bacteriófago MS2 (fago de la familia *Leviviridae*), NCTC 12487 o ATCC 15597-B1.

NOTA: Las cepas de la ATCC están disponibles en la “*American Type Culture Collection*”, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, U.S.A.
Las cepas NCTC están disponibles en el “*National Collection of Type Cultures*”, 61 Colindale Avenue, London NW9 6HT, England.

9. MUESTREO

Recogida y entrega de muestras al laboratorio de acuerdo con las normas ISO 8199, ISO 5667-1, ISO 5667-2 y ISO 5667-3.

10. PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES DE ENSAYO

10.1 Cultivo y mantenimiento de la cepa huésped WG49

El cultivo y mantenimiento de la cepa huésped implica distintas etapas que se resumen en la Figura .

10.1.1 Preparación de los cultivos stock ("*stock cultures*")

- Rehidratar el contenido de una botella liofilizada del cultivo de referencia de la cepa huésped en una pequeña cantidad de TYGB (pe. 3 ml) utilizando una pipeta Pasteur.
- Transferir la suspensión a un frasco cónico de 300 ml que contenga 50 (± 5) ml de TYGB.
- Incubar a (36 ± 2)°C durante (20 ± 4) horas en agitación ($100 \pm 10 \text{ min}^{-1}$)
- Añadir 10 ml de glicerol estéril (concentración final del 15-20 % v/v) y agitar bien.
- Distribuir en viales de plástico en alícuotas de 0.5 ml y guardar a (-70 ± 10)°C o en nitrógeno líquido.

NOTA: Este primer pase de la cepa huésped deberá guardarse como referencia en el laboratorio.

10.1.2 Preparación de los cultivos de trabajo ("*working cultures*")

- Descongelar un vial del cultivo stock (10.1.1) a temperatura ambiente (15-30)°C e inocular en una placa de agar McConkey de forma que se obtengan colonias aisladas.
- Incubar a (36 ± 2)°C durante (20 ± 4) horas. El contenido que sobra del vial del cultivo stock puede utilizarse para inocular más placas en el mismo día de trabajo (si fuera necesario), de no ser así se desechará como material contaminado.
- Añadir (50 ± 5) ml de TYGB en un frasco cónico de 300 ml y templar a temperatura ambiente por lo menos (el crecimiento será más rápido si el medio está templado a 37 °C).
- Seleccionar 3-5 colonias lactosa positivas de la placa de McConkey e inocular el material de cada una de estas colonias en el frasco con TYGB.
- Incubar durante (5 ± 1) h a (36 ± 2)°C en agitación.
- Añadir 10 ml de glicerol estéril y mezclar bien.
- Distribuir en viales de plástico en alícuotas de p.e. 1.2 ml y guardar a (-70 ± 10)°C máximo dos años.
- Controlar la calidad del cultivo de trabajo siguiendo las especificaciones en 10.3.

10.2 Calibración de las medidas de absorbancia por contaje de viables de la bacteria huésped

- Coger un vial del cultivo de trabajo (10.1.2) del ultracongelador y descongelar a temperatura ambiente (15-30 °C).
- Añadir 50 (± 5) ml de TYGB (y 0.5 ml de la solución de calcio-glucosa) en dos frascos cónicos nefelométricos y templar al menos a temperatura ambiente (el crecimiento será más rápido si el caldo es precalentado a 37 °C).
- Inocular uno de los frascos de TYGB con 0.5 ml de cultivo de trabajo.

- Ajustar el espectrofotómetro a 0 con el brazo lateral del frasco que no ha sido inoculado con bacteria (“blanco”) a una longitud de onda de 600 nm. En el caso de que no se disponga de nefelométricos con brazo lateral se transferirá de forma aséptica una porción del cultivo a una cubeta. El caldo o cultivo transferido a las cubetas para medir la absorbancia siempre se descartará una vez hecha la medición.
- Incubar los frascos a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ en agitación hasta unas 3.5 horas. Cada 30 minutos medir la absorbancia a $\lambda = 600\text{ nm}$ y retirar una alícuota de 1 ml para conteo de viables, asegurándose de que el frasco permanece el mínimo tiempo posible fuera del incubador.
- Diluir las alícuotas hasta 10^{-7} y contar las cfp en volúmenes de 1 ml de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} por el procedimiento estándar en agar nutritivo o TYGA, en duplicado. De forma alternativa se puede filtrar volúmenes de 1 ml de las mismas diluciones y contar las cfp por el proceso estándar de filtración en membrana en agar nutritivo o TYGA, en duplicado.
- Incubar a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (20 ± 4) horas. Contar el número de colonias totales dentro/encima de cada placa que contenga entre 30 y 300 colonias y calcular el número de cfp/ml (consultar ISO 8199 si fuera necesario).

NOTAS: Este proceso debería llevarse a cabo varias veces (2-3 veces) para establecer la relación entre las medidas de absorbancia y el conteo de colonias. Si se han obtenido suficientes datos, el trabajo posterior puede entonces basarse sólo en las medidas de absorbancia.

Si la densidad celular de aprox. 10^8 cfp/ml no se alcanza en 3.5 h de incubación, puede inocularse 1 ml del cultivo de trabajo en vez de 0.5 ml.

10.3 Control de calidad de la cepa huésped WG49

- Utilizar un cultivo preparado según se describe en 10.2.
- A $t = 0\text{ h}$ y $t =$ (tiempo necesario para alcanzar aprox. 10^8 cfp/ml), extender volúmenes de 0.1 ml de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en agar McConkey u otro medio adecuado que contenga lactosa, por duplicado.
- Incubar a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (20 ± 4) h.
- De las placas que contengan entre 30 y 300 colonias, contar el número de colonias lactosa positivas y negativas y calcular el porcentaje de colonias lactosa negativas.
- A $t =$ (tiempo necesario para alcanzar aprox. 10^8 cfp/ml), extender 0.1 ml de la dilución 10^{-1} en una placa de agar McConkey, colocar un disco con ácido nalidíxico (Nal) y un disco con kanamicina (Km) en las placas.
- Incubar a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (20 ± 4) h.
- Medir las zonas de inhibición alrededor de los discos de antibiótico.

La cepa huésped es aceptable si los siguientes criterios se cumplen, a $t =$ (tiempo necesario para alcanzar aprox. 10^8 cfp/ml):

Contaje en placa de TYGA	$7 - 40 \times 10^7$ cfp/ml
Colonias lactosa negativas (segregación del plásmido)	$< 8\%$
Zona de inhibición alrededor del disco de Nal	ausente
Disco de Km	$< 25\text{ mm}$ de diámetro

NOTA: También pueden utilizarse discos de antibiótico con un diámetro o concentración diferentes; en ese caso se fijará otro criterio para la zona de inhibición máxima alrededor del disco de Km.

Controlar la cepa huésped para la sensibilidad a los bacteriófagos F-específicos de RNA de la siguiente forma:

- A partir de un cultivo fágico de **MS2** de título alto, preparar series de dilución decimal y plaquear de acuerdo con 11.1 pero utilizar la cepa huésped *E. coli* K-12 Hfr (NCTC 12486 o ATCC 23631). Guardar las diluciones a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ toda la noche.
- Contar el número de calvas y preparar 100 – 1000 ml de una suspensión de MS2 en peptona salina que contenga aprox 100 pfp/ml.
- Añadir 5 % (v/v) de glicerol.
- Distribuir en viales de plástico en alícuotas de 2.4 ml y guardar a $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ o a $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$.
- Descongelar 2 viales a temperatura ambiente, combinar en un tubo y plaquear volúmenes de 1 ml en duplicado con las cepas *E. coli* K-12 Hfr y WG49 de acuerdo a 11.1.
- Contar el número de calvas en cada placa y calcular la recuperación sobre WG49 relativa a la cepa de *E. coli*. Aceptar WG49 si la recuperación es $> 80 \%$.

11. PROCEDIMIENTO

11.1 Preparación de los cultivos inóculo

- Coger un vial del cultivo de trabajo del ultracongelador y dejar a temperatura ambiente $(15-30)^\circ\text{C}$.
- Añadir 50 (± 5) ml de TYGB en un frasco cónico nefelométrico o frasco liso y templar al menos a temperatura ambiente (el crecimiento será más rápido si el caldo es precalentado a $37 ^\circ\text{C}$). En condiciones asépticas, añadir 0.5 ml de la solución de calcio-glucosa.
- Inocular el TYGB con 0.5 ml de cultivo de trabajo. No olvidar de hacer un blanco en las mismas condiciones que el cultivo para hacer el 0 en el espectrofotómetro. Incubar a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ en agitación. Medir la absorbancia cada 30 min. A la absorbancia que corresponda a una densidad celular de aprox. 10^8 cfp/ml (basada en los datos obtenidos en 10.2) coger el cultivo inóculo del incubador y utilizar inmediatamente o enfriarlo rápidamente poniéndolo en hielo fundente. Utilizar este cultivo inóculo en dos horas. Es esencial que el cultivo sea rápidamente enfriado para evitar la pérdida de los pili F por las células, pues influiría negativamente en la recuperación de los fagos F-específicos.

11.2 Proceso estándar. Método de la doble capa de agar (DAL).

- Preparar un cultivo inóculo como se describe en 11.1.
- Permitir que la muestra se equilibre con la temperatura ambiente $(15-30)^\circ\text{C}$.
- Fundir botellas de ssTYGA de 100 ml en un baño con agua hirviendo o en el microondas y dejar en un baño de agua a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. De forma aséptica, añadir 1 ml de la solución de calcio-glucosa y 0.4 ml de la solución de ácido nalidíxico (concentración final de nalidíxico de 100 $\mu\text{g/ml}$) templados a temperatura ambiente.

- Preparar tubos con 2.5 ml de ssTYGA y añadir 1 ml de muestra (directa, concentrada o diluida) equilibrada a temperatura ambiente. Cada alícuota se ha de analizar al menos por duplicado. Añadir 1 ml del cultivo inóculo (en fase exponencial) a cada tubo que contiene el agar blando y la muestra.
- Mezclar con cuidado evitando la formación de burbujas de aire y dispensar el contenido del tubo en una capa de TYGA en placa de Petri de 90 mm precalentada a temperatura ambiente. Distribuir uniformemente, dejar solidificar en una superficie horizontal y fría.
- Hacer al menos dos **controles negativos** para cada tanda de análisis (control de agar y bacteria huésped: 2.5 ml de agar blando ssTYGA y 1 ml del cultivo inóculo de *S. typhimurium* WG49 en fase exponencial) uno antes de empezar con el análisis de las muestras y otro después de toda la serie. También se recomienda hacer un control de peptona salina o del diluyente que se haya utilizado para comprobar ausencia de bacterias y bacteriófagos (2.5 ml de agar blando y 1 ml del diluyente y 2.5 ml agar blando, 1 ml diluyente y 1 ml de la bacteria huésped).
- Hacer al menos un **control positivo** para cada tanda de análisis con el fago MS2 (2.5 ml de agar blando ssTYGA, 1 ml del material de referencia y 1 ml del cultivo inóculo) al final de toda la serie.
- Incubar las placas boca abajo a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (18 ± 2) horas. No amontonar más de seis placas.
- Contar el número de calvas en cada placa dentro de las 4 horas siguientes después de finalizar la incubación.

NOTAS: La adición de cultivo inóculo frío o de muestra fría al ssTYGA puede conducir a una caída brusca de la temperatura y a la solidificación del medio. Para evitarlo, precalentar el cultivo inóculo y la muestra a temperatura ambiente antes de añadirlos a los tubos que contienen ssTYGA.

El ácido nalidíxico es estable al calor. Puede ser añadido al agar blando fundido a partir de una solución esterilizada por filtración o bien puede ser añadido antes de autoclavar el agar.

11.3 Test de confirmación

Se utiliza RNasa para comprobar que los fagos detectados son F-RNA y no F-DNA o somáticos de *Salmonella*. En paralelo a la serie de placas descritas en 11.2, preparar series similares con solución RNasa añadida a los tubos de ssTYGA a una concentración final de 40 µg/ml (esto es 100 µl de solución de RNasa a 2.5 ml de ssTYGA en un tubo, o bien 4 ml de solución RNasa a 100 ml de agar blando).

Los tests de confirmación deberán llevarse a cabo al menos:

- cuando se examinen nuevos puntos de muestreo,
- regularmente en puntos de muestreo fijados cuando N_{RNasa}/N sea usualmente menor al 10 %,
- siempre en puntos de muestreo fijados cuando N_{RNasa}/N es usualmente $> 10\%$ (más de un 10 % de fagos crecidos en las placas que contienen RNasa respecto a los fagos encontrados en las placas sin RNasa)
- si se observan regularmente calvas grandes, circulares y claras con bordes lisos (probablemente fagos somáticos de *Salmonella*).

NOTA: En casos raros los fagos de RNA pueden no ser inhibidos por la RNasa a 40 µg/ml y puede ser necesario incrementar la concentración de RNasa a 400 µg/ml.

11.4 Muestras con bajos números de fagos

Proceder de acuerdo a 11.2 pero con las siguientes modificaciones:

- 10 ml de ssTYGA ya preparado con la solución de Ca-glucosa y el ácido nalidíxico, 1 ml del cultivo inóculo de *S. typhimurium* WG49 y 5 ml de la muestra.
- Verter sobre una placa de petri de 14 cm de diámetro que contiene TYGA completo (cada una de estas placas contiene aprox. 50 ml de medio).

Al menos analizar cada muestra por duplicado.

NOTA: Este procedimiento permitirá detectar una partícula formadora de calva en 50 ml o 100 ml, si se inoculan en paralelo 10 ó 20 placas. Debido al alto consumo de medio de cultivo, puede ser conveniente utilizar métodos de concentración que también serían necesarios para contajes aun más bajos.

11.5 Test presencia/ausencia (“test de la gota”)

Para el test presencia/ausencia en una muestra de 1 ml proceder de la siguiente forma:

- Tomar un vial de cultivo de trabajo de *S. typhimurium* WG49 del ultracongelador y permitir que se equilibre a temperatura ambiente.
- Añadir 25 ml (± 2.5 ml) de TYGB en un frasco y precalentar al menos hasta temperatura ambiente (mejor a 37 °C).
- Añadir asépticamente 250 μ l de la solución de calcio-glucosa (a temperatura ambiente), y 0.25 ml de cultivo de trabajo al frasco que contiene el TYGB.
- Incubar a (36 ± 2) °C en agitación durante aproximadamente 3 horas.
- Añadir 1 ml de la muestra o dilución (a temperatura ambiente) y continuar la incubación durante (18 ± 2) h.
- Transferir 1 ml del cultivo a un tubo de centrifuga, añadir 0.4 ml de cloroformo, mezclar bien (agitar vigorosamente) y centrifugar a 3000 g durante 5 min.
- Preparar un cultivo inóculo tal y como se describe en 11.1.
- Fundir botellas de 50 ó 100 ml de ssTYGA en un baño de agua hirviendo o al microondas y dejar en un baño de agua a (45 ± 1) °C. Añadir asépticamente la solución de calcio-glucosa (500 μ l en 50 ml ó 1000 μ l en 100 ml de agar blando ssTYGA) y el ácido nalidíxico (200 μ l en 50 ml ó 400 μ l en 100 ml de ssTYGA).
- Distribuir alícuotas de 2.5 ml de agar blando en tubos estériles con tapón (mantener en un baño a (45 ± 1) ° C).
- A cada tubo añadir 1 ml del cultivo inóculo, mezclar con cuidado evitando la formación de burbujas de aire y verter el contenido en una capa de TYGA en una placa de petri de 9 cm de diámetro previamente calentada a temperatura ambiente. Distribuir uniformemente, permitir que solidifique en una superficie horizontal y fría. Esperar a que la capa superior solidifique.
- Colocar una gota del cultivo tratado con cloroformo en la placa inoculada utilizando un capilar fino o una pipeta. No dañar la capa superior de agar. Dejar que la gota se seque.
- Incubar las placas boca abajo a (36 ± 2) °C durante (18 ± 2) h.
- Observar si en la placa hay una zona clara en el área donde cayó la gota. La zona clara indica la presencia de fagos F-específicos en la muestra original.

NOTA: Este procedimiento puede también utilizarse en forma de NMP (ISO 8199) o para examinar muestras más grandes. En el último caso, utilizar un volumen de

TYGB doble concentrado (doble cantidad de ingredientes en la misma cantidad de agua utilizada para TYGB simple; añadir un volumen proporcional de la solución de calcio-glucosa) igual al volumen de muestra. Asegurarse de que la mezcla está bien aireada durante el enriquecimiento (el volumen de muestra y medio no ha de ser superior al 20 % de la capacidad nominal del frasco cónico).

Se puede poner más de una gota en la superficie de una placa inoculada.

Este proceso puede dar lugar a suspensiones fágicas con un elevado título. Tomar las precauciones apropiadas, como trabajar en una cabina de flujo o en un área separada del laboratorio, para prevenir contaminación cruzada de las muestras o cultivos stock.

11.6 Valoración de la calidad

11.6.1 Proceso de conteo de calvas (11.2 – 11.4)

Con cada serie de muestras, examinar un blanco de proceso utilizando diluyente estéril como muestra y un control de referencia de MS2, preparado como se explica en 10.3.

Descongelar viales del control de referencia de MS2 antes de utilizar y plaquear de acuerdo a los procesos explicados en 11.2. Colocar los resultados en una carta de control. Opcionalmente puede utilizarse también una muestra control de referencia contaminada naturalmente, utilizando agua residual o agua superficial, diluida a una concentración de partículas formadoras de calvas de aprox. 100 / ml en peptona salina y 5 % (v/v) de glicerol y conservada a $(-70 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ o $(-20 \pm 5)^{\circ}\text{C}$. Descartar las muestras control de referencia si la concentración de fagos RNA disminuye.

11.6.2 Test presencia/ausencia (11.5)

Preparar una muestra control como se describe en 10.3 con una concentración de partículas formadoras de calvas de MS2 de aproximadamente 5 / ml. Examinar al menos una muestra control en paralelo con cada serie de muestras analizadas, esperando obtener un resultado positivo. Para examinar posibles efectos de interferencia de las muestras, considerar también la adición de muestra control a un segundo cultivo de enriquecimiento conteniendo muestra.

12. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

12.1 Contaje de calvas

Seleccionar placas con calvas bien separadas y que contengan entre 30 y 300 calvas. Si sólo se encuentran contajes por debajo de 30 calvas por placa, seleccionar las placas inoculadas con el volumen de muestra más grande. A partir del número de calvas contadas, y teniendo en cuenta los resultados de los tests de confirmación con RNasa, calcular el número de partículas formadoras de calvas ("*plaque-forming particles*") de bacteriófagos F-específicos de RNA en 1 ml de muestra de la siguiente forma:

$$\text{pfp/ml} = \frac{N - N_{\text{RNasa}}}{n} \times F$$

pfp/ml número confirmado de partículas formadoras de calvas de bacteriófagos F-específicos de RNA por ml,

N	número total de calvas contadas sobre la cepa WG49 en placas sin RNasa,
N_{RNasa}	número total de calvas contadas sobre la cepa WG49 en placas con RNasa,
n	número de réplicas,
F	factor de dilución (o concentración).

12.2 Test presencia/ausencia

Expresar los resultados como “fagos F-específicos de RNA (no) detectados en V ml”, siendo V el volumen de muestra analizada.

13. INFORME

El informe debe contener las indicaciones siguientes:

- la referencia a este protocolo;
- cualquier detalle necesario para la identificación completa de la muestra;
- si se ha utilizado un test de confirmación y el radio de N_{RNasa}/N (como porcentaje);
- los resultados expresados de acuerdo al punto 12;
- cualquier otra información relevante para el método.

14. BIBLIOGRAFÍA

Este protocolo de trabajo se corresponde con la norma

ISO 10705-1. Amended version February 1997. Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages.

Basado en el documento ISO/DIS 10705-2, versión corregida, enero 1999.

CALIDAD DEL AGUA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

Parte 2: ENUMERACIÓN DE COLIFAGOS SOMÁTICOS

1. OBJETIVO

Detección y enumeración de colifagos somáticos.

2. DEFINICIONES

Los colifagos somáticos son virus de bacterias capaces de infectar cepas huésped de Escherichia coli seleccionadas (y cepas relacionadas) por adhesión a la pared celular bacteriana como primer paso del proceso de infección. Producen calvas visibles (zonas claras) en un césped confluyente de la bacteria huésped crecida bajo condiciones de cultivo apropiadas.

Con el término “titular” nos referimos a enumerar los bacteriófagos de una muestra por el método de la doble capa de agar.

Bacteriófagos, virus de bacterias y “fagos” son términos sinónimos.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a todos los tipos de agua, sedimentos y lodos, así como sus diluciones. En el caso de números bajos de fagos, puede ser necesario un paso de concentración previo. El método también es aplicable a extractos de marisco.

4. PRINCIPIO

La muestra se mezcla con un pequeño volumen de medio nutritivo semisólido. Se añade un cultivo de la cepa huésped y la mezcla se extiende sobre un medio nutritivo sólido. Una vez seca la capa de agar blando, las placas se incuban y al día siguiente se leen las calvas. Los resultados se expresan en partículas formadoras de calvas por unidad de volumen (pfp/ml, pfp/l, etc.).

5. PRECAUCIONES

La cepa huésped utilizada no es patogénica para el hombre ni animales. Los colifagos somáticos no son patógenos para el hombre ni animales pero algunos tipos son muy resistentes a la desecación. Se deben tomar precauciones apropiadas para evitar la contaminación cruzada de los materiales, particularmente cuando se examinan o manipulan cultivos de título alto o cuando se inoculan cultivos de la cepa huésped. Dichos procesos deberían realizarse en una vitrina o área separada del laboratorio.

El cloroformo es una sustancia carcinogénica. Adoptar las medidas de seguridad necesarias o utilizar un método alternativo de eficacia equivalente.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Materiales básicos

Utilizar ingredientes de calidad uniforme y productos químicos de grado analítico para la preparación de los medios de cultivo y reactivos y seguir las instrucciones que se dan en el anexo. Para información sobre el almacenamiento ver ISO 8199. De forma alternativa, utilizar medio completo deshidratado y seguir estrictamente las instrucciones del fabricante.

Para la preparación de los medios, utilizar agua destilada o agua desionizada libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento bacteriano bajo las condiciones de trabajo, y en cumplimiento con ISO 3696.

6.2 Diluyente

Para hacer diluciones de la muestra, utilizar peptona salina u otro diluyente que cumpla con la ISO 6887 (Anexo)

6.3 Medios de cultivo y reactivos

- 6.3.1 Caldo modificado de Scholten-MSB
- 6.3.2 Agar modificado de Scholten-MSA
- 6.3.3 Agar blando modificado de Scholten-ssMSA
- 6.3.4 Solución de ácido nalidíxico
- 6.3.5 Agar McConkey
- 6.3.6 Glicerol (glicerina)
- 6.3.7 Tampón de fagos
- 6.3.8 Peptona salina
- 6.3.9 Cloroformo

Caldo modificado de Scholten (MSB)

Peptona	10 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de carne	12 g
NaCl	3 g
Solución Na_2CO_3 (150g/l)	5 ml
Solución Mg	0.3 ml
Agua destilada	1000 ml

- Ajustar el pH de forma que después de autoclavar esté a 7.2 ± 0.2 a 25°C .
- Autoclavar a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ durante 15 min.
- Guardar a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ en la oscuridad máximo 6 meses.

Preparación de la solución de MgCl_2

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 g
Agua destilada	50 ml

- La concentración final de Mg^{2+} en esta solución será 4.14 mol/l.
- Esterilizar por autoclave.
- Guardar a temperatura ambiente, en la oscuridad.

NOTA: El $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ es muy higroscópico y no debería de guardarse en forma cristalina una vez que se ha abierto el contenedor.

Agar modificado de Scholten (MSA)**Medio base**

- Preparar igual como el medio líquido MSB pero añadiendo a la lista de componentes agar (15 g por litro).

Solución de cloruro de calcio (1 mol/l)

CaCl_2 anhidro	11.1 g
Agua destilada	100 ml

- Disolver el cloruro de calcio, calentando ligeramente si es necesario.
- Esterilizar por filtración a través de una unidad de filtración de membrana de 0.22 μm (la solución estéril se puede guardar en tubos de plástico de 10 ml).
- Guardar a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ en la oscuridad máximo 6 meses.

Medio completo

--

Medio base	1000 ml
Solución de cloruro de calcio	6 ml

- Después de autoclavar el medio base, cuando esté entre 45 y 55 °C, añadir asépticamente la solución de cloruro de calcio.
- Distribuir en placas de petri de 9 cm (aprox. 20 ml).
- Dejar solidificar en una superficie plana.
- Guardar las placas en la oscuridad a (5 ± 3) °C protegidas contra la desecación máximo un mes.

Agar blando ssMSA (Semi-solid Modified Scholtens' Agar)

- Preparar igual como el medio líquido MSB pero añadiendo a la lista de componentes agar (7.5 g por litro). Distribuir en botellas de volumen apropiado (50-100 ml).
- Autoclavar.
- Si no ha de utilizarse el mismo día que se prepara, el agar blando puede guardarse en las botellas en las que se ha esterilizado, de forma sólida, a 4 °C protegido de la desecación máximo 6 meses.
- Cuando se necesite el agar, puede fundirse en el microondas (en la posición de baja radiación), evitando que el líquido hierva o bien puede fundirse al baño maría.
- Cuando el agar blando esté aprox a 45 °C y justo antes de utilizarse para la titulación de colifagos somáticos, añadir 1000 µl de solución de ácido nalidíxico (25 mg/ml) por cada 100 ml de agar blando (**concentración final en el agar blando= 250 µg/ml**).
- Añadir **600 µl de solución de cloruro de calcio (1 mol/l) por cada 100 ml** de agar blando.

7. EQUIPO Y MATERIAL

Se utiliza equipamiento de laboratorio microbiológico que incluye:

7.1 Autoclave. Además de los materiales suministrados estériles, el vidrio y otros materiales se esterilizan a 121 °C durante 15 minutos.

7.2 Estufa o baño de agua a 37 °C (36 ± 2) equipado con un agitador rotatorio a (100 ± 10) rev min⁻¹.

7.3 Estufa a 55 °C para mantener temporalmente los agares fundidos.

7.4 Baño de agua controlado termostáticamente a 45 °C (45 ± 1).

7.5 Microondas para fundir el agar blando.

7.6 Congelador controlado a -20 °C (-20 ± 5).

7.7 Ultracongelador controlado termostáticamente a -70 °C (-70 ± 10).

7.8 Espectrofotómetro equipado con un filtro para el rango de 500 - 650 nm con un ancho de banda máximo de ± 10 nm, capaz de sostener cubetas de 1 cm de sección óptica y tubos de vidrio. En los trabajos experimentales que aparecen en esta memoria se ha utilizado un espectrofotómetro Spectronic 501 (Milton Roy Company).

7.9 pHímetro.

7.10 Frigorífico a 4 °C (5 ± 3)°C

Vidrio o material fungible estéril, incluyendo:

7.11 Placas de petri de 9 cm de diámetro.

7.12 Pipetas automáticas de volumen graduable (40-200 µl, 200-1000 µl, 1000-5000 µl) y las puntas estériles adecuadas.

7.13 Pipetas Pasteur.

7.14 Botellas de vidrio de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml..

7.15 Unidades de filtración de membrana, tamaño de poro 0.2 µm, para descontaminar.

7.16 Eppendorf de plástico de 1.5 ml de capacidad..

7.16 Varillas magnéticas.

7.17 Jeringas.

7.18 Tubos de plástico de 10 ml con tapón.

7.19 Frascos cónicos nefelométricos con brazo cilíndrico que encaje en el espectrofotómetro, de 250-300 ml con tapones de algodón.

7.20 Asas de Drigalsky.

8. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS DE REFERENCIA

La cepa que se utiliza como huésped para la detección de bacteriófagos somáticos es *Escherichia coli* CN, ATCC 700078, (Havelaar AH y Hogeboom WM, Anatonie van Leewenhoek 1983; 49:387:397), también conocida como **WG5** (Grabow WOK, Cobrough P, Appl. Environ. Microbiol. 1986; 52:430-433) y es resistente al ácido nalidíxico. Para muestras de bajo contenido de flora acompañante (agua de bebida, aguas naturales no contaminadas) puede utilizarse *E. coli* cepa C, ATCC 13706 (de hecho, la cepa CN deriva de ésta por mutación).

Como material de referencia (control positivo) se utiliza ϕ **X174**, ATCC 13706-B1.

NOTA: Las cepas de la ATCC están disponibles en la “*American Type Culture Collection*”, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, U.S.A.

9. MUESTREO

Recogida y entrega de muestras al laboratorio de acuerdo con las normas ISO 8199, ISO 5667-1, ISO 5667-2 y ISO 5667-3.

10. PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES DE ENSAYO

10.1 Cultivo y mantenimiento de las cepas huéspedes

El cultivo y mantenimiento de la cepa huésped implica distintas etapas que se resumen en la Figura .

10.1.1 Preparación de los cultivos stock.

Rehidratar el contenido de una botella liofilizada del cultivo de referencia de la cepa huésped en una pequeña cantidad de MSB (p.e. 3 ml) utilizando una pipeta Pasteur. Transferir la suspensión a un frasco cónico de 300 ml que contenga 50 (± 5) ml de MSB. Incubar a (36 ± 2)°C durante (20 ± 4) horas en agitación. Añadir 10 ml de glicerol estéril (concentración final del 15-20 % v/v) y agitar bien. Distribuir en viales de plástico en alícuotas de 0.5 ml y guardar a (-70 ± 10)°C o en nitrógeno líquido.

NOTA: Este primer pase de la cepa huésped deberá guardarse como referencia en el laboratorio.

10.1.2 Preparación de los cultivos de trabajo (“working cultures”)

Descongelar un vial del cultivo stock (10.1.1) a temperatura ambiente (15-30)°C e inocular en una placa de agar McConkey u otro medio que contenga lactosa de forma que se obtengan colonias aisladas. Incubar a (36 ± 2)°C durante (20 ± 4) horas. El contenido que sobra del vial del cultivo stock puede utilizarse para inocular más placas en el mismo día de trabajo (si fuera necesario), de no ser así se desechará como material contaminado.

Añadir (50 ± 5) ml de MSB en un frasco cónico de 300 ml y templar a temperatura ambiente por lo menos (el crecimiento será más rápido si el medio está templado a 37 °C). Seleccionar 3-5 colonias lactosa positivas de la placa de McConkey e inocular el material de cada una de estas colonias en el frasco con MSB. Incubar durante (5 ± 1) h a (36 ± 2)°C en agitación. Añadir 10 ml de glicerol estéril y mezclar bien. Distribuir en viales de plástico en alícuotas de p.e. 1.2 ml y guardar a (-70 ± 10)°C máximo dos años.

10.2 Calibración de las medidas de absorbancia por conteo de viables de la bacteria huésped

Coger un vial del cultivo de trabajo (10.1.2) del ultracongelador y descongelar a temperatura ambiente (15-30 °C). Añadir 50 (± 5) ml de MSB en dos frascos cónicos nefelométricos y templar al menos a temperatura ambiente (el crecimiento será más rápido si el caldo es precalentado a 37 °C). Inocular uno de los frascos de MSB con 0.5 ml de cultivo de trabajo. Ajustar el espectrofotómetro a 0 con el brazo lateral del frasco que no ha sido inoculado con bacteria (“blanco”) a una longitud de onda de 600 nm. En el caso de que no se disponga de nefelométricos con brazo lateral se transferirá de forma

aséptica una porción del cultivo a una cubeta. El caldo o cultivo transferido a las cubetas para medir la absorbancia siempre se descartará una vez hecha la medición.

Incubar los frascos a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ en agitación hasta unas 3.5 horas. Cada 30 minutos medir la absorbancia a $\lambda = 600\text{ nm}$ y retirar una alícuota de 1 ml para conteo de viables, asegurándose de que el frasco permanece el mínimo tiempo posible fuera del incubador. Diluir las alícuotas hasta 10^{-7} y contar las cfp en volúmenes de 1 ml de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} por el procedimiento estándar en agar nutritivo o MSA, en duplicado. De forma alternativa se puede filtrar volúmenes de 1 ml de las mismas diluciones y contar las cfp por el proceso estándar de filtración en membrana en agar nutritivo o MSA, en duplicado. Incubar a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (20 ± 4) horas. Contar el número de colonias totales dentro/encima de cada placa que contenga entre 30 y 300 colonias y calcular el número de cfp/ml.

NOTAS: Este proceso debería llevarse a cabo varias veces (2-3 veces) para establecer la relación entre las medidas de absorbancia y el conteo de colonias. Si se han obtenido suficientes datos, el trabajo posterior puede entonces basarse sólo en las medidas de absorbancia.

Si la densidad celular de aprox. 10^8 cfp/ml no se alcanza en 3.5 h de incubación, puede inocularse 1 ml del cultivo de trabajo en vez de 0.5 ml.

11. PROCEDIMIENTO

11.1 Preparación de los cultivos inóculo

Coger un vial del cultivo de trabajo del ultracongelador y dejar a temperatura ambiente $(15-30)^\circ\text{C}$. Añadir $50 (\pm 5)$ ml de MSB en un frasco cónico nefelométrico o frasco liso y templar al menos a temperatura ambiente (el crecimiento será más rápido si el caldo es precalentado a 37°C). Inocular el MSB con 0.5 ml de cultivo de trabajo. No olvidar de hacer un blanco en las mismas condiciones que el cultivo para hacer el 0 en el espectrofotómetro. Incubar a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ en agitación. Medir la absorbancia cada 30 min. A la absorbancia que corresponda a una densidad celular de aprox. 10^8 cfp/ml (basada en los datos obtenidos en 10.2) coger el cultivo inóculo del incubador y utilizar inmediatamente o enfriarlo rápidamente poniéndolo en hielo fundente. Utilizar este cultivo inóculo el mismo día que se prepara.

11.2 Proceso estándar. Método de la doble capa de agar (DAL).

- Preparar un cultivo inóculo como se describe en 11.1.
- Permitir que la muestra se equilibre con la temperatura ambiente $(15-30)^\circ\text{C}$.
- Fundir botellas de ssMSA de 100 ml en un baño con agua hirviendo o en el microondas y dejar en un baño de agua a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. De forma aséptica, añadir 600 μl de la solución de cloruro de calcio y 1 ml de la solución de ácido nalidíxico (concentración final de nalidíxico de $250\text{ }\mu\text{g/ml}$) templados a temperatura ambiente.
- Preparar tubos con 2.5 ml de ssMSA y añadir 1 ml de muestra (directa, concentrada o diluida) equilibrada a temperatura ambiente. Cada alícuota se ha de analizar al menos por duplicado. Añadir 1 ml del cultivo inóculo (en fase exponencial) a cada tubo que contiene el agar blando y la muestra.
- Mezclar con cuidado evitando la formación de burbujas de aire y dispensar el contenido del tubo en una capa de MSA en placa de Petri de 90 mm precalentada a temperatura ambiente. Distribuir uniformemente, dejar solidificar en una superficie horizontal y fría.

- Hacer al menos dos controles negativos para cada tanda de análisis (control de agar y bacteria huésped: 2.5 ml de agar blando ssMSA y 1 ml del cultivo inóculo de *E. coli* WG5 en fase exponencial) uno antes de empezar con el análisis de las muestras y otro después de toda la serie. También se recomienda hacer un control de peptona salina o del diluyente que se haya utilizado (2.5 ml de agar blando y 1 ml del diluyente).
- Hacer al menos un control positivo para cada tanda de análisis con el fago ϕ X174 (2.5 ml de agar blando ssMSA, 1 ml del material de referencia y 1 ml del cultivo inóculo) al final de toda la serie.
- Incubar las placas boca abajo a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (18 ± 2) horas. No amontonar más de seis placas.
- Contar el número de calvas en cada placa dentro de las 4 horas siguientes a la incubación.

NOTAS: Si es necesario, las placas pueden leerse después de 6 h de incubación. Esto puede ser útil si se requieren contajes preliminares y también si se espera un gran “background” de colonias contaminantes. Si la lectura se toma después de seis horas, esto debe ser anotado cuando se expresen los resultados.

La adición de cultivo inóculo frío al ssMSA puede conducir a una caída brusca de la temperatura y a la solidificación del medio. Para evitarlo, precalentar el cultivo inóculo a temperatura ambiente antes de añadirlo a los tubos que contienen ssMSA y muestra.

El ácido nalidíxico es estable al calor. Puede ser añadido al agar blando fundido a partir de una solución esterilizada por filtración o bien puede ser añadido antes de autoclavar el agar.

11.3 Muestras con bajos números de fagos

Proceder de acuerdo a 11.2 pero con las siguientes modificaciones:

- 10 ml de ssMSA ya preparado con la solución de CaCl_2 y el ácido nalidíxico, 1 ml del cultivo inóculo de *E. coli* WG5 y 5 ml de la muestra.
- Verter sobre una placa de petri de 14-15 cm de diámetro que contiene MSA completo (cada una de estas placas contiene aprox. 50 ml de medio).

Al menos analizar cada muestra por duplicado.

NOTA: Este procedimiento permitirá detectar una partícula formadora de calva en 50 ml o 100 ml, si se inoculan en paralelo 10 ó 20 placas. Debido al alto consumo de medio de cultivo, puede ser conveniente utilizar métodos de concentración que también serían necesarios para contajes aun más bajos.

11.4 Test presencia/ausencia (“test de la gota”)

Para el test presencia/ausencia en una muestra de 1 ml proceder de la siguiente forma:

- Tomar un vial de cultivo de trabajo de *E. coli* WG5 del ultracongelador y permitir que se equilibre a temperatura ambiente.
- Añadir 25 ml (± 2.5 ml) de MSB en un frasco y precalentar al menos hasta temperatura ambiente (mejor a 37°C).
- Añadir asépticamente 150 μl de la solución de CaCl_2 (a temperatura ambiente), y 0.25 ml de cultivo de trabajo al frasco que contiene el MSB.
- Incubar a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ en agitación durante aproximadamente 3 horas. Añadir 1 ml de la muestra o dilución (a temperatura ambiente) y continuar la incubación durante (18 ± 2) h.

- Transferir 1 ml del cultivo a un tubo de centrífuga, añadir 0.4 ml de cloroformo, mezclar bien (agitar vigorosamente) y centrifugar a 3000 g durante 5 min.
- Preparar un cultivo inóculo tal y como se describe en 11.1.
- Fundir botellas de 50 ó 100 ml de ssMSA en un baño de agua hirviendo o al microondas y dejar en un baño de agua a $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Añadir asépticamente el CaCl_2 (300 μl en 50 ml ó 600 μl en 100 ml de agar blando ssMSA) y el ácido nalidíxico (0.5 ml en 50 ml ó 1 ml en 100 ml de ssMSA).
- Distribuir alícuotas de 2.5 ml de agar blando en tubos estériles con tapón. A cada tubo añadir 1 ml del cultivo inóculo, mezclar con cuidado evitando la formación de burbujas de aire y verter el contenido en una capa de MSA en una placa de petri de 9 cm de diámetro previamente calentada a temperatura ambiente. Distribuir uniformemente, permitir que solidifique en una superficie horizontal y fría. Esperar a que la capa superior solidifique.
- Colocar una gota del cultivo tratado con cloroformo en la placa inoculada utilizando un capilar fino o una pipeta. No dañar la capa superior de agar. Dejar que la gota se seque.
- Incubar las placas boca abajo a $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ durante (18 ± 2) h.
- Observar si en la placa hay una zona clara en el área donde cayó la gota. La zona clara indica la presencia de colifagos somáticos en la muestra original.

NOTA: Este procedimiento puede también utilizarse en forma de NMP (ISO 8199) o para examinar muestras más grandes. En el último caso, utilizar un volumen de MSB doble concentrado (doble cantidad de ingredientes en la misma cantidad de agua utilizada para MSB simple; añadir un volumen proporcional de la solución de CaCl_2) igual al volumen de muestra. Asegurarse de que la mezcla está bien aireada durante el enriquecimiento (el volumen de muestra y medio no ha de ser superior al 20 % de la capacidad nominal del frasco cónico).

Se puede poner más de una gota en la superficie de una placa inoculada.

Este proceso puede dar lugar a suspensiones fágicas con un elevado título. Tomar las precauciones apropiadas, como trabajar en una cabina de flujo o en un área separada del laboratorio, para prevenir contaminación cruzada de las muestras o cultivos stock.

11.5 Valoración de la calidad

11.5.1 Proceso de conteo de calvas (11.2 – 11.3)

Con cada serie de muestras, examinar un blanco de proceso utilizando diluyente estéril como muestra y un control de referencia de ϕX174 , preparado como se explica a continuación:

A partir de un cultivo fágico de título alto (que puede obtenerse como se describe en el anexo), preparar diluciones decimales y plaquear de acuerdo a 11.2. Guardar el banco de diluciones en la nevera toda la noche. Contar el número de calvas obtenidas y preparar 100-1000 ml de una suspensión con una concentración esperada de partículas formadoras de calva de ϕX174 de aprox. 100 / ml. Añadir 5 % (v/v) de glicerol. Distribuir en viales de plástico en alícuotas de 1.2 – 2.4 ml y guardar a $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$. Descongelar viales del control de referencia de ϕX174 antes de utilizar y plaquear de acuerdo a los procesos explicados en 11.2. Colocar los resultados en una carta de control. Desechar el material de referencia si la media de pfp/ml disminuye.

Opcionalmente puede utilizarse también una muestra control de referencia contaminada naturalmente, utilizando agua residual o agua superficial, diluida a una concentración de partículas formadoras de calvas de aprox. 100 / ml en peptona salina y 5 % (v/v) de glicerol y conservada a $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$. Descartar las muestras control de referencia si la concentración de colifagos somáticos disminuye.

11.5.2 Test presencia/ausencia (11.4)

Preparar una muestra control como se describe en 11.5.1 con una concentración de partículas formadoras de calvas de ϕX174 de aproximadamente 5 / ml. Examinar al menos una muestra control en paralelo con cada serie de muestras analizadas, esperando obtener un resultado positivo. Para examinar posibles efectos de interferencia de las muestras, considerar también la adición de muestra control a un segundo cultivo de enriquecimiento conteniendo muestra.

12. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

12.1 Contaje de calvas

Seleccionar placas con calvas bien separadas y preferiblemente más de 30. Si sólo se encuentran contajes por debajo de 30 calvas por placa, seleccionar las placas inoculadas con el volumen de muestra más grande. A partir del número de calvas contadas, calcular el número de partículas formadoras de calvas ("*plaque-forming particles*") de colifagos somáticos en 1 ml de muestra de la siguiente forma:

$$\text{pfp/ml} = \frac{N}{(n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2)}$$

pfp/ml es el número de partículas formadoras de calvas ("*plaque-forming particles*") de colifagos somáticos por ml;

N es el número total de calvas contadas en las placas;

n_1, n_2 es el número de réplicas que se han contado por dilución F_1, F_2 ;

V_1, V_2 es el volumen analizado con la dilución F_1, F_2 ;

F_1, F_2 es el factor de dilución o concentración utilizado para la porción V_1, V_2 ($F=1$ para una muestra no diluida; $F=0.1$ para una dilución 1/10, $F=10$ para una concentración de 10 veces, etc.).

Si sólo se cuenta una dilución/concentrado, la fórmula se simplifica:

$$\text{pfp/ml} = \frac{N}{n V F}$$

12.2 Test presencia/ausencia

Expresar los resultados como "colifagos somáticos (no) detectados en V ml", siendo V el volumen de muestra analizada.

13. BIBLIOGRAFÍA

ISO/DIS 10705-2. Amended version January 1999. Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages.

Basado en el documento ISO/CD 10705-4, enero 1999

CALIDAD DEL AGUA DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS

ENUMERACIÓN DE BACTERIÓFAGOS QUE INFECTAN a *Bacteroides fragilis*

1. OBJETIVO

Detección y enumeración de bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis*.

2. DEFINICIONES

Los bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis* son virus bacterianos capaces de infectar cepas huéspedes seleccionadas de *Bacteroides fragilis* por unión a la pared bacteriana como primer paso del proceso de infección. Producen calvas visibles (zonas claras) en un césped confluyente de la bacteria huésped crecida bajo condiciones de cultivo apropiadas.

Con el término "titular" nos referimos a enumerar los bacteriófagos de una muestra por el método de la doble capa de agar.

Los términos bacteriófago, virus de bacterias y fago son sinónimos.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a todos los tipos de agua, sedimentos y lodos, así como sus diluciones. En el caso de bajos números de fagos, puede ser necesario un paso de concentración previo. El método también es aplicable a extractos de marisco.

4. PRINCIPIO

La muestra se mezcla con un pequeño volumen de medio nutritivo semisólido. Se añade un cultivo de la cepa huésped y se plaquea en un medio nutritivo sólido. Una vez seca la capa de agar blando, las placas se incuban y al día siguiente se leen las calvas. Los resultados se expresan en partículas formadoras de calvas por unidad de volumen (pfp/ml, pfp/l, etc.).

5. PRECAUCIONES

La cepa huésped utilizada no es patogénica para el hombre ni animales. Los bacteriófagos que infectan a *B. fragilis* no son patógenos para el hombre ni animales pero algunos tipos son muy resistentes a la desecación. Se deben tomar precauciones apropiadas para evitar la contaminación cruzada de los materiales, particularmente cuando se examinan o manipulan cultivos de título alto o cuando se inoculan cultivos de la cepa huésped.

La preparación de los medios de cultivo estériles, la inoculación de cultivos y mantenimiento de la cepa huésped *Bacteroides fragilis* HSP40 en nuestro trabajo siempre se ha realizado en cabina de flujo laminar evitando así contaminaciones por bacterias, hongos o fagos.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Materiales básicos

Utilizar ingredientes de calidad uniforme y productos químicos de grado analítico para la preparación de los medios de cultivo y reactivos y seguir las instrucciones que se dan en el anexo. Para información sobre el almacenamiento ver ISO 8199. De forma alternativa, utilizar medio completo deshidratado y seguir estrictamente las instrucciones del fabricante.

Para la preparación de los medios, utilizar agua destilada o agua desionizada libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento bacteriano bajo las condiciones de trabajo, y en cumplimiento con ISO 3696.

6.2 Diluyente

Para hacer diluciones de la muestra, utilizar peptona salina u otro diluyente que cumpla con la ISO 6887 (Anexo)

6.3 Medios de cultivo y reactivos

6.3.1 Medio líquido para el cultivo de *Bacteroides* (**BPRMB**: “*Bacteroides Phage Recovery Medium Broth*”).

6.3.2 Medio agar para la recuperación de fagos de *Bacteroides* (**BPRMA**: “*Bacteroides Phage Recovery Medium Agar*”).

6.3.3 Medio agar semisólido (**ssBPRMA**: “*Semi-solid Bacteroides Phage Recovery Medium Agar*”).

6.3.4 Solución de cloruro de calcio.

6.3.5 Solución de hemina.

6.3.6 Solución de carbonato disódico.

6.3.7 Kanamicina monosulfato.

6.3.8 Solución de Ácido nalidíxico.

6.3.9 Glicerol (glicerina).

6.3.10 Tampón de fagos.

6.3.11 Peptona salina.

6.3.12 HCl 35 %

6.3.13 Cloroformo.

BPRMB “*Bacteroides* Phage Recovery Medium Broth”

Medio basal (BPRM) contiene:

Peptona de carne	10 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	2 g
NaCl	5 g
L-cisteína monohidratada	0.5 g
Glucosa	1.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12 g
Solución CaCl ₂ (0.05 g/ml)	1 ml
Agua destilada	1000 ml

- El medio deshidratado BPRM se vende ya preparado (ADSA-Micro) y sólo hay que añadir la solución de CaCl₂.
- Disolver bien los ingredientes, repartir en botellas de volumen adecuado y esterilizar en el autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.
- Guardar en la oscuridad a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ o a temperatura ambiente no más de una semana (*Bacteroides* crece mejor en un medio de cultivo que se prepara justo antes de utilizar que en un medio que ya se ha oxigenado).

Solución de cloruro de calcio (0.05 g/ml)

CaCl ₂ .anhidro	5g
Agua destilada	100 ml

- Disolver, esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.2 µm de tamaño de poro.
- Guardar en la oscuridad a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ no más de 6 meses.

Solución de hemina

Hemina	0.1 g	
Solución de NaOH (1 mol/l)		0.5 ml
Agua destilada	99.5 ml	

- Disolver los ingredientes por agitación magnética (30-60 min).
- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.2 µm de poro o esterilizar en el autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.
- Guardar a temperatura ambiente máximo 6 meses.

Solución de carbonato disódico (1 mol/l)

Na ₂ CO ₃	10.6 g
Agua destilada	100 ml

- Disolver el carbonato disódico en el agua.
- Esterilizar por filtración a través de un filtro de membrana de 0.2 μm de tamaño de poro.
- Guardar a temperatura ambiente máximo 6 meses.

Medio completo

Medio basal	1000 ml
Solución de hemina	10 ml
Solución de Na_2CO_3	25 ml

- Añadir asépticamente los aditivos al medio basal y mezclar bien.
- **Ajustar a pH 6.8 ± 0.5** añadiendo HCl asépticamente (normalmente 2.5 ml HCl 35 %). Utilizar inmediatamente.

NOTA: Para evitar contaminación se recomienda añadir siempre Kanamicina monosulfato a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ y ácido Nalidíxico a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ al medio completo

- Añadir 1 ml de Kanamicina monosulfato y 4 ml de ácido Nalidíxico a 1000 ml de medio completo.

BPRMA “*Bacteroides* Phage Recovery Medium Agar”

Agar basal

Caldo basal (A.1, no estéril)	1000 ml
Agar	12-20 g*

* Depende del tipo de agar.

- Mezclar el medio basal y el agar. Esterilizar en el autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.
- Enfriar hasta $45\text{-}50^\circ\text{C}$ y añadir los aditivos.

Agar completo

Agar basal (fundido a $45\text{-}50^\circ\text{C}$)	1000 ml
Solución de hemina	10 ml
Solución de Na_2CO_3	25 ml

- Añadir asépticamente los aditivos, mezclar bien.
- Ajustar a pH 6.8 ± 0.5 añadiendo HCl asépticamente.
- Distribuir en placas de Petri (20 ml en placas de 9 cm de diámetro). Dejar solidificar y guardar en la oscuridad a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ máximo 2 meses.
- Dejar las placas a temperatura ambiente 1-2 horas antes de utilizar para que se sequen.

NOTA: Para evitar contaminación se recomienda añadir siempre Kanamicina monosulfato y ácido Nalidíxico (a concentraciones finales de 100 $\mu\text{g/ml}$ para ambos) al medio agar completo. Así se añade 1 ml de una solución de kanamicina

monosulfato de 10^5 µg/ml y 4 ml de una solución de ácido Nalidíxico de $2.5 \cdot 10^4$ µg/ml a 1000 ml de medio completo.

ssBPRMA “Semi-solid Bacteroides Phage Recovery Medium Agar”

- Preparar agar basal pero utilizar la mitad de la cantidad de agar (6g - 10 g), dependiendo del tipo de agar. La dureza del ssBPRMA es crítica para obtener buenos resultados. Escoger la concentración de agar que produzca contajes de calvas más altos pero también controlar el tamaño de las calvas para reducir la confluencia.
- Distribuir en botellas de volumen adecuado (50 - 100 ml). Autoclavar. Dejar solidificar y guardar a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ máximo dos meses.
- Antes de utilizar, fundir las botellas de ssBPRMA en un baño de agua hirviendo o microondas, enfriar entre 45 y 50°C .
- Añadir asepticamente hemina, Na_2CO_3 , antibióticos y ajustar el pH a 6.8 ± 0.5 .

Kanamicina monosulfato

Kanamicina monosulfato	1.25 g
Agua destilada	10 ml

- Disolver en agua y mezclar bien. Esterilizar por filtración a través de un filtro de 0.2 µm de poro.
- Distribuir en alícuotas de p.e. 1 ml y guardar a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ no más de 8 horas o a $(-20 \pm 5)^\circ\text{C}$ máximo 6 meses.

NOTA: Muchas provisiones de kanamicina monosulfato contienen menos del 100 % de kanamicina activa. Hacer las correcciones necesarias en cada caso.

Crioprotector BSA + Sacarosa

Albúmina bovina, fracción V (BSA)	10 g
Sacarosa	20 g
Agua destilada	hasta 100 ml

- Disolver primero la sacarosa en aprox. 50 ml, después añadir el BSA.
- Agitar con varilla magnética hasta que esté completamente disuelto.
- Enrasar a 100 ml con agua destilada.
- Esterilizar por filtración.
- Utilizar inmediatamente.

7. EQUIPO Y MATERIAL

Se utiliza equipamiento de laboratorio microbiológico que incluye

7.1 Autoclave. Además de los materiales suministrados estériles, el vidrio y otros materiales se esterilizan a 121 °C durante 15 minutos.

7.2 Estufa a 37 °C (36 ± 2).

7.3 Estufa a 55 °C para mantener temporalmente los agares fundidos.

7.4 Baño de agua controlado termostáticamente a 45 °C (45 ± 1).

7.5 Microondas para fundir el agar blando.

7.6 pHímetro y papel indicador de pH.

7.7 Congelador controlado a -20 °C (-20 ± 5).

7.8 Ultracongelador controlado termostáticamente a -70 °C (-70 ± 10).

7.9 Espectrofotómetro equipado con un filtro para el rango de 500 - 650 nm con un ancho de banda máximo de ± 10 nm, capaz de sostener cubetas de 1 cm de sección óptica y tubos de vidrio. En los trabajos experimentales que aparecen en esta memoria se ha utilizado un espectrofotómetro Spectronic 501 (Milton Roy Company).

7.10 Jarras de anaerobiosis o bolsas, con los generadores e indicadores de anaerobiosis.

7.11 Frigorífico a 4 °C (5 ± 3).

Vidrio o material fungible estéril, incluyendo

7.12 Placas de petri de 9 cm de diámetro.

7.13 Pipetas automáticas de volumen graduable (40-200 μ l, 200-1000 μ l, 1000-5000 μ l).

7.14 Pipetas Pasteur.

7.15 Botellas de vidrio de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml con tapón de rosca.

7.16a Tubos de cultivo de vidrio con tapón de rosca.

NOTA: Los tubos deben limpiarse muy bien con agua, y no deben quedar trazas de jabón. Lo más adecuado es utilizar siempre los mismos tubos para el cultivo de *Bacteroides fragilis* y evitar su utilización para el cultivo de cualquier otra bacteria o para la contención de cualquier otro medio o reactivo.

7.16b Tubos de vidrio Hungate con goma al final y tapón de rosca (utilizado para cultivos anaeróbicos).

7.17 Unidades de filtración de membrana para descontaminación, tamaño de poro 0.2 μ m, membranas de baja adsorción proteica compuestas de polivinilideno difluorida (GV Millipore)

7.18 Crioviales de plástico de 2 ml de capacidad con anillo y rosca en el tapón.

7.19 Varillas magnéticas.

7.20 Isopos.

7.21 Jeringas y agujas.

7.22 Tubos de plástico de 10 ml con tapón.

8. CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS DE REFERENCIA

- Las cepas utilizadas son *Bacteroides fragilis* HSP40 (ATTC 51477) (Tartera y Jofre, 1987) y *B. fragilis* RYC2056 (Puig y col., 1997).

Los materiales de referencia que se utilizan como control positivo son el

- bacteriófago B40-8 (Tartera y Jofre, 1987) para *B. fragilis* HSP40 y el bacteriófago B56-3 para *B. fragilis* RYC2056, aunque los primeros controles se realizaron con B56-1 (Puig, M., 1998).

NOTA: Las cepas de la ATCC están disponibles en la “American Type Culture Collection” 10801 University Boulevard. Manassas. Virginia 20110-2209. USA

9. MUESTREO

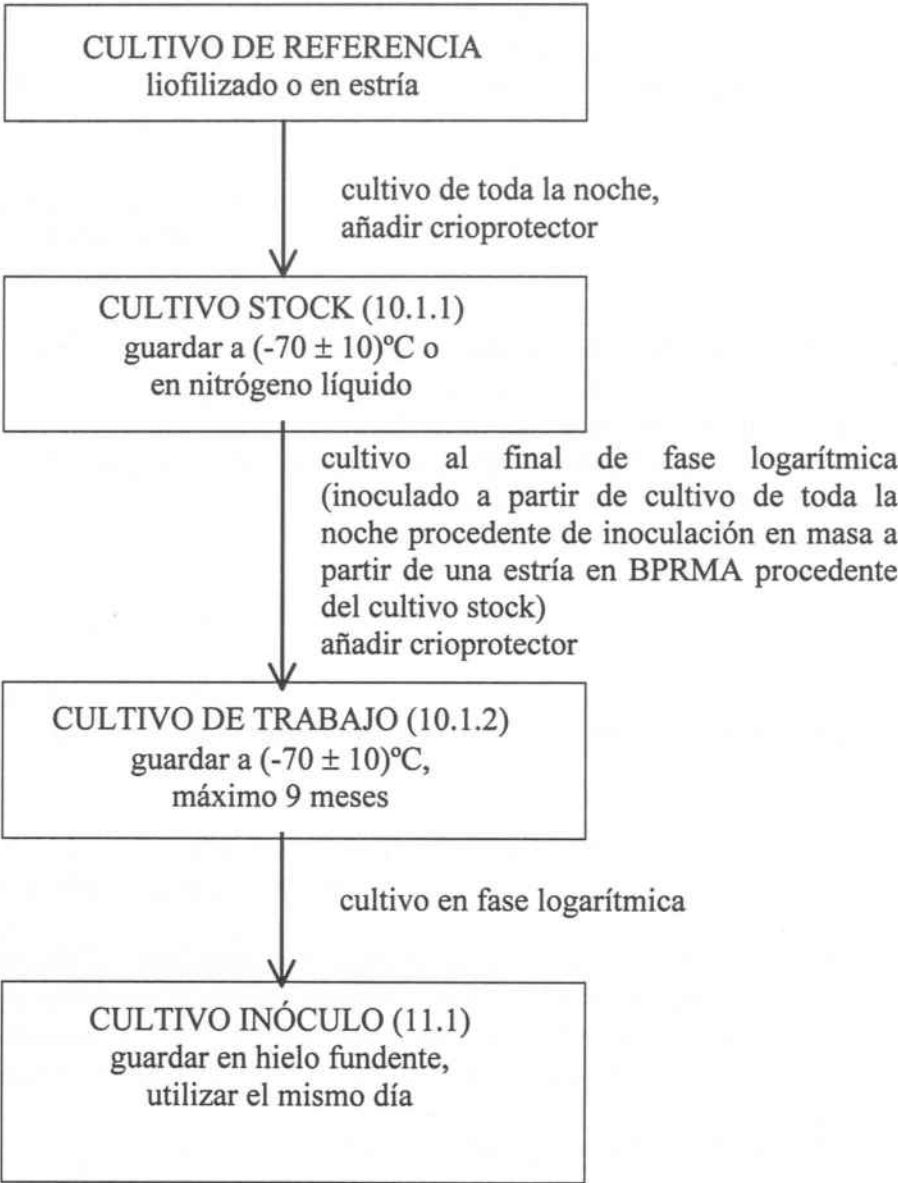
Recogida y entrega de muestras al laboratorio de acuerdo con las normas ISO 8199, ISO 5667-1, ISO 5667-2 y ISO 5667-3.

10. PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES DE ENSAYO

10.1 Cultivo y mantenimiento de las cepas huésped

El cultivo y mantenimiento de la cepa huésped implica distintas etapas que se resumen a continuación:

Esquema para el cultivo y mantenimiento de la cepa huésped.



NOTA: *Bacteroides fragilis* es una bacteria anaeróbica, pero *B. fragilis* no requiere condiciones anaeróbicas muy estrictas para su manipulación o crecimiento. No obstante, la incubación de los cultivos en medio agar se ha de llevar a cabo en cabinas, jarras o bolsas de anaerobiosis. Si los cultivos se preparan en medio líquido, es suficiente con llenar completamente con medio los tubos de vidrio, flascos o botellas y cerrar con tapones de rosca.

10.1.1 Preparación de los cultivos stock.

Rehidratar el contenido de una botella liofilizada del cultivo de referencia de la cepa huésped en 1 ml de BPRMB (A.1) utilizando una pipeta Pasteur. Inocular las suspensiones en 10 ml de BPRMB en un tubo de vidrio de 10 ml con tapón de rosca e incubar a $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante (18 ± 2) horas. Sembrar en estría (con hisopo estéril) en una placa de BPRMA (A.2). Incubar en una cabina, jarra o bolsa de anaerobiosis a $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante (44 ± 2) horas.

De forma alternativa, si se dispone de agar inclinado, sembrar directamente en una placa de BPRMA. Incubar en una cabina anaeróbica, jarra o bolsa a $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante (44 ± 2) horas.

Inocular células (inoculación en masa con un hisopo estéril) a partir de la placa en 10 ml de BPRMB en un tubo de vidrio de 10 ml con tapón de rosca. Asegurarse de que el tubo está completamente lleno. En caso de crecimiento denso inocular 1/8 del crecimiento en la placa de BPRMA, en caso de poco crecimiento utilizar 1/2 del crecimiento de la placa. Incubar a $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante (22 ± 2) horas.

Mezclar el cultivo y crioprotector (A.6) en una relación 1:1 (v/v). Mezclar bien evitando la formación de burbujas. Distribuir en viales con tapón de rosca en alícuotas de 1 ml y guardar a $(-70 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ o en nitrógeno líquido.

NOTA: Este primer pase de la cepa huésped debería ser guardado como referencia en el laboratorio. La pureza del cultivo debería comprobarse antes de guardar con una tinción Gram, probando la ausencia de crecimiento bajo condiciones aeróbicas y ensayando la sensibilidad a un bacteriófago apropiado (p.e. B40-8 para *B. fragilis* HSP40 y B56-3 para *B. fragilis* RYC 2056).

10.1.2 Preparación de los cultivos de trabajo ("working cultures")

Descongelar un vial del cultivo stock (10.1.1) a temperatura ambiente y hacer una estría con hisopo en una placa de BPRMA. Incubar en una cabina, jarra o bolsa de anaerobiosis a $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante (44 ± 2) horas. Llenar un tubo de vidrio con tapón de rosca con BPRMB precalentado. Inocular material celular (inoculación en masa) a partir de placa e incubar a $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ durante (22 ± 2) horas.

Transferir este cultivo a BPRMB (si se atempera previamente a 37°C el crecimiento será más rápido) en una relación 1.5:10 (v/v) en un tubo de vidrio con tapón de rosca. Asegurarse de que el tubo está completamente lleno. Incubar a $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar aproximadamente 2×10^9 cfp/ml (esto ocurre a una densidad óptica, a 600 nm de longitud de onda, de 1.3 aproximadamente con el espectrofotómetro que nosotros utilizamos).

Mezclar el cultivo de trabajo y el crioprotector (A.6) en una relación de 1:1 (v/v) evitando la formación de burbujas. Distribuir en viales con tapón de rosca en alícuotas de 1.5 ml y guardar a $(-70 \pm 10)^{\circ}\text{C}$ un máximo de 6 meses.

NOTA: Asegurarse de que el cultivo no alcanza la fase estacionaria antes de mezclarlo con el crioprotector. La estabilidad de la DO indicará el final de la fase logarítmica.

10.2 Calibración de las medidas de absorbancia por contejo de viables de la bacteria huésped

Coger un vial del cultivo de trabajo (10.1.2) del ultracongelador y descongelar a temperatura ambiente (15-30 °C). Añadir BPRMB en un tubo para cultivos anaeróbicos (7.16b, aconsejable que sea de 30 ml de volumen) y templar al menos a temperatura ambiente (el crecimiento será más rápido si el caldo es precalentado a 36°C). Transferir el cultivo de trabajo dentro del BPRMB en relación de 1:10 (v/v) respectivamente llenando completamente el tubo. Los tubos para cultivos anaeróbicos pueden ser inoculados/muestreados por punción con jeringas y agujas estériles (7.21). Incubar a (36 ± 2)°C. No olvidar de hacer un blanco en las mismas condiciones que el cultivo para hacer el 0 en el espectrofotómetro. Cada 30 minutos medir la absorbancia y sacar una muestra de 0.1 ml por punción para el contejo de células viables. Asegurarse de que el tubo está fuera del incubador el menor tiempo posible.

Fundir botellas de ssBPRMA (A.3) en un baño de agua hirviendo o en el microondas y dejarlas en un baño a (45 ± 1)°C. Añadir en condiciones asépticas hemina, Na₂CO₃ y antibióticos y ajustar el pH a 6.8 (A.1).

Diluir las alicuotas que se han tomado del cultivo hasta 10⁻⁸ y añadir 1 ml de las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ a tubos con 2.5 ml de ssBPRMA fundido, en duplicado. Verter el contenido de cada tubo sobre una capa de BPRMA en placa de Petri de 90 mm (A.2) precalentada a temperatura ambiente. Distribuir uniformemente, dejar solidificar en una superficie horizontal y fría e incubar las placas boca abajo en una cabina anaeróbica, jarra o bolsa a (36 ± 2)°C durante (44 ± 2) horas. Asegurarse que todo el proceso se lleva a cabo en un periodo de tiempo lo más corto posible y que los medios han sido autoclavados justo antes de utilizar (para tenerlos libres de oxígeno). Asegurarse que los diluyentes han sido enfriados a temperatura ambiente antes de utilizar. Contar el número total de colonias en cada placa que contenga entre 30 y 300 colonias y calcular el número de cfp/ml (consultar ISO 8199 si es necesario).

NOTA: Este proceso debería llevarse a cabo varias veces (2-3 veces) para establecer la relación entre las medidas de absorbancia y el contejo de colonias. Si se han obtenido suficientes datos, el trabajo posterior puede entonces basarse sólo en las medidas de absorbancia.

11. PROCEDIMIENTO

11.1 Preparación de los cultivos inóculo

Coger un vial del cultivo de trabajo del ultracongelador y dejar a temperatura ambiente (15-30)°C. Añadir BPRMB en un tubo con tapón de rosca y templar a temperatura ambiente o a 36°C. Transferir el cultivo de trabajo dentro del tubo lleno con BPRMB en relación 1:10 (v/v) respectivamente. Asegurarse que el tubo está completamente lleno. No olvidar de hacer un blanco en las mismas condiciones que el cultivo para hacer el 0 en el espectrofotómetro. Después de 2 horas medir la absorbancia a 620 nm de longitud de onda cada 30 minutos. A la absorbancia que corresponda a una densidad celular de aprox. 2 x 10⁸ cfp/ml (basada en los datos obtenidos en 10.2) coger el cultivo inóculo del incubador y utilizar inmediatamente o enfriarlo rápidamente poniéndolo en hielo fundente. Utilizar en un margen de tiempo de hasta 6 horas.

NOTA: Si la densidad celular de aprox. 2×10^8 cfp/ml no se alcanza con 3 horas de incubación, se puede incrementar la cantidad de cultivo de trabajo que se transfiere dentro del BPRMB a una relación de 1.5:10 (v/v) respectivamente.

11.2 Proceso estándar

Preparar un cultivo inóculo como se describe en 11.1.

Permitir que la muestra se equilibre con la temperatura ambiente (15-30)°C.

Fundir botellas de ssBPRMA en un baño con agua hirviendo o en el microondas y dejar en un baño de agua a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. Añadir hemina, Na_2CO_3 y antibióticos de forma aséptica y ajustar el pH.

Preparar tubos con 2.5 ml de ssBPRMA y añadir 1 ml de muestra (directa, concentrada o diluida) equilibrada a temperatura ambiente. Cada alicuota se ha de analizar al menos en duplicado.

Añadir 1 ml del cultivo inóculo (en fase exponencial) a cada tubo, mezclar con cuidado evitando la formación de burbujas de aire y dispensar el contenido del tubo en una capa de BPRMA en placa de Petri de 90 mm precalentada a temperatura ambiente. Distribuir uniformemente, dejar solidificar en una superficie horizontal y fría e incubar las placas boca abajo en una cabina anaeróbica, jarra o bolsa a $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ durante (22 ± 2) horas. Después de la incubación, contar el número de calvas en cada placa. Si no es posible realizar el conteo después de acabar la incubación, guardar las placas a 4°C hasta que se lean (no más de un día).

NOTAS: Para muestras que tengan gran cantidad de flora acompañante se recomienda descontaminar por filtración a través de membranas de baja adsorción proteica, como p.e. membranas de polivinilideno difluorido de 0.2 μm de poro, o añadir al ssBPRMA kanamicina a una concentración final de 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en vez de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

B. fragilis es una bacteria anaeróbica. Es importante distribuir los tubos inoculados tan pronto como sea posible y colocar las placas en las jarras de anaerobiosis rápidamente una vez que se hayan secado.

12. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

12.1 Contaje de calvas

Seleccionar placas con calvas bien separadas y preferiblemente más de 30. Si sólo se encuentran conteos por debajo de 30 calvas por placa, seleccionar las placas inoculadas con el volumen de muestra más grande. A partir del número de calvas contadas, calcular el número de partículas formadoras de calvas ("plaque-forming particles") de bacteriófagos que infectan a *Bacteroides fragilis* en 1 ml de muestra de la siguiente forma:

$$\text{pfp/ml} = \frac{N}{(n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2)}$$

pfp/ml es el número de partículas formadoras de calvas ("plaque-forming particles") de bacteriófagos que infectan a *B. fragilis* por ml;

N es el número total de calvas contadas en las placas;

n_1, n_2 es el número de réplicas que se han contado por la dilución F_1, F_2 ;

V_1, V_2 es el volumen analizado con la dilución F_1, F_2 ;
 F_1, F_2 es el factor de dilución o concentración utilizado para la porción V_1, V_2
($F=1$ para una muestra no diluida; $F=0.1$ para una dilución de 10 veces,
 $F=10$ para una concentración de 10 veces, etc.).

Si sólo se cuenta una dilución/concentrado, la fórmula se simplifica:

$$\text{pfp/ml} = \frac{N}{n V F}$$

13. BIBLIOGRAFÍA

Este protocolo de trabajo se corresponde con la norma
ISO/CD 10705-4. January 1999. Water quality. Detection and enumeration of
bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*.

MEDIOS Y REACTIVOS EN EL TRABAJO CON BACTERIÓFAGOS

Solución de ácido nalidíxico (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Ácido nalidíxico	250 mg
NaOH (1mol/l)	2 ml
Agua destilada	8 ml

Concentración de la solución de ácido nalidíxico 25 mg/ml

- Disolver el ácido nalidíxico en la solución de NaOH, añadir el agua destilada y mezclar bien.
- Esterilizar por filtración a través de una unidad de filtración de 0.22 μm
- Dispensar en volúmenes adecuados pe. 10 eppendorfs estériles.
- Guardar a $(-20 \pm 3)^\circ\text{C}$ máximo 6 meses.

NOTA: El ácido nalidíxico es estable al calor; puede ser esterilizado por filtración y añadido al agar blando fundido en condiciones asépticas o puede añadirse al ssMSA antes de autoclavar dicho medio.

Agar McConckey

Si se utiliza agar McConckey preparado por una casa comercial, seguir las instrucciones del fabricante.

También puede prepararse de la siguiente forma:

Peptona	20 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	5 g
Rojo neutro	75 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

- Disolver los ingredientes en el agua destilada hirviendo.
- Ajustar el pH de forma que después de la esterilización esté a $7,4 \pm 0,1$ a $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$.
- Autoclavar a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ durante 15 min.
- Cuando esté entre 45 y 50 $^\circ\text{C}$, distribuir en placas de petri de 9 cm de diámetro (aprox. 20 ml). Dejar solidificar en una superficie plana.
- Guardar en la oscuridad a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ máximo 6 meses. La experiencia personal nos demuestra que es mejor utilizar las placas durante la primera semana después de su preparación. Recomendamos que se preparen justo las placas que se necesiten durante una semana.

Glicerol (glicerina)

Glicerol (870 g/l)	100 ml
--------------------	--------

- Distribuir en volúmenes adecuados y esterilizar en el autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.
- Antes de utilizar, puede calentarse un poquito en el microondas (baja radiación) para poder pipetear mejor.
- Guardar en la oscuridad máximo un año.

Solución de peptona salina

La peptona salina se utiliza para hacer diluciones de muestras y diluciones de los stocks de fagos.

Peptona	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

- Disolver los ingredientes. Ajustar el pH de forma que después de la esterilización esté a 7.2 ± 0.5 .
- Dispensar en volúmenes adecuados y autoclavar.
- Guardar en la oscuridad máximo 6 meses. Comprobar el pH antes de utilizar, tiene que estar en 7.2 ± 0.5 .

Tampón de fagos

El tampón de fagos puede utilizarse para hacer diluciones de muestras naturales para titular y diluciones de los stocks de fagos. Aunque las normativas ISO para la detección y cuantificación de bacteriófagos recomiendan la utilización de peptona salina, el tampón de fagos tiene más efecto “tamponador” que la peptona y puede ser útil en estudios moleculares y en estudios donde es importante controlar el pH.

Na_2HPO_4	3.5 g
KH_2PO_4	1.5 g
NaCl	2.5 g
Agua destilada	500 ml

- Autoclavar a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.
- Añadir en condiciones asépticas **5 ml MgSO_4 0.1 M** y **5 ml CaCl_2 0.01 M**

Solución MgSO_4 0.1 M

MgSO_4	2.47 g
Agua destilada	100 ml

- Autoclavar.

Solución CaCl_2 0.01 M

CaCl_2	0.11 g
Agua destilada	100 ml

- Autoclavar.

Cloroformo

El cloroformo se utiliza para la eliminación de bacterias en la obtención de cultivos puros de bacteriófagos y también para descontaminar muestras naturales. El cloroformo es una sustancia carcinogénica. Deben tomarse las medidas de seguridad pertinentes o se utilizará un método alternativo de eficiencia equivalente.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS “ESTÁNDAR” QUE CONTIENEN BACTERIÓFAGOS (MATERIALES DE REFERENCIA).

1. GENERAL

La descripción de los medios, especificaciones de cepas e información de la enumeración de bacteriófagos se encuentran en:

- ISO 10705-1, febrero 1997 para los bacteriófagos F-específicos de RNA
- ISO/DIS 10705-2, enero 1999 para los colifagos somáticos.
- ISO/CD 10705-4, enero 1999 para los fagos de *Bacteroides fragilis*.

Para la preparación de suspensiones fágicas con un “título alto” (número elevado de pfp/ml) pueden consultarse los mismos documentos anteriores.

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS “ESTÁNDAR” CON FAGOS.

- 2.1 Preparar diluciones decimales en peptona salina a partir de un vial con un título alto de cultivo fágico.
- 2.2 Enumerar estas diluciones (cada dilución por duplicado). Guardar la serie de diluciones a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ toda la noche.
- 2.3 Cuantificar el número de calvas.
- 2.4 De acuerdo con los resultados, preparar una suspensión (utilizando las diluciones guardadas en la nevera) con 100-1000 ml de peptona salina y un 5 % (v/v) de glicerol que presente una concentración final de fagos de 30 – 150 pfp/ml.
- 2.5 Mezclar la suspensión de forma que quede lo más homogénea posible y distribuir en eppendorfs o crioviales de plástico en alícuotas de 1,2 ml.
- 2.6 Guardar a $(-70 \pm 10)^\circ\text{C}$.

PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE CARTAS DE CONTROL PARA BACTERIÓFAGOS

Para cada bacteriófago y cepa huésped se debe preparar una carta de control diferente. El primer paso para la preparación de una carta de control es la determinación de los límites (de control). Esto se consigue analizando 20 viales de una serie (“batch”) de muestras estándar de fagos, preferiblemente en días diferentes y por técnicos diferentes utilizando el equipo que se usa normalmente en los análisis. Cada vial es analizado por separado. También es posible construir una carta de control a partir de 10 medidas. En este caso se debería construir una nueva carta de control tan pronto se hayan reunido 20 observaciones.

Para **calcular los límites del control** los valores se transforman en $^{10}\log$. Basándose en los valores transformados a $^{10}\log$, se calculan la media ($\bar{x}$) y la desviación estándar (s). La desviación estándar se calcula de la siguiente forma:

$$s = 0.8865 \cdot R \qquad R = 1/(n-1) \sum_{i=2}^n |x_i - x_{i-1}|$$

Donde n = número de observaciones y x_i = la i^{ava} observación.

El cálculo de R (conocido como rango móvil) se basa en la suma de las diferencias entre el primero y el segundo valor, el segundo y el tercer valor y así sucesivamente. Este método de calcular la desviación estándar está menos influenciado por los valores “extremos” (más robustos) como a veces se encuentran en microbiología. Si no hay valores que se salen del perfil, la desviación estándar calculada de la forma “clásica” (con $(n-1)$ grados de libertad), dará un resultado similar que el calculado de la forma descrita anteriormente.

Los límites de control se calculan (en escala logarítmica) como sigue:

- **Límites de advertencia:** $\bar{x} \pm 2s$ (“Warning limits”)
- **Límites de acción:** $\bar{x} \pm 3s$ (“Action limits”)

La carta de control se construye por transformación a la escala normal de los valores de la media ($\bar{x}$) y los límites superior e inferior de acción y advertencia. El antilogaritmo dará cartas de control asimétricas. Los resultados de los 20 viales analizados para el cálculo de los límites debería también estar indicado en una carta de control (puede ser una carta separada). Debería revisarse siempre que estos valores cumplan los criterios establecidos más abajo (significando así que el proceso analítico está bajo control). Si los resultados de uno (o más) de estos 20 viales están fuera de control, la causa del resultado erróneo debería identificarse y se tomará una decisión sobre la validez del resultado. Si el resultado no es válido no se deberá utilizar para el cálculo de los límites de control.

Una vez que la carta de control está construida, se analiza un vial en particular para cada serie de análisis y el resultado se indica en la carta de control. Una serie de análisis se define como el número de medidas llevadas a cabo por un técnico en una (parte) de un día, utilizando un método, un lote de medios, etc.

El resultado está fuera de control si:

- hay una sola violación del límite de acción ($\bar{x} \pm 3s$);
- dos de tres observaciones sucesivas exceden el mismo límite de advertencia ($\bar{x} \pm 2s$);
- hay nueve observaciones sucesivas en el mismo lado de la media ($\bar{x}$);
- seis observaciones en una fila aumentan o disminuyen con la misma tendencia.

Si los resultados están fuera de control, la causa deberá ser identificada y se tomará una decisión sobre la validez de los resultados de series particulares de análisis.

Se construirá una nueva carta de control si es necesario, por ejemplo cuando ocurra un traslado en la media. La decisión para la construcción de una nueva carta de control será tomada por la dirección del laboratorio.

Una vez que la carta de control está completa con los resultados puede crearse una nueva carta basada en los mismos límites de control utilizados en la carta previa.

Anexo 3: Bacteriología

A4.1 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE COLIFORMES TOTALES EN MUESTRAS DE AGUA POR FILTRACIÓN EN MEMBRANA.

1. OBJETIVO

Detección y cuantificación de coliformes totales en aguas mediante la técnica de filtración en membrana.

2. DEFINICIONES

Los coliformes totales son microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos, gram negativos, no esporulados, con forma bacilar que tienen la capacidad de fermentar lactosa con producción de ácido y gas en 24-48 h a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Aunque las bacterias coliformes pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, y usualmente incluyen *E. coli* y varios miembros de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, la definición de “coliforme total” no está basada en criterios estrictamente taxonómicos, sino en reacciones bioquímicas específicas o en la apariencia de colonias características en medios de cultivo selectivos y/o diferenciales. Los tests y medios enzimáticos específicos han permitido la aplicación de la citocromo oxidasa (negativo) y β -galactosidasa (positivo) como criterios adicionales para el grupo coliforme.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a aguas potables y recreativas y a sus diluciones.

Los tests por filtración en membrana presentan la limitación de su utilización en aguas de baja turbidez con bajas concentraciones de flora acompañante.

4. PRINCIPIO

La técnica está basada en la captura de las células bacterianas por un filtro de membrana de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Después de que el agua ha sido filtrada, la membrana se coloca en una placa sobre un medio sólido apropiado (mEndo) y se incuba boca abajo a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Se cuentan las colonias discretas que aparecen después de 24 h, y el número de bacterias objeto de estudio se describe como unidades o partículas formadoras de colonias (CFP: *colony forming particles*) en 100 ml de la muestra original. Con el medio mEndo, los presuntos coliformes serán todas las colonias rojas con un brillo metálico (color oro).

NOTA: El medio mEndo contiene lauryl sulfato, fucsina y sulfito sódico que inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas. También contiene lactosa que será fermentada por los coliformes dando lugar a aldehídos y gas. Estos aldehídos liberan la fucsina a partir de la combinación fucsina-sulfito, produciendo la coloración roja de las colonias. Si esta reacción es muy intensa, la fucsina llega a cristalizar y por este motivo confiere a dichas colonias un brillo metálico.

5. EQUIPO Y MATERIAL

Material típico de laboratorio microbiológico incluyendo:

5.1 Botellas de vidrio de diferentes volúmenes.

5.2 Sistema de filtración por vacío: Rampa o matraz kitasato y trompa de vacío conectada al grifo de agua corriente o bomba de vacío. Esterilizar antes de utilizar los soportes de las membranas (rejillas o placas porosas) y los embudos de sujeción.

5.3 Pinzas de borde biselado de acero inoxidable para manipular los filtros.

5.4 Filtros de membrana de acetato/nitrato de celulosa de 0.45 μm (Millipore o Gelman) estériles, preferiblemente cuadrículados por la cara superior.

5.5 Estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.6 Pipetas automáticas.

Material fungible estéril, incluyendo:

5.7 Placas de petri de 50 mm de diámetro.

5.8 Puntas de pipetas.

5.9 Tubos de 10 ml.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Ringer $\frac{1}{4}$

6.2 Agar mEndo

6.3 Etanol

Agar mEndo LES

La necesidad de que este medio sea uniforme determina la utilización del medio deshidratado. Nunca preparar el medio a partir de los ingredientes básicos si se dispone del medio deshidratado adecuado. Seguir las instrucciones del fabricante para su rehidratación.

Medio mEndo	
Triptosa	7.5 g
Extracto de levadura	1.2 g
Lactosa	9.4 g
Casitona	3.7 g
Tiopeptona	3.7 g
Fosfato potásico dibásico	3.3 g
Fosfato potásico monobásico	1.0 g
Cloruro de sodio	3.7 g
Desoxicolato sódico	0.1 g
Lauryl sulfato sódico	0.05 g
Sulfito sódico	1.6 g
Fucsina básica	0.8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio no se autoclava.

1. Suspender la cantidad de medio deshidratado indicada por el fabricante en 1 litro de agua destilada que contenga 20 ml de etanol 95 %. Deshacer los grumos con una varilla.
2. Calentar en un cazo al fuego agitando hasta que hierva, de manera que haya buena disolución del agar.
3. Transferir el contenido del cazo a una botella de vidrio Pirex estéril.
5. Enfriar hasta cerca de 50 °C y distribuir el agar mEndo en placas de petri estériles de 50 mm de diámetro x 12 mm de altura. El pH final del medio debe ser de 7.2 ± 0.2 a 25 °C.
6. Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que el medio solidifique y después guardar a 4 °C en la oscuridad dentro de bolsas de plástico para reducir la pérdida de humedad. Las placas que no se hayan utilizado al cabo de tres semanas a un mes y las que se hayan resecado, serán descartadas.

NOTA: No utilizar etanol desnaturalizado, pues reduce el crecimiento y el tamaño de las colonias de los coliformes.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- 7.1 Selección del volumen de agua que se ha de examinar. Escoger volúmenes de muestra cuyos contajes se prevean que estarán entre 20 y 60 colonias de coliformes totales por membrana. Cuando la densidad bacteriana de la muestra es desconocida, se filtraran distintos volúmenes o diluciones. Para las diluciones se utiliza Ringer $\frac{1}{4}$ y si el volumen que se ha de filtrar es menor de 10 ml se recomienda completarlo hasta 10 ml con Ringer $\frac{1}{4}$. Antes de escoger el volumen, **homogeneizar** bien la muestra.
- 7.2 Filtración de la muestra. El sistema de filtración estará a punto para ser utilizado (portafiltros y embudos estériles, conexión para hacer el vacío preparada). Con las pinzas, colocar la membrana de 0.45 μm de acetato/nitrato de celulosa en el soporte destinado a tal efecto. Colocar el embudo portafiltro asegurándose de que no hay pérdidas. Filtrar la muestra.
- 7.3 Transferir el filtro boca arriba sobre una placa que contenga agar mEndo.
- 7.4 Incubar las placas boca abajo 24 ± 2 h a (36 ± 1) °C.
- 7.5 Recuento. Se consideraran como coliformes presuntivos todas aquellas colonias que presenten una coloración roja con brillo metálico (oro) ya sea parcialmente o en su totalidad.
- 7.6 Calcular la densidad de coliformes totales a partir de las placas con 20 a 60 colonias. Expresar los resultados como coliformes totales por 100 ml.

NOTA: La continuada presencia de crecimiento confluyente o de TNTC ("too numerous to count") de colonias que no presenten el brillo metálico característico puede ser una señal inequívoca de un problema en la calidad del agua.

8. BIBLIOGRAFÍA

APHA, AWWA, WPCF (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th De. American Public Health Association, Washington, D.C.

Borrego, J.J. and Figueras, M.J. (1997). Microbiological quality of natural waters. Microbiología SEM 13, 413-426.

A4.2 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE COLIFORMES FECALES EN MUESTRAS DE AGUA POR FILTRACIÓN EN MEMBRANA (MF)

1. OBJETIVO

Detección de coliformes fecales en aguas mediante la técnica de filtración en membrana.

2. DEFINICIONES

Los coliformes fecales son el subgrupo dentro de los coliformes totales más estrechamente relacionado con la contaminación fecal de animales homeotermos. Este grupo de bacterias cumplen todos los criterios que definen a los coliformes totales (microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos, Gram-negativos, no formadores de esporas, bacterias con forma de bacilos que fermentan la lactosa con producción de gas y ácido en 24-48 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$) y además fermentan la lactosa con producción de gas y ácido a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en las primeras 48 h de incubación.

Los coliformes termotolerantes comprenden cepas de los géneros *Klebsiella* y *Escherichia*.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a aguas potables y recreativas y a sus diluciones.

La técnica de filtración en membrana (MF) para la detección de coliformes fecales es más precisa que la del número más probable (MPN), pero los tests por MF presentan la limitación de su utilización en aguas de baja turbidez con bajas concentraciones de flora acompañante.

4. PRINCIPIO

La técnica está basada en la captura de las células bacterianas por un filtro de membrana de $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Después de que el agua ha sido filtrada, la membrana se coloca en una placa sobre un medio sólido apropiado (mFC) y se incuba boca abajo a 44°C . Se cuentan las colonias discretas que aparecen después de 24 h, y el número de bacterias objeto de estudio se describe como unidades o partículas formadoras de colonias (CFP: *colony forming particles*) en 100 ml de la muestra original (las colonias de CF sobre la membrana en agar mFC aparecen de color azul).

5. EQUIPO Y MATERIAL

5.1 Botellas de vidrio de diferentes volúmenes.

5.2 Sistema de filtración por vacío: Rampa o matraz kitasato y trompa de vacío conectada al grifo de agua corriente o bomba de vacío. Esterilizar antes de utilizar los soportes de las membranas (rejillas o placas porosas) y los embudos de sujeción.

5.3 Pinzas de borde biselado de acero inoxidable para manipular los filtros.

5.4 Filtros de membrana de acetato/nitrato de celulosa de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore o Gelman) estériles.

5.5 Estufa a 44.5 ± 0.2 °C.

5.6 Pipetas automáticas.

Material fungible estéril, incluyendo

5.7 Placas de petri de 50 mm de diámetro.

5.8 Puntas de pipetas.

5.9 Tubos de 10 ml.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Ringer $\frac{1}{4}$

6.2 Agar mFC

6.3 Ácido Rosólico

Agar m-FC

La necesidad de que este medio sea uniforme determina la utilización del medio deshidratado. Nunca preparar el medio a partir de los ingredientes básicos si se dispone del medio deshidratado adecuado. Seguir las instrucciones del fabricante para su rehidratación.

<u>Medio m-FC</u>	
Triptosa	10 g
Peptona proteosa No. 3	5 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa	12.5 g
Sales biliares No. 3	1.5 g
Cloruro de sodio, NaCl	5 g
Azul anilino	0.1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio no se autoclava.

1. Suspender la cantidad de medio deshidratado indicada por el fabricante en 1 litro de agua destilada. Deshacer los grumos con una varilla.
2. Calentar en un cazo hasta disolver completamente y justo antes de que empiece a hervir añadir 10ml de una solución 1 % de Ácido Rosólico en 0.2 N NaOH.
3. Continuar calentando 1 minuto.
4. Transferir el contenido del cazo a una botella de vidrio Pirex estéril.
5. Enfriar hasta cerca de 50 °C y distribuir el agar m-FC en placas de petri estériles de 50 mm de diámetro x 12 mm de altura.
6. Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que el medio solidifique y después guardar a 4 °C dentro de bolsas de plástico para reducir la pérdida de humedad. Guardar máximo 2 semanas.

1 % de Ácido Rosólico en 0.2 N NaOH

Preparar la solución justo antes de utilizar.

<u>0.2 N NaOH</u>	
NaOH	0.8 g
Agua destilada	100 ml

Disolver.

<u>1 % Ácido Rosólico</u>	
Ácido Rosólico	0.1 g
NaOH 0.2 N	10 ml

Disolver.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

7.1 Selección del volumen de agua que se ha de examinar. Escoger volúmenes de muestra cuyos contajes se prevean que estarán entre 20 y 60 colonias de coliformes fecales por membrana. Cuando la densidad bacteriana de la muestra es desconocida, se filtraran distintos volúmenes o diluciones. Para las diluciones se utiliza Ringer $\frac{1}{4}$ y si el volumen que se ha de filtrar es menor de 10 ml se recomienda completarlo hasta 10 ml con Ringer $\frac{1}{4}$.

7.2 Filtración de la muestra. El sistema de filtración estará a punto para ser utilizado (portafiltros y embudos estériles, conexión para hacer el vacío preparada). Con las pinzas, colocar la membrana de 0.45 μm de acetato/nitrato de celulosa en el soporte destinado a tal efecto. Colocar el embudo portafiltro asegurándose de que no hay pérdidas. Filtrar la muestra.

7.3 Transferir el filtro boca arriba sobre una placa que contenga agar m-FC.

7.4 Incubar las placas boca abajo 24 ± 2 h a 44.5 ± 0.2 °C.

7.5 Contar las colonias azules. Las colonias producidas por bacterias coliformes fecales en el medio m-FC presentan tonalidades azules. Las colonias coliformes no fecales son grises o color crema. Normalmente en el medio m.FC se observaran pocas colonias que no sean coliformes fecales debido a la acción selectiva de la elevada temperatura y la adición de ácido rosólico.

7.6 Calcular la densidad de coliformes fecales a partir de las placas con 20 a 60 colonias. Expresar los resultados como coliformes fecales por 100 ml.

8. BIBLIOGRAFÍA

APHA, AWWA, WPCF (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th De. American Public Health Association, Washington, D.C.

Borrego, J.J. and Figueras, M.J. (1997). Microbiological quality of natural waters. Microbiología SEM 13, 413-426.

A4.3 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE *Escherichia coli* EN AGUAS POR EL MÉTODO DE MICROPLACAS (MPN: NÚMERO MÁS PROBABLE)

Esta técnica de detección de *Escherichia coli* está basada en el método estándar de microplacas francés (AFNOR NFT 90-433).

1. OBJETIVO

Detección de *Escherichia coli* en aguas.

2. DEFINICIONES

E. coli cumple todos los criterios que definen a los coliformes fecales (), es incapaz de utilizar citrato como única fuente de carbono, presenta actividad triptofanasa , ausencia de actividad ureasa, Voges-Proskauer negativo y Rojo Metil positivo. Puede distinguirse enzimáticamente por la ausencia de ureasa y la presencia de β -glucuronidasa.

E. coli es más útil como indicador microbiano de la calidad del agua porque es más específico de la presencia de contaminación fecal que el grupo de coliformes fecales.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a aguas de mar, aguas frescas superficiales, aguas residuales y plantas de depuración.

4. PRINCIPIO

La muestra de agua diluida se inocula en una serie de pocillos (96) de una microplaca que contiene el medio de cultivo deshidratado. Después de un mínimo de incubación de 36 h a 44 ± 0.5 °C se hace la lectura de las microplacas con luz ultravioleta.

La especificidad de esta técnica se basa en la detección de la actividad de β -D glucuronidasa a 44 °C durante 36 horas. El sustrato deshidratado en el fondo de los pocillos contiene MUG (4 Metilumbellifenil β -D Glucuronidasa). En presencia de la enzima, el sustrato libera un compuesto fluorescente que se detecta bajo luz ultravioleta.

5. EQUIPO Y MATERIAL

Material de laboratorio de microbiología, además de:

- 5.1 Tubos para agua destilada y para la preparación del SDM (Diluyente Especial para Microplacas) estériles.
- 5.2 Pipetas graduadas de 10 ml.
- 5.3 Pipetas para 1 ml.
- 5.4 Pipeta multicanal de 8 puntas, regulable o fija para 200 μ l por cada punta.
- 5.5 Puntas desechables.
- 5.6 Placas de Petri estériles ($\varnothing$ 90 mm)
- 5.7 Estufa a 44 °C.
- 5.8 Lámpara de UV en cámara oscura para la lectura de las placas.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Kit para el micrométodo de siembra en medio líquido MU/EC, (ref: 53782, Sanofi diagnostics Pasteur):

- 25 microplacas en embalaje individual, listas para el uso
- 30 hojas adhesivas.
- Un folleto del protocolo de instrucciones con 3 tablas estadísticas, basadas en la Ley de Poison, que permite determinar el Número Más Probable de bacterias por 100 ml de agua para analizar.

6.2 Diluyente Especial para Muestras (SDM) deshidratado (ref: 53784).

Las microplacas se deberán conservar entre 2° y 8°C. La fecha de caducidad viene indicada en la etiqueta del envase.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

PRECAUCIONES

- Trabajar con la mayor asépsia posible en el curso de las diferentes manipulaciones.
- Prestar atención a las contaminaciones por desbordamiento de un pocillo a otro.
- Homogeneizar bien cada tubo después de la dilución.

7.1 Diluciones.

El número de diluciones a sembrar varía en función del nivel de contaminación del agua para analizar.

Origen de las muestras	Número de diluciones	Número de pocillos/dilución	Rango de valoración de gérmenes/100 ml
Playas de mar	2	64 pocillos al 1/2 64 pocillos al 1/20	15 a 3.5 10 ⁴
Aguas frescas superficiales	4	24 pocillos al 1/2 24 pocillos al 1/20 24 pocillos al 1/200 24 pocillos al 1/2000	40 a 6.7 10 ⁶
Aguas residuales y de estaciones de depuración	6	16 pocillos al 1/2 hasta 16 pocillos 1/200000	60 a 3.2 10 ⁸

7.1.1 Preparación de diluciones para aguas dulces y aguas salobres (salinidad < 30 ‰).

7.1.1.1 Preparar en una gradilla el número de tubos estériles correspondientes al número de diluciones seleccionados.

7.1.1.2 Distribuir en cada tubo 9 ml del Diluyente Especial estéril.

7.1.1.3 Agitar las muestras de agua para analizar a fin de obtener una distribución homogénea de microorganismos. Transferir inmediatamente con la ayuda de

una pipeta estéril 9 ml de la muestra homogeneizada al primer tubo conteniendo 9 ml del diluyente (dilución 1/2).

7.1.1.4 Con una punta de pipeta nueva, transferir 1 ml de la dilución homogeneizada al segundo tubo que contiene 9 ml del diluyente (dilución 1/20).

7.1.1.5 A partir de la dilución 1/20 proceder a la preparación de la dilución siguiente (1/200) de la misma forma. Continuar de esta manera hasta que todas las diluciones hayan sido preparadas.

7.1.2 Preparación de diluciones para agua de mar (salinidad > 30 ‰).

7.1.2.1 Preparar en una gradilla el número de tubos estériles correspondientes al número de diluciones seleccionados.

7.1.2.2 Poner en el primer tubo 9 ml de agua destilada estéril y en los siguientes tubos 9 ml de SDM estéril

7.1.2.3 Agitar la muestra de agua para analizar. Transferir inmediatamente con la ayuda de una pipeta estéril 9 ml de la muestra homogeneizada al primer tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril (dilución 1/2).

7.1.2.4 Con una punta de pipeta nueva, transferir 1 ml de esta dilución homogeneizada al segundo tubo que contiene 9 ml del diluyente (dilución 1/20).

7.1.2.5 A partir de la dilución 1/20 proceder a la preparación de la dilución siguiente (1/200) de la misma forma. Continuar de esta manera hasta que todas las diluciones hayan sido preparadas.

7.2 Preparación de la microplaca.

Las microplacas son estériles y están listas para el uso, eliminandode esta forma todas las preparaciones de medios de cultivo en el autoclave. Se podrán sembrar desde el momento de sacarlos del frigorífico

7.3 Siembra.

7.3.1 Transferir el contenido del primer tubo de dilución a una placa estéril.

7.3.2 Con la pipeta multicanal, distribuir 200 µl en cada pocillo correspondiente a esta primera dilución.

7.3.3 Continuar de igual forma para el resto de diluciones cambiando las puntas de pipeta cada vez que se cambia de dilución.

7.4 Incubación.

Una vez sembradas, las microplacas se cubren con la hoja adhesiva provista para este efecto y se incuban como mínimo durante 36 horas a 44 °C ± 0.5 °C.

7.5 Lectura.

Los pocillos que presenten un crecimiento a 44 °C (sedimento en el fondo de los pocillos) y una fluorescencia azul bajo luz UV (366 nm), son recuento *E. coli* positivo.

7.6 Cálculo de MPN.

Las tablas de las estadísticas incluidas en el folleto de instrucciones permiten determinar el Número Más Probable con un intervalo de seguridad del 95 %.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Hernández, J.F., Guibert, J.M. Delattre, J.M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R. and Sinegre, F. (1991). Miniaturized fluorogenic assay for enumeration of *E. coli* and *Enterococci* in marine water. Wat. Sci. Tech. 24, 137-141.
- Hernández, J.F., Guibert, J.M. Delattre, J.M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R. and Sinegre, F. (1991). Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *E. coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide. Wat. Res. 25, 1073-1078.
- Manual SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR. Productos para control de aguas y Medio Ambiente (1997).

A4.4 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES EN MUESTRAS DE AGUA POR FILTRACIÓN EN MEMBRANA (MF)

1. OBJETIVO

Detección y cuantificación de enterococos fecales en aguas mediante la técnica de filtración en membrana.

2. DEFINICIONES

El grupo llamado “estreptococos fecales” comprende especies de distinto significado sanitario y diferentes características de supervivencia. Es necesario una definición más clara de este grupo de microorganismos para poder establecer una metodología estándar específica para su enumeración. La taxonomía de este grupo está en revisión.

Los estreptococos fecales dan reacción positiva con el antisuero grupo D de Lancefield, han sido aislados a partir de heces de animales de sangre caliente, son Gram positivos, células ovoides de 0.5 a 1.0 μm de diámetro, no esporulados, catalasa negativos, capacidad de fermentar la glucosa con producción de ácido a 37 °C en 24 horas.

El grupo de los enterococos es un subgrupo de los estreptococos fecales. Se diferencian de otros estreptococos por la capacidad de crecer con un 6.5 % de NaCl, a pH 9.6, también pueden crecer a 10 °C y 45 °C, resisten a 60 °C durante 30 min y tienen la capacidad de reducir un 0.1 % de azul de metileno.

Los estreptococos presuntivos fecales son bacterias que dan una reacción positiva con los medios especificados en este protocolo de trabajo.

Los estreptococos fecales son bacterias que dan una reacción positiva con los medios especificados en este protocolo, y dan una reacción negativa en el ensayo a la catalasa.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a aguas potables y recreativas y a sus diluciones.

La técnica de filtración en membrana y el agar *m-Enterococcus* es uno de los métodos recomendados en el *Standard Methods* para la enumeración de estreptococos fecales en muestras de agua fresca y salina, pero no es apropiado para aguas con una elevada turbidez.

4. PRINCIPIO

La técnica está basada en la captura de las células bacterianas por un filtro de membrana de 0.45 μm de tamaño de poro. Después de que el agua ha sido filtrada, la membrana se coloca en una placa sobre un medio sólido apropiado (*m-Enterococcus*) y se incuba boca abajo a (36 ± 1) °C. Se cuentan las colonias discretas que aparecen después de 48 h (las colonias de enterococos sobre la membrana en agar *m-Enterococcus* aparecen de color rojo). Se hace una confirmación rápida transplantando la membrana con las colonias a placas con agar Bilis Esculina. El número de bacterias objeto de estudio se describe como unidades o partículas formadoras de colonias (CFP: *colony forming particles*) en 100 ml de la muestra original.

NOTA: El primer medio donde se coloca la membrana, una vez filtrada la muestra, contiene azida sódica (destinada a inhibir el crecimiento de las bacterias gram-negativas) y cloruro de trifenil-2,3,5 tetrazolio (TTC) como indicador incoloro, que se reduce a rojo por los estreptococos fecales.

Sobre el medio de confirmación, agar biliado con esculina, después de la incubación a 44 °C los estreptococos fecales hidrolizan la esculina; el producto final, la dihidroxi-6,7 cumarina, se combina con los iones hierro (III) para dar un compueswto de coloración oscura a negra que se difunde en el medio.

5. EQUIPO Y MATERIAL

Material corriente de laboratorio de microbiología y

5.1 Botellas de vidrio de diferentes volúmenes

5.2 Sistema de filtración por vacío: Rampa o matraz kitasato y trompa de vacío conectada al grifo de agua corriente o bomba de vacío. Esterilizar antes de utilizar los soportes de las membranas (rejillas o placas porosas) y los embudos de sujeción.

5.3 Pinzas de borde biselado de acero inoxidable para manipular los filtros.

5.4 Filtros de membrana de acetato/nitrato de celulosa de 0.45 µm (Millipore o Gelman) estériles.

5.5 Estufa a 36±1 °C y estufa a 44.5 ± 0.2 °C.

5.6 Pipetas automáticas.

Material fungible estéril, incluyendo

5.7 Placas de petri de 50 mm de diámetro.

5.8 Puntas de pipetas.

5.9 Tubos de 10 ml.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Ringer ¼

6.2 Agar m-Enterococcus

6.3 Agar Bilis Esculina.

6.4 Peróxido de hidrógeno (solución de 30 g/l).

Agar m-Enterococcus para estreptococos fecales

<u>Agar m-Enterococcus</u>	
Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	2 g
Fosfato dipotásico, K ₂ HPO ₄	4 g
Azida sódica, NaN ₃	0.4 g
Cloruro de trifenil-2,3,5 tetrazolio	0.1 g
Agar	10 g
Agua destilada	1000 ml

Este medio no se autoclava.

1. Suspender la cantidad de medio deshidratado indicada por el fabricante en 1 litro de agua destilada. Deshacer los grumos con una varilla.

ADVERTENCIA: El producto es tóxico si se ingiere o se inhala. Puede causar irritación en ojos, piel y aparato respiratorio. Este medio selectivo contiene azida sódica que es una sustancia muy tóxica y por ello deben tomarse precauciones para evitar cualquier contacto con ella, en particular la inhalación de polvos finos en el momento de la preparación de los medios completos deshidratados.

2. Calentar en un cazo hasta disolver completamente. Justo cuando empieza a hervir retirar del fuego. El TTC que posee el medio es incoloro en forma oxidada, al reducirse produce un precipitado rojo insoluble. Un calentamiento en exceso dará como resultado la producción de un color rosado debido a la formación de trifenilformazán.
3. Transferir el contenido del cazo a una botella de vidrio Pirex estéril y enfriar a 50 °C rápidamente.
4. Distribuir el agar en placas de petri estériles de 50 mm de diámetro x 12 mm de altura.
5. Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que el medio solidifique y después guardar a 4 °C dentro de bolsas de plástico para reducir la pérdida de humedad. Guardar máximo 2 semanas.

Agar Bilis Esculina

Extracto de carne	3 g
Peptona	5g
Bilis de buey	40 g
Esculina	1 g
Citrato férrico	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

1. Suspender la cantidad de medio deshidratado indicada por el fabricante en una botella de pirex con agua destilada.

ATENCIÓN: El producto causa irritación de la piel y de las membranas mucosas. Puede causar reacción alérgica cutánea o respiratoria.

2. Autoclavar a 121 °C durante 15 min. El sobrecalentamiento puede causar el oscurecimiento del medio.
3. Enfriar a 50-55 °C.
4. Distribuir el agar en placas de petri estériles de 50 mm de diámetro x 12 mm de altura.
5. Dejar las placas a temperatura ambiente hasta que el medio solidifique y después guardar a 4 °C dentro de bolsas de plástico para reducir la pérdida de humedad. Guardar máximo un mes.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

7.1 Selección del volumen de agua que se ha de examinar. Escoger volúmenes de muestra cuyos contajes se prevean que estarán entre 20 y 60 colonias de enterococos

fecales por membrana. Cuando la densidad bacteriana de la muestra es desconocida, se filtrarán distintos volúmenes o diluciones. Para las diluciones se utiliza Ringer $\frac{1}{4}$ y si el volumen que se ha de filtrar es menor de 10 ml se recomienda completarlo hasta 10 ml con Ringer $\frac{1}{4}$.

7.2 Filtración de la muestra. El sistema de filtración estará a punto para ser utilizado (portafiltros y embudos estériles, conexión para hacer el vacío preparada). Con las pinzas, colocar la membrana de 0.45 μm de acetato/nitrato de celulosa en el soporte destinado a tal efecto. Colocar el embudo portafiltro asegurándose de que no hay pérdidas. Filtrar la muestra.

7.3 Transferir el filtro boca arriba sobre una placa que contenga agar m-Enterococcus y dejarlo 30 minutos.

7.4 Incubar las placas boca abajo a 36 ± 1 °C durante 44 ± 4 horas.

7.5 Contar todas las colonias rojo claro y oscuro como enterococos.

7.6 Test de confirmación. Transferir la membrana con colonias crecidas desde el agar m-Enterococcus a agar Bilis Esculina. Incubar a (44 ± 0.5) °C durante 4 horas. Contar las colonias que aparecen ennegrecidas y/o con un halo negro alrededor. Comprobar que son catalasa negativas, es decir que no se forman burbujas cuando se añaden unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %.

7.7 Calcular la densidad de estreptococos fecales a partir de las placas con 20 a 60 colonias. Expresar los resultados como estreptococos fecales por 100 ml.

8. BIBLIOGRAFÍA

APHA, AWWA, WPCF (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th De. American Public Health Association, Washington, D.C.

Borrego, J.J. and Figueras, M.J. (1997). Microbiological quality of natural waters. Microbiología SEM 13, 413-426.

Norma española UNE 77-076-91 (noviembre 1991). Calidad del agua. Investigación y recuento de estreptococos fecales. Parte 2: Métodos de filtración por membrana.

A4.5 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROCOCOS EN AGUAS POR EL MÉTODO DE MICROPLACAS (MPN: NÚMERO MÁS PROBABLE)

Esta técnica de detección de Enterococos está basada en el método estándar de microplacas francés (AFNOR NFT 90-432).

1. OBJETIVO

Detección de enterococos en aguas.

2. DEFINICIONES

Enterococos: Microorganismos cocoides, no esporulados, Gram positivos, catalasa negativos, capaces de crecer en aerobiosis a 45 °C y pH 9.6, y capaces de hidrolizar la esculina en presencia de un 40 % de sales biliares.

Los enterococos son capaces de crecer en aerobiosis a 44 °C $\pm$ 0.5 °C en medio líquido e hidrolizar el 4-metil-umbelliferil β -D glucosido (MUD) en presencia de acetato de talio y ácido nalidíxico.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a aguas de mar, aguas frescas superficiales, aguas residuales y plantas de depuración.

4. PRINCIPIO

La muestra de agua diluida se inocula en una serie de pocillos (96) de una microplaca que contiene el medio de cultivo deshidratado. Después de un mínimo de incubación de 36 h a 44 $\pm$ 0.5 °C se hace la lectura de las microplacas con luz ultravioleta.

La especificidad de esta técnica se basa en la detección de la actividad de β -D glucosidasa a 44 °C durante 36 horas. El sustrato deshidratado en el fondo de los pocillos contiene MUD (4 Metilumbellifenil β -D Glucosidasa). En presencia de la enzima, el sustrato libera un compuesto fluorescente que se detecta bajo luz ultravioleta.

5. EQUIPO Y MATERIAL

Material de laboratorio de microbiología, además de:

5.1 Tubos para agua destilada y para la preparación del SDM (Diluyente Especial para Microplacas) estériles.

5.2 Pipetas graduadas de 10 ml.

5.3 Pipetas para 1 ml.

5.4 Pipeta multicanal de 8 puntas, regulable o fija para 200 μ l por cada punta.

5.5 Puntas desechables.

5.6 Placas de Petri estériles ($\varnothing$ 90 mm)

5.7 Estufa a 44 °C.

5.8 Lámpara de UV en cámara oscura para la lectura de las placas.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Kit para el micrométodo de siembra en medio líquido MU/EF, (ref: 53783, Sanofi diagnostics Pasteur):

- 25 microplacas en embalaje individual, listas para el uso,
- 30 hojas adhesivas.
- Un folleto del protocolo de instrucciones con 3 tablas estadísticas, basadas en la Ley de Poison, que permite determinar el Número Más Probable de bacterias por 100 ml de agua para analizar.

6.2 Las microplacas se deberán conservar entre 2° y 8°C. La fecha de caducidad viene indicada en la etiqueta del envase.

7 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

PRECAUCIONES

- Trabajar con la mayor asépsia posible en el curso de las diferentes manipulaciones.
- Prestar atención a las contaminaciones por desbordamiento de un pocillo a otro.
- Homogeneizar bien cada tubo después de la dilución.

7.1 Diluciones.

El número de diluciones a sembrar varía en función del nivel de contaminación del agua para analizar.

Origen de las muestras	Número de diluciones	Número de pocillos/dilución	Rango de valoración de gérmenes/100 ml
Playas de mar	2	64 pocillos al 1/2 64 pocillos al 1/20	15 a 3.5 10 ⁴
Aguas frescas superficiales	4	24 pocillos al 1/2 24 pocillos al 1/20 24 pocillos al 1/200 24 pocillos al 1/2000	40 a 6.7 10 ⁶
Aguas residuales y de estaciones de depuración	6	16 pocillos al 1/2 hasta 16 pocillos 1/200000	60 a 3.2 10 ⁸

7.1.1 Preparación de diluciones para aguas dulces y aguas salobres (salinidad < 30 %).

7.1.1.1 Preparar en una gradilla el número de tubos estériles correspondientes al número de diluciones seleccionados.

7.1.1.2 Distribuir en cada tubo 9 ml del Diluyente Especial estéril.

7.1.1.3 Agitar las muestras de agua para analizar a fin de obtener una distribución homogénea de microorganismos. Transferir inmediatamente con la ayuda de una pipeta estéril 9 ml de la muestra homogeneizada al primer tubo conteniendo 9 ml del diluyente (dilución 1/2).

- 7.1.1.4** Con una punta de pipeta nueva, transferir 1 ml de la dilución homogeneizada al segundo tubo que contiene 9 ml del diluyente (dilución 1/20).
- 7.1.1.5** A partir de la dilución 1/20 proceder a la preparación de la dilución siguiente (1/200) de la misma forma. Continuar de esta manera hasta que todas las diluciones hayan sido preparadas.

7.1.2 Preparación de diluciones para agua de mar (salinidad > 30 %).

- 7.1.2.1** Preparar en una gradilla el número de tubos estériles correspondientes al número de diluciones seleccionados.
- 7.1.2.2** Poner en el primer tubo 9 ml de agua destilada estéril y en los siguientes tubos 9 ml de SDM estéril
- 7.1.2.3** Agitar la muestra de agua para analizar. Transferir inmediatamente con la ayuda de una pipeta estéril 9 ml de la muestra homogeneizada al primer tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril (dilución 1/2).
- 7.1.2.4** Con una punta de pipeta nueva, transferir 1 ml de esta dilución homogeneizada al segundo tubo que contiene 9 ml del diluyente (dilución 1/20).
- 7.1.2.5** A partir de la dilución 1/20 proceder a la preparación de la dilución siguiente (1/200) de la misma forma. Continuar de esta manera hasta que todas las diluciones hayan sido preparadas.

7.2 Preparación de la microplaca.

Las microplacas son estériles y están listas para el uso, eliminandode esta forma todas las preparaciones de medios de cultivo en el autoclave. Se podrán sembrar desde el momento de sacarlos del frigorífico

7.3 Siembra.

- 7.3.1** Transferir el contenido del primer tubo de dilución a una placa estéril.
- 7.3.2** Con la pipeta multicanal, distribuir 200 µl en cada pocillo correspondiente a esta primera dilución.
- 7.3.3** Continuar de igual forma para el resto de diluciones cambiando las puntas de pipeta cada vez que se cambia de dilución.

7.4 Incubación.

Una vez sembradas, las microplacas se cubren con la hoja adhesiva provista para este efecto y se incuban como mínimo durante 36 horas a $44\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$.

7.5 Lectura.

Los pocillos que presenten un crecimiento a 44 °C (sedimento en el fondo de los pocillos) y una fluorescencia azul bajo luz UV (366 nm), son recuento positivo de Enterococos.

7.6 Cálculo de MPN.

Las tablas de las estadísticas incluidas en el folleto de instrucciones permiten determinar el Número Más Probable con un intervalo de seguridad del 95 %.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Hernández, J.F., Guibert, J.M. Delattre, J.M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R. and Sinegre, F. (1991). Miniaturized fluorogenic assay for enumeration of *E. coli* and *Enterococci* in marine water. Wat. Sci. Tech. 24, 137-141.
- Hernández, J.F., Pourcher, A.M., Delattre, J.M., Oger, C. and Loeuillard, J.L. (1993). NMP Miniaturized procedure for the enumeration of faecal enterococci in fresh and marine waters, the must procedure. Wat. Res. 27, 597-606.
- Manual SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR. Productos para control de aguas y Medio Ambiente (1997).

A4.6 DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ESPORAS DE MICROORGANISMOS ANAEROBIOS DE SULFITO-REDUCTORES (CLOSTRIDIA)

1. OBJETIVO

Detección y recuento mediante la técnica de inoculación en masa de esporas de clostridios sulfito-reductores.

2. DEFINICIONES

Los clostridios con capacidad de reducir el sulfito son bacilos gram positivos, anaeróbicos estrictos pertenecientes a la familia *Bacillaceae* y al género *Clostridium*. Son capaces de producir esporas.

C. perfringens ha sido propuesto como indicador de la calidad del agua debido a que:

- a. están presentes en la materia fecal humana y animal, en las aguas residuales y en el suelo;
- b. son más estables en el ambiente acuático que muchos patógenos; y
- c. han sido utilizados satisfactoriamente para controlar aguas contaminadas con agua residual.

Aún así, los clostridios sulfito-reductores se consideran ubicuos en sedimentos acuáticos y debido a problemas con su detección específica y metodología de recuperación queda limitado su valor potencial como organismos indicadores. Debido a la gran resistencia y longevidad de sus esporas, estas bacterias pueden ser útiles indicadores de contaminación fecal remota.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a aguas potables, recreativas, aguas residuales y a sus diluciones. También puede utilizarse con eluidos de sedimentos y con extractos de marisco.

4. PRINCIPIO

La selección de las esporas presentes en la muestra se realiza mediante la aplicación de calor durante un período de tiempo suficiente para destruir las bacterias vegetativas. La muestra se mezcla con el agar SPS en forma líquida, se deja solidificar y se incuba a 44°C durante 24 horas. Se cuentan las colonias que aparecen de color negro inmersas en el agar.

5. EQUIPO Y MATERIAL

Material de laboratorio empleado normalmente en bacteriología y

5.1 Baño de agua regulado a 80 °C.

5.2 Estufa de cultivo controlada a 44 ± 1 °C.

5.3 Pipetas automáticas de 10 ml y 1 ml de capacidad.

Material fungible estéril, incluyendo

5.4 Puntas de pipetas.

5.5 Tubos de 50 ml de tapa roscada.

6. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Ringer 1/4.

6.2 Agar SPS (sulfite polymyxin sulfadiazine).

Agar SPS de concentración simple

Composición del medio deshidratado:

Sulfito sódico	0.5 g
Sulfato de polimixina B	0.01 g
Sulfadiazina sódica	0.12 g
Peptona de caseína	15 g
Extracto de levadura	10 g
Citrato de hierro (III)	0.5 g
Tween 80	0.05 g
Tioglicolato sódico	0.10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

1. Suspender la cantidad de medio deshidratado indicada por el fabricante en una botella pirex que contenga agua destilada.
2. Esterilizar al autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
3. Enfriar rápidamente. Si se va a utilizar el mismo día puede mantenerse en un baño a 55 °C. Si se sobrecalienta, el agar SPS adquiere una tonalidad oscura y el recuento de clostridios será subestimado.
4. Guardar a 4 °C por un período de tiempo no mayor de un mes.
5. Refundir el agar con cortos intervalos de baja energía en el microondas agitando el medio para impedir sobrecalentamiento o bien al baño maría.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

7.1 Selección del volumen de agua que se ha de examinar. Escoger volúmenes de muestra cuyos contajes se prevean que estarán entre 10 y 50 colonias de clostridios sulfito-reductores por tubo. Cuando la densidad bacteriana de la muestra es desconocida, se utilizarán distintos volúmenes o diluciones. Para las diluciones se utiliza Ringer 1/4. Se aconseja analizar cada muestra al menos por duplicado.

7.2 Choque térmico. Incubar la muestra y/o diluciones en un baño de agua a 80 °C durante 10 minutos. De este modo se realiza un choque térmico que mata los organismos viables presentes en la muestra y que activa la germinación de las esporas.

7.3 Adición del agar. Dejar enfriar la muestra hasta los 50 °C aproximadamente en tubos de 50 ml. Dispensar el agar SPS templado a 45-55 °C en el interior de los tubos que contienen la muestra. Deben llenarse los tubos hasta arriba de líquido y garantizar que exista sólo un pequeño volumen de aire. Homogeneizar el agar y la muestra por inversión. Si el volumen de muestra a analizar es mayor de 10 ml/tubo puede utilizarse agar SPS doble concentrado (en los tubos de 50 ml, máximo 25 ml de muestra y 25 ml de agar SPS doble concentrado).

7.4 Incubación. Una vez el agar solidificado a temperatura ambiente, incubar a 44 °C durante 24 horas.

7.5 Cálculo de la densidad de clostridios sulfito-reductores en la muestra inicial a partir del conteo de colonias negras inmersas en el agar teniendo en cuenta las diluciones. El color negro de las colonias es consecuencia de la reducción del sulfito y la precipitación del sulfuro de hierro (III). Expresar los resultados como cfp/100 ml.

8. BIBLIOGRAFÍA

APHA, AWWA, WPCF (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th De. American Public Health Association, Washington, D.C.

Borrego, J.J. and Figueras, M.J. (1997). Microbiological quality of natural waters. Microbiología SEM 13, 413-426.

UNE-EN 26461-1 (1995). Calidad del agua. Detección y recuento de los esporos de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia).

A4.7 CONTROL DE CALIDAD DE LA ENUMERACIÓN DE *Escherichia coli* (NFT 90-433) Y ENTEROCOCOS (NFT 90-432)

LENTÍCULA J PHLS

1. OBJETIVO

Enumeración de *Escherichia coli* y enterococos en una muestra estándar denominada Lenticula J.

2. DEFINICIONES

La Lenticula J PHLS ha sido preparada en un laboratorio acreditado y es un material de referencia certificado. Se conserva a -20°C , es un material que ha sido liofilizado y tiene forma y tamaño de lenteja. Contiene un número determinado de microorganismos de *Escherichia coli* y enterococos.

3. PRINCIPIO

Se trata de preparar la muestra estándar con la Lenticula J, y analizarla con el método de microplacas MU/EC y MU/SF para tener un control de este método. Los resultados obtenidos se presentan sobre la carta de control correspondiente.

4. EQUIPO Y MATERIAL

Se requiere material de laboratorio de microbiología y el material especificado en los procedimientos para el análisis de *E. coli* y enterococos por microplaca (Anexos y), incluyendo:

- 4.1 Botellas estériles de 100 ml con marcas de volumen.
- 4.2 Pipetas graduadas de 10 ml.
- 4.3 Pipeta multicanal de 8 puntas, regulable o fija para 200 μl por cada punta.
- 4.4 Puntas desechables estériles.
- 4.5 Placas de Petri estériles ($\varnothing$ 90 mm)
- 4.6 Estufa a 44°C .
- 4.7 Lámpara de UV en cámara oscura para la lectura de las placas.

5. DILUYENTES, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 Kit para el micrométodo de siembra en medio líquido MU/EC y MU/EF, (ref: 53783 y 53782, respectivamente, Sanofi diagnostics Pasteur):

- 25 microplacas en embalaje individual, listas para el uso
- 30 hojas adhesivas.
- Un folleto del protocolo de instrucciones con 3 tablas estadísticas, basadas en la Ley de Poison, que permite determinar el Número Más Probable de bacterias por 100 ml de agua para analizar.

Las microplacas se deberán conservar entre 2° y 8°C. La fecha de caducidad viene indicada en la etiqueta del envase.

5.2 Diluyente Especial para Muestras (SDM) deshidratado (ref: 53784).

5.2.1 Instrucciones para la preparación del SDM ("*Special Saline Diluent*")

- Disolver 22.5 g/l en agua destilada o desionizada.
- Verificar salinidad/conductividad: 20 g/l $\pm$ 3 g/l o 25000 μ S/cm.
- Ajustar el pH si fuera necesario: 7.4 < pH < 8.4.
- Distribuir la solución SDM en botellas (50 ml o 100 ml).
- Esterilizar las botellas por autoclave a (121 $\pm$ 1)° C durante 20 min.

Proceso de control de calidad:

- Comprobar la esterilidad
- Verificar que el volumen es de 50 y 100 ml: 47 ml < vol1 < 53 ml
95 ml < vol2 < 105 ml
- Rotular el lote de SDM.

6. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de la muestra estándar (muestra control J)

Material: **1 Lénticula J,**
Botella de 100 ml de SDM.

- Coger el vial J de (-25 $\pm$ 5)° C y dejar a temperatura ambiente durante 15 min.
- Desenroscar la tapa del vial y con unas pinzas finas sacar 1 lénticula del parafilm. Añadir la lénticula a 100 ml de solución SDM.
- Esperar 10 min. para la completa disolución.
- Agitar la botella 60 veces durante 30 segundos.
- La muestra estándar está preparada (botella de 100 ml).

6.2 Análisis de la muestra estándar

Aplicación de los métodos MU/EC y MU/SF

- Preparar una dilución 1/2 en SDM (50 ml de la muestra estándar en 50 ml de SDM estéril).
- Inocular una microplaca MU/EC (96 pocillos) y una microplaca MU/SF (96 pocillos).
- Incubar a (44 $\pm$ 1)° C durante (44 $\pm$ 4) h.
- Considerar los pocillos fluorescentes como positivos. Utilizar una tabla de MPN para determinar los resultados por el número más probable (N/100 ml).

6.3 Resultados y carta control para la lénticula J

Estos límites se aplicaron a los resultados obtenidos con las lentículas J proporcionadas por el IPL para el control de los **análisis de aguas de baño** realizados en **verano de 1998**.

Intervalos de confianza al 95 %

EC	Límite inferior:	200 <i>E. coli</i> / 100 ml
	Límite superior:	800 <i>E. coli</i> / 100 ml
EN	Límite inferior:	75 Enterococos / 100 ml
	Límite superior:	450 Enterococos / 100 ml

7. BIBLIOGRAFÍA

- Hernández, J.F., Guibert, J.M. Delattre, J.M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R. and Sinégre, F. (1991). Miniaturized fluorogenic assay for enumeration of *E. coli* and *Enterococci* in marine water. Wat. Sci. Tech. 24, 137-141.
- Hernández, J.F., Guibert, J.M. Delattre, J.M., Oger, C., Charriere, C., Hughes, B., Serceau, R. and Sinégre, F. (1991). Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *E. coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide. Wat. Res. 25, 1073-1078.
- Manual SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR. Productos para control de aguas y Medio Ambiente (1997).

Anexo 4: Control de los materiales de trabajo

REGISTRO DEL CONTROL DE ESTERILIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Medios de cultivo, aditivos y diluyentes

Medio líquido MSB	Agar blando ssMSA
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	pH:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos:.....	Ausencia de bacteriófagos:.....
Ausencia de bacterias:.....	Ausencia de bacterias:.....
Placas agar MSA	CaCl₂
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos:.....	Ausencia de bacteriófagos:.....
Ausencia de bacterias:.....	Ausencia de bacterias:.....
Medio líquido TYGB	Agar blando ssTYGA
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	pH:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos:.....	Ausencia de bacteriófagos:.....
Ausencia de bacterias:.....	Ausencia de bacterias:.....
Placas agar TYGA	Calcio-glucosa
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos:.....	Ausencia de bacteriófagos:.....
Ausencia de bacterias:.....	Ausencia de bacterias:.....

Medios de cultivo, aditivos y diluyentes (continuación)

Agar McConkey	RNasa
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	Fecha de control de esterilidad:
Fecha de control de esterilidad:	Ausencia de bacteriófagos:.....
Ausencia de bacteriófagos:.....	Ausencia de bacterias:.....
Ausencia de bacterias:.....	MS2 no aparece en medio con RNasa:.....
Ácido nalidíxico	Peptona salina
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	pH:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....
Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....
Medio líquido BPRMb	Agar blando ssBPRMA
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	pH:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos (anaerobiosis):.....	Ausencia de bacteriófagos (anaerobiosis):.....
Ausencia de bacterias (anaerobiosis):.....	Ausencia de bacterias (anaerobiosis):.....
Placas agar BPRMA	Hemina
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
pH:.....	Fecha de control de esterilidad:
Fecha de control de esterilidad:	Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....
Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....
Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....	
Na₂CO₃	Kanamicina
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....
Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....

Soluciones para la concentración de bacteriófagos

MgCl₂·6H₂O (4.14M)	Eluyente (1%BE, 0.5M NaCl, 3%T80)
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
	pH:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....
Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....
MgCl₂·6H₂O (1M)	K₂HPO₄ (1M)
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....
Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....
NaOH (2M)	Tampón de fagos
Cantidad preparada:.....	Cantidad preparada:.....
Fecha de preparación del material:.....	Fecha de preparación del material:.....
Aspecto del producto:.....	Aspecto del producto:.....
	pH:.....
Fecha de control de esterilidad:	Fecha de control de esterilidad:
Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacteriófagos (aer./anaer.):.....
Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....	Ausencia de bacterias (aer./anaer.):.....

<i>E. coli</i> WG5 (para preparar lote Nc1WG5)
Fecha: <u>6/5/97</u>
Crecimiento en placas agar McConkey: <u>100 % colonias lac+</u>
Evaluación de la cepa: <u>Correcto</u>
<i>S. typhimurium</i> WG49 (para preparar lote Nc3WG49)
Fecha: <u>22/5/97</u>
Crecimiento en placas agar McConkey: <u>93 % colonias lac+</u>
Sensibilidad Kanamicina: <u>Sensibilidad (diámetro 5 mm)</u>
Sensibilidad Ácido nalidíxico: <u>Resistencia</u>
Evaluación de la cepa: <u>Correcto</u>
<i>Bact. fragilis</i> HSP40 (número resiembra Nc a partir de cultivo stock)
Fecha: <u>4/3/97</u>
Número resiembra: <u>1</u>
Tinción Gram: <u>Bacilos gram negativos</u>
Evaluación de la cepa: <u>Correcto</u>

REGISTRO DE LA VIABILIDAD DE LOS CULTIVOS DE TRABAJO

Validación cultivo de trabajo *Bact. fragilis* HSP40, lote NcHSP40 (Sep98)

Nº Vial	TIEMPO O incub. (min)	DO ₆₂₀	Cuantificación de viables (cfp/ml)			Sensibilidad a B40-8 (pfp/ml)		
			Rep1	Rep2	criterio calidad	Vial 1	Vial 2	criterio calidad
2 en 30 6/10	0	0.079			1x10 ⁸			96 (control UB)
	80	0.12						
	140	0.24						
	170	0.35	1.6x10 ⁸			113		
2 en 30 8/10	0	0.08						
	70	0.09						
	145	0.14						
	210	0.24						
	260	0.37				94	114	
3 en 30 9/10	0	0.09						
	100	0.14						
	150	0.25						
	180	0.3	1x10 ⁸			92		
3 en 30 19/10	0	0.09						
	45	0.12						
	149	0.3				91		

Cultivo de trabajo lote NcHSP40 (Sep98) VALIDADO
Tiempo de incubación: 3:00 h

Validación cultivo de trabajo *E. coli* WG5, lote Nc1WG5 (7/5/97)

Nº Vial	Tiempo incubación (h)	DO _{600 nm}	Cuantificación de viables (cfp/ml)			Sensibilidad a φX174 (pfp/ml)		
			Rep1	Rep2	criterio calid	Vial 1	Vial 2	criterio calid
1 20/5/97	1:30	0.2	1.95x10 ⁷	5x10 ⁷	1.0x10 ⁸			
	2:35	0.50	1.5x10 ⁸	1x10 ⁸				
	3:30	0.9	7.8x10 ⁸	9x10 ⁸				
2 26/5/97	1:15	0.17			1.0x10 ⁸			
	2:00	0.40				48	54	49.5 (control UB)
	3:45	1.17	1.1x10 ⁹	5.9x10 ⁸				
3 5/6/97	0:30	0.07	9x10 ⁶		1.0x10 ⁸			
	2:15	0.48	3x10 ⁷	2x10 ⁷				
	2:35	0.55	1.2x10 ⁸	1x10 ⁸		44	47	

Cultivo de trabajo lote Nc1WG5 (7/5/97) VALIDADO
 Tiempo de incubación: 2:30 h

Validación cultivo de trabajo *S. typhimurium* WG49, lote Nc3WG49 (23/5/97)

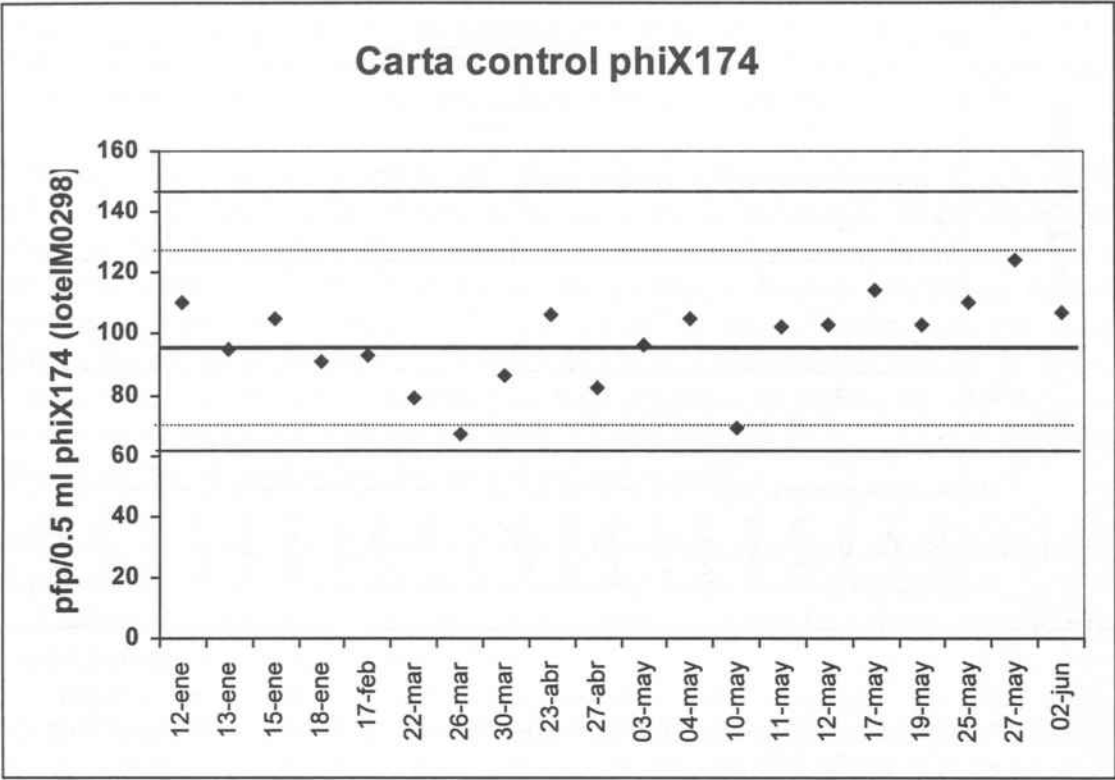
Nº Vial	Tiempo incubación (h)	DO ₆₀₀	Cuantificación de viables (cfp/ml)			% Lac- en agar McConkey (cfp/ml)				Sensibilidad a MS2 (pfu/ml)		
			Rep1	Rep2	criterio calidad	lac-	Total	% lac-	criterio calidad	Vial 1	Vial 2	criterio calidad
1 3/6/97	0:30	0.00	2.06x10 ⁶		1.0x10 ⁸				<10%			48 (control UB)
	2:35	0.18	2.5x10 ⁷	3x10 ⁷								
	3:42	0.5										
2 26/6/97	0:00	0.00	3.6x10 ⁶	4x10 ⁶	1.0x10 ⁸	wc 1x10 ⁶	1.51x10 ⁸	0.7	<10%			48 (control UB)
	1:40	0.14	9x10 ⁶	2x10 ⁷		ic 0	1.4x10 ⁷	0				
	3:05	0.34	9x10 ⁷	1x10 ⁸								
3 27/6/97	2:00	0.13			1.0x10 ⁸				<10%			48 (control UB)
	2:43	0.25										
	3:45	0.48	4.5x10 ⁸	3.5x10 ⁸						46	52	

Cultivo de trabajo lote Nc3WG49 (23/5/97) VALIDADO
Tiempo de incubación: 3:00 h

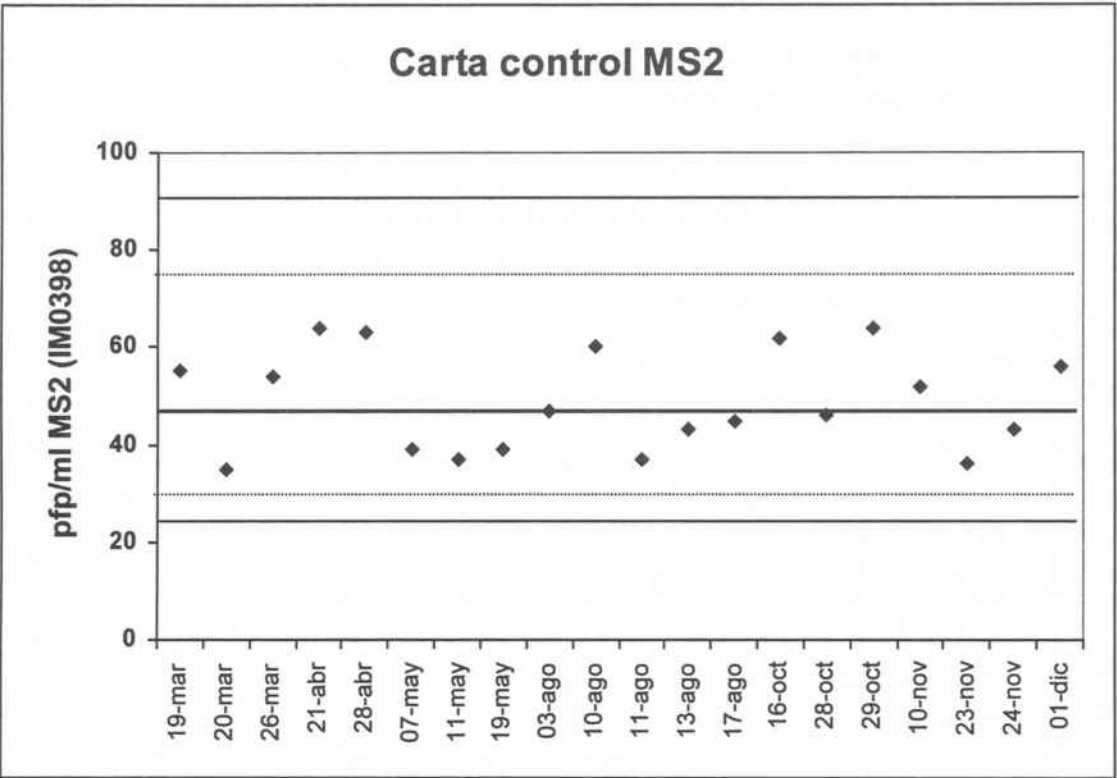
wc: "working culture" (cultivo de trabajo)
ic: "inoculum culture" (cultivo inóculo)
No realizamos la comparación de la titulación de MS2 con la cepa huésped *E. coli* K12 Hfr

CARTAS DE CONTROL DE LOS MATERIALES DE REFERENCIA DE LA
CAMPAÑA DE 1997 DEL CAPÍTULO IV

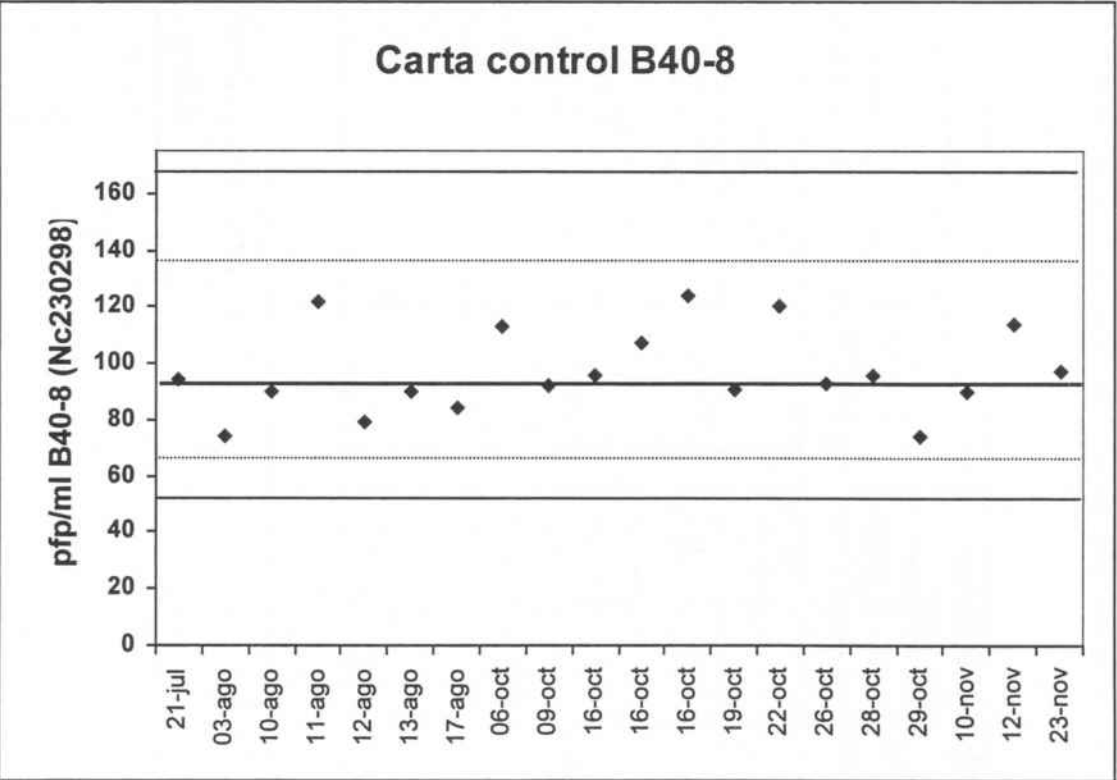
Material de referencia ϕ X174 (IM0298). Límites del control: $x+3s= 147.6$; $x+2s= 128.0$; $x= 96.2$; $x-2s= 72.3$; $x-3s= 62.7$.



Material de referencia MS2 (IM0398). Límites del control: $x+3s= 92.8$; $x+2s= 74.4$; $x= 47.8$; $x-2s= 30.8$; $x-3s= 24.7$.



Material de referencia B40-8 (Nc230298). Límites del control: $x+3s= 165.6$; $x+2s= 138.0$; $x= 95.9$; $x-2s= 66.6$; $x-3s= 55.6$.



4.3.1.3 Viabilidad de los cultivos de trabajo.

La utilización de los cultivos de trabajo con *E. coli* WG5 la introdujimos en mayo del 97 y empezamos a elaborar cultivos de trabajo congelados de *Bact. fragilis* HSP40 en noviembre del 97. Anteriormente habíamos trabajado con la cepa *E. coli* CN13 para la detección y cuantificación de colifagos somáticos (Payment and Franco, 1993) y preparábamos el cultivo inóculo para *Bact. fragilis* a partir de un crecimiento de toda la noche en medio líquido de la cepa correspondiente según ISO/10705-4/DAL 97: Draft 02-97. Desde que iniciamos el estudio de fagos F-específicos con *S. typhimurium* WG49 siempre trabajamos de acuerdo a ISO 107065-1/1st/08-95.

Produjimos tres cultivos de trabajo que funcionaron correctamente para *E. coli* WG5 y cuatro para *S. typhimurium* WG49 a lo largo de la temporada 96-97-98-99. Los primeros dos lotes preparados para cada una de las bacterias anteriores eran de aproximadamente 90 viales con 0.6 ml de cultivo y después decidimos preparar aproximadamente 180 viales por lote. En el caso de *Bact. fragilis*, cada lote estaba constituido por aproximadamente 48 viales de 1.2 ml y tuvimos que preparar ocho lotes para *Bact. fragilis* HSP40 y tres lotes para *Bact. fragilis* RYC2056 a lo largo de la fase experimental, pues habitualmente trabajábamos con tubos de 30 ml a los que añadíamos 3 ml de cultivo de trabajo para preparar el cultivo inóculo.

Problemas detectados en algunos lotes de cultivo de trabajo (no contabilizados en el párrafo anterior) que nos condujeron a su exclusión como material de trabajo:

- Disminución de la sensibilidad de la bacteria huésped al fago de referencia (experimentado con MS2 y B56-1).
- Aumento del tiempo de incubación necesario para conseguir un buen cultivo inóculo, después de una temporada de haber funcionado correctamente (experimentado con *S. typhimurium* WG49 y *Bact. fragilis* HSP40) o desde el primer momento (experimentado con *Bact. fragilis* HSP40).

FORMULARIOS PARA EL CONTROL DE MEDIOS, REACTIVOS Y CULTIVO INÓCULO Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE BACTERIÓFAGOS (a rellenar el día que se realiza el análisis de fagos)

CONTROL DE CALIDAD
CUANTIFICACIÓN DE FAGOS DE *B. fragilis* HSP40

DÍA DEL ANÁLISIS DE BACTERIÓFAGOS:

MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO BPRMB							
- Preparación caldo BPRM, día: - Adición de ingredientes, día: (hemina, Na₂CO₃, HCl, antibióticos) EN CABINA DE FLUJO LAMINAR SÍ NO - Control de esterilidad, día:	<u>Día del análisis de fagos:</u> - Aspecto del medio: - pH del medio:						
PREPARACIÓN DEL CULTIVO INÓCULO							
- Cultivo de trabajo <i>B. fragilis</i> HSP40 preparado el: - y validado el:	- Proporción cultivo de trabajo/ medio de cultivo: - Volumen del tubo y condición anaeróbica:						
Total tiempo incubación a 37°C: _____ min.							
Observaciones:							
<table><tr><th>Hora</th><th>DO₆₂₀</th></tr><tr><td>inicio:</td><td></td></tr><tr><td>final:</td><td></td></tr></table> Tiempo (min.) transcurrido desde el final de la incubación al inicio de la titulación: Condiciones: Tª ambiente 4°C hielo fundente	Hora	DO ₆₂₀	inicio:		final:		
Hora	DO ₆₂₀						
inicio:							
final:							

CONTROL DE CALIDAD: CUANTIFICACIÓN DE FAGOS DE *B. fragilis* HSP40
(continuación) Hoja 2

TITULACIÓN	
• Placas BRMA, preparadas el día: • Aspecto: • Antibióticos: SÍ NO	• Agar blando ssBPRMA preparado el: • y fundido el día: • Adición de ingredientes de calidad controlada: • Concentración antibióticos: 100 µg/ml Kanamicina 300 µg/ml Kanamicina 100 µg/ml Ác. nalidíxico - Vancomicina
Anaerobiosis:	
CONTROLES NEGATIVOS	CONTROLES POSITIVOS
• ssBPRMA sin aditivos: • ssBPRMA con aditivos: • ssBPRMA+peptona salina: • ssBPRMA+<i>B fragilis</i>fHSP40: inicio (cultivo inóculo) • ssBPRMA+ <i>B fragilis</i>fHSP40: final	• Día preparación del material de referencia (RM) B40-8: • Preparación carta control: • 1 ml B40-8: _____ pfp • Límites de la carta de control: - x+3s - x+2s - x - x-2s - x-3s
Tiempo de incubación (horas): Tiempo transcurrido desde la incubación a la lectura de las calvas:	
OBSERVACIONES:	

CONTROL DE CALIDAD: CUANTIFICACIÓN DE FAGOS DE *B. fragilis* HSP40
(continuación) Hoja 3

RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS NATURALES				
Titulación día:		Muestra:		
DO HSP40	HSP40	Volumen de muestra por placa:		
		(dilución)		
placa 1	placa 2	placa 3	placa 4	placa 5
placa 6	placa 7	placa 8	placa 9	placa 10
TOTAL calvas	pfp/ml	B40-8	Observaciones (aspecto de las calvas, problemas...):	

El control de calidad para la cuantificación de fagos de *B. fragilis* RYC2056 es idéntico al que se realiza para los fagos de *B. fragilis* HSP40 con la variación correspondiente en la cepa huésped y en el fago de referencia.

Anexo 5: Medios y reactivos

Preparación membranas de diálisis**Tampón de lavado**

Na ₂ CO ₃	20 g
EDTA 0.2 M	5 ml
Agua destilada	995 ml

Disolver por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Tampón EDTA

EDTA 0.2 M	5 ml
Agua destilada	995 ml

Mezclar por agitación. Preparar inmediatamente antes de utilizar.

Solución al 3 % de BE (beef extract = extracto de carne)

Agua destilada estéril	10 ml
Extracto de carne	0.3 g

Agitar hasta disolver. Preparar justo antes de utilizar.

Tampón glicina 0.25 M, pH 9.5

Glicina	1.88 g
Agua destilada	100 ml

Disolver. Ajustar el pH a 9.5 con NaOH 10 M.

Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

HCl 0.1 N

Trabajar en campana de extracción de gases.

Añadir en el siguiente orden:

Agua destilada	913.8 ml
HCl concentrado (35 %)	86.2 ml

Obtenemos una dilución de HCl 1 N.

En una botella de cristal diferente preparar la solución 0.1 N:

Agua destilada	900 ml
HCl 1 N	100 ml

Anexo 6: Métodos de concentración

CONCENTRACIÓN DE BACTERIOFAGOS POR MICROFILTRACIÓN DE 100 ml Y POSTERIOR ELUCIÓN ORBITAL

1. OBJETIVO

Concentración de bacteriófagos desde un volumen inicial de 100 ml a un volumen final de 2 ml, por filtración en membrana (microfiltración).

2. DEFINICIONES

Los bacteriófagos son virus bacterianos capaces de infectar cepas huésped seleccionadas. Producen calvas visibles (zonas claras) en un césped de crecimiento confluyente bajo condiciones de cultivo apropiadas.

Mediante la técnica de microfiltración, los fagos son retenidos en una membrana de 0.22 μm de tamaño de poro. En esta adsorción intervienen factores físico-químicos (interacciones electrostáticas y fuerzas hidrofóbicas).

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método va dirigido a la concentración y detección de colifagos somáticos, fagos F-específicos totales, fagos F-RNA y fagos de *Bacteroides fragilis* HSP40 y *B. fragilis* RYC2056 en aguas potables y recreativas.

Su utilización se limita a aguas de baja turbidez con bajas concentraciones de flora acompañante.

Los volúmenes a ser analizados con membranas de 47 mm de diámetro estarán comprendidos entre 50 y 1000 ml recomendándose 100 ml para aguas recreativas y 1000 ml para aguas potables.

4. PRINCIPIO

La técnica está basada en la captura de bacteriófagos por un filtro de membrana de 0.22 μm de tamaño de poro y posterior desadsorción de dicha membrana con un eluyente a pH alcalino. La operación de elución de los fagos adsorbidos a la membrana de ésteres de celulosa es facilitada por un movimiento orbital de fregado de la superficie del filtro. Se cuantifica el número de bacteriófagos presentes en el concentrado y se expresan los resultados como pfp en 100 ml de muestra inicial.

5. EQUIPO Y MATERIAL

Material de laboratorio de bacteriología que incluya:

5.1 Botellas de vidrio estériles de diferentes volúmenes.

5.2 Sistema de filtración por vacío: rampa o matraz kitasato y trompa de vacío conectada al grifo de agua corriente o bien bomba de vacío. Los soportes de las membranas (rejillas o placas porosas) y los embudos de sujeción se utilizarán siempre estériles (15 min. 121°C).

5.3 Pinzas de borde biselado de acero inoxidable para manipular los filtros.

5.4 Pipetas automáticas.

5.5 Varillas magnéticas.

5.6 Agitador magnético.

5.7 pHímetro.

5.8 Tiras reactivas de pH.

5.9 Agitador orbital.

Material fungible estéril, incluyendo:

5.10 Puntas de pipetas.

5.11 Tubos de 10 ml.

5.12 Placas de petri de 55 mm de diámetro.

Filtros: Filtros de membrana de 47 mm de diámetro de acetato/nitrato de celulosa de 0.22 μm de tamaño de poro (se recomienda el GSWP04700, Millipore®)

6. SOLUCIONES, REACTIVOS Y ELUYENTE

Deben utilizarse ingredientes de calidad uniforme y productos químicos de grado analítico para la preparación de los reactivos y soluciones.

6.1 Solución de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.14 M

6.2 **Eluyente:** 1% extracto de vaca + 0.5 mol/l NaCl + 3% Tween80; pH 9.0.

6.3 NaOH 1 M

6.4 HCl 0.1 N

Solución de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4.14 M

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	800 g
Agua destilada	400 ml

- Disolver por agitación.
- Esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a 121° C.
- Mantener en la oscuridad a temperatura ambiente (máximo 6 meses).

Eluyente (1% extracto vaca + 0.5 M NaCl + 3% T80; pH 9.0)

Tween80	3 ml
Extracto de vaca (BBL-V)	1 g
NaCl	2.92 g
Agua destilada	100 ml

- En la botella que será esterilizada, añadir el agua y el Tween80; agitar hasta disolver.
- Añadir el extracto de vaca, agitar hasta disolver.
- Añadir el NaCl, agitar hasta disolver.
- Ajustar el pH con NaOH 1M a 9.0+0.1.
- Esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a 121° C.
- Si una vez enfriado el detergente precipita, calentar suavemente (55° C) y poner en agitación.
- Comprobar que el pH es 9.0+0.1.
- Mantener a temperatura ambiente en la oscuridad, máximo 15 días.

7. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El sistema de filtración estará a punto para ser utilizado (portafiltros y embudos estériles, conexión para hacer el vacío preparada).

7.1 Selección del volumen de agua que se ha de examinar, para el caso que nos ocupa, 100 ml.

7.2 Acondicionamiento de la muestra con $MgCl_2$ para obtener una concentración final de 0.05 M. Añadir 1.5 ml de la solución de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.14 M a 100 ml de muestra. Alternativamente, puede añadirse 1g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (ó 10.2g/100 ml si deseamos una concentración 0.5 M). Homogeneizar y dejar reposar un par de minutos.

7.3 Emplazamiento de la membrana en la rejilla metálica con ayuda de unas pinzas. Colocar el embudo portafiltro asegurándose de que no hay pérdidas.

7.4 Filtración de la muestra (tasa de flujo aproximado: 100 ml/3 minutos).

7.5 Elución de los bacteriófagos retenidos en la membrana con eluyente pH 9.0.

- Dispensar 2 ml de eluyente en una placa de petri estéril de 55 mm de diámetro.
- Coger el filtro con unas pinzas, previamente esterilizadas por flameado, y emplazarlo boca abajo en la placa de petri que contiene el eluyente.
- Colocar la placa en un agitador orbital, a 60 rpm durante 6 minutos.
- Ajustar el pH a 7.0 ± 0.1 con HCl 0.1 N si no se titula de inmediato y guardar dicho concentrado a 4° C para ser analizado más tarde, dentro de la misma jornada de trabajo.

7.6 Cuantificación de los bacteriófagos en el concentrado según ISO 10705-1, ISO 10705-2 y ISO 10705-4. Expresar los resultados como pfp/100 ml de muestra inicial.

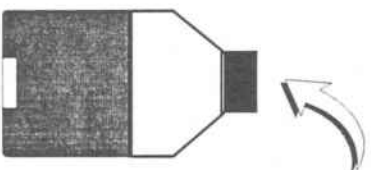
7.7 Calcular el porcentaje de recuperación del método si se dispone de los recuentos de bacteriófagos en la muestra sin concentrar y en el concentrado.

8. BIBLIOGRAFÍA

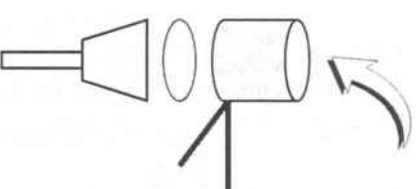
1. **ISO/WD 10705-3** (Feb. 1996). Water quality - Detection an enumeration of bacteriophages. Part 3: Validation of mehdods for concentration of bacteriophages from water.
2. **Lucena, F., Muniesa, M., Puig, A., Araujo, R., Jofre, J.** (1995). Simple concentration method for bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in drinking water. Journal of Virological Methods. 54, 121-130.
3. **Papageorgiou, G.T., Mocé-Llivina, L., Christodoulou, C.G., Lucena, F., Akkelidou, D., Ioannou, E. and Jofre, J.** (2000). A simple methodological approach for counting an identifying culturable viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. Appl. Environ. Microbiol. 66(1), 194-198.
4. **Sinton, L.W., Finlay, R.K. and Reid, A.J.** (1996). A simple filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100 ml water samples. J. Microb. Meth. 25, 257-269.

PROTOCOLO DE FILTRACIÓN-ELUCIÓN ORBITAL

Adición de 0.5 M
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$



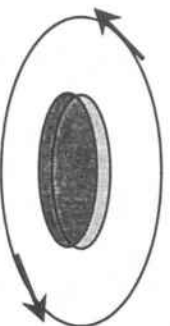
Homogeneizar,
permitir contacto
 $t \geq 1$ minuto



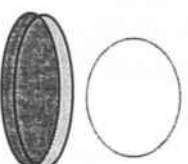
Muestra 100 ml

Filtración 100 ml / 3 min.

2 ml eluyente, pH 9.0
(1% BE + 0.5 mol/l NaCl + 3% T80)



Elución orbital
6 minutos



CONTAR
BACTERIOFAGOS
EN EL ELUIDO
(y filtro boca abajo
sobre doble capa de
agar)

ADSORCIÓN/ELUCIÓN EN POLVO DE VIDRIO

A continuación se describe el método que hemos seguido en nuestro laboratorio.

OBJETIVO

Concentración de enterovirus mediante la técnica de adsorción/elución en polvo de vidrio.

DEFINICIONES

Virus entéricos. Virus que presentan un interés directo para la salud humana, ya que son capaces de provocar infecciones en el hombre. Bajo el término de virus entéricos se agrupan cerca de 140 serotipos de virus diferentes por su estructura, composición o propiedades. Sus características comunes son su modo de transmisión por vía oral-fecal y su presencia en grandes cantidades en las heces de individuos infectados. Por medio de las heces, estos virus pasan al medio hídrico y constituyen un riesgo de contaminación para el hombre.

Enterovirus. Tienen un diámetro de 20 a 30 nm y pertenecen a la familia *Picornaviridae*. Son virus de ARN monocatenario, desnudos, con cápside icosaédrica. Son responsables de infecciones asintomáticas generalmente, sobretudo durante la infancia. La mayor parte de estos virus son cultivables.

Concentración. Debido a que la densidad viral en determinados ambientes acuáticos es muy baja, se requieren métodos que permitan analizar un gran volumen de agua y lo conviertan en un pequeño volumen que pueda ser analizado totalmente por cultivo celular u otras técnicas de detección de virus.

ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es aplicable a aguas potables, aguas procedentes de distintas etapas del proceso de potabilización, aguas subterráneas, aguas superficiales de ríos y aguas marinas.

PRINCIPIO

El polvo de vidrio pirex borosilicatado (granulometría comprendida entre 100 y 200 μm) está cargado negativamente y representa un excelente adsorbente para los enterovirus a un pH inferior a su pHi (punto isoeléctrico). La concentración se efectúa por filtración ascensional de la muestra de agua a analizar previamente acidificada, a través de una masa de polvo de vidrio en lecho fluidizado. Los enterovirus adsorbidos al polvo de vidrio son eluidos enseguida con la ayuda de un tampón alcalino.

EQUIPO Y MATERIAL

5.1. Material de filtración.

5.1.1 El aparato propuesto por Schwartzbrod y Lucena-Gutiérrez (1978), y posteriormente modificado por Ribas (1991) en su pieza inferior, esta constituido por:

- a. El elemento nº 1 (Fig.) formado por una columna de vidrio pirex (50 mm x 340 mm) prolongado en su parte superior por una cámara de expansión esférica (180 mm de diámetro) acabado en un tubo de evacuación. La parte basal comprende 2 tubos laterales y el extremo inferior está unido al elemento nº 2 por medio de un corto tubo de goma de silicona.
- b. El elemento nº 2 (Fig.) compuesto de un tubo en vidrio pirex (tesis Ferran Ribas)

DIBUJO

5.1.2 Introducir 150 g de polvo de vidrio Sovirel de 100-200 μm de diámetro por el tubo superior de la cámara de expansión con la ayuda de un embudo.

5.1.3 Esterilizar el aparato completo a 121 °C durante 20 minutos.

5.2 Trompa de vacío.

5.3 pH-metro portátil.

5.4 Cintas indicadoras de pH.

Material de laboratorio de microbiología incluyendo:

5.5 Botellas de cristal de boca ancha estériles.

5.6 Nevera a 4 °C.

5.7 Congelador a -70 °C (opcional).

DILUYENTES Y REACTIVOS

6.1 Ácido clorhídrico 0.1 N y HCl 1 N.

6.2 Hidróxido sódico 1 N, NaOH.

6.3 Tampón glicina 0.05 M-NaOH pH 11 como eluyente para muestras de agua de mar.

6.4 Tampón glicina-NaOH 0.05 M + 3 % Beef Extract, pH 10 para muestras de río.

NOTA: Los eluyentes se preparan con 0.01 mg/ml de rojo fenol como indicador de pH.

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

7.1 Preparación de la muestra. Añadir HCl 1 N a la muestra en constante agitación. Ajustar el pH a 3.5.

7.2 Preparación del aparato de filtración. Conectar el tubo superior de la cámara de expansión a una trompa de vacío que vierta al desagüe. Mantener cerrado el grifo superior de la pieza inferior. Conectar el aparato a la muestra por el tubo inferior de la columna a través de una manguera lastrada sumergida en el recipiente donde se encuentra el agua a concentrar. Esta manguera tiene una pinza de Hoffman antes de entrar en la columna que se mantiene por el momento cerrada.

7.3 Filtración. Poner en marcha la trompa de vacío (al máximo si está conectada al grifo de agua corriente). Abrir el grifo de entrada de la muestra al aparato. Observar como se forma un lecho fluidizado (filtro dinámico de polvo de vidrio) a lo largo de toda la columna. Regular el flujo de muestra de forma que este lecho no supere el tercio inferior de la cámara de expansión, 60-80 l/h. Una vez ha pasado toda la muestra a

través del aparato, cerrar la entrada de muestra y desconectar el vacío en la parte superior de la cámara de expansión. Dejar el polvo de vidrio sedimentar por gravedad y permitir el vaciado del agua contenida en la cámara de expansión y mitad de la columna a través del tubo lateral. Acabar de vaciar el resto del agua hasta llegar a un dedo por encima del nivel del filtro ahora estático y compacto de fibra de vidrio, haciendo el vacío a través del tubo lateral de la pieza inferior, abriendo el grifo superior y manteniendo cerrado el grifo inferior.

7.4 Elución. Añadir por la parte superior de la columna 150 ml de eluyente (tampón glicina 0.05 M-NaOH a pH 11 coloreado con rojo fenol 0.01 mg/ml). Observar como avanza el frente del eluyente a través del filtro y antes de que llegue al grifo superior de la pieza inferior, cerrar la válvula (tener cuidado de no perder eluido porque a veces el eluyente tiene “preferencia” por bajar por un lado más rápido que por otro). Preparar una botella de cristal estéril de boca ancha. Abrir el grifo superior, manteniendo el vacío en el tubo lateral y antes de que el líquido pueda perderse por este tubo, quitar el vacío, cerrar el grifo superior, abrir el grifo inferior y recoger los 30-40 ml primeros. Neutralización del concentrado en agitación con HCl 0.1 N. El concentrado vira del color rojo al color anaranjado. El paso de los virus teóricamente retenidos en el polvo de vidrio al eluyente se debe a que a pH alcalino (superior al pHi de los virus) existe repulsión electrostática entre los virus, cargados negativamente, y el polvo de vidrio, siempre negativo.

7.5 Análisis de enterovirus. Guardar el concentrado a 4 °C si se va a analizar para enterovirus en 24 horas. Guardar el concentrado a -70 °C si se prevé que los análisis de virus entéricos pueden posponerse más de dos días.

7.5.1 Descontaminación de los concentrados (ver material y métodos, capítulo)

7.5.2 Inoculación de las muestras en medio líquido (ver)

7.5.3 Inoculación de las muestras en medio sólido (ver)

BIBLIOGRAFÍA

1. Ribas, F. (1991). Detección de virus entéricos en aguas naturales y potabilizadas y en residuos del proceso de potabilización. Tesis doctoral. Departament de Microbiología UB-AGBAR.
2. Schwartzbrod, L. (1991). Virologie des milieux hydriques. Tec & Doc. Lavoisier. Paris.

Tampón glicina 0.05 M – NaOH pH 11, coloreado con rojo fenol

Glicina	3.75 g
Agua bidestilada	1000 ml
Solución rojo fenol (1g/100 ml)	1 ml

Disolver.

Ajustar el pH a 11 con NaOH 15 M.

Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

Anexo 7: Detección de virus entéricos

MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR BGM

OBJETIVO

Describir una metodología válida para poder mantener en condiciones la línea celular BGM a lo largo del tiempo. Se parte de la base de que las células habrán sido cultivadas previamente a partir de un estoc congelado y el protocolo que se describe a continuación sólo trata del mantenimiento de estas células.

DEFINICIONES

- Línea celular BGM. Línea celular continua, que crece a 37°C y que tiene una morfología fibroblástica. Proviene de células de riñón de mono africano (*African green monkey*). Esta línea es susceptible de ser infectada por los siguientes virus: Poliovirus 1, 2 y 3, Ecovirus tipo 3, 6, 7, 9, 11, 12 y 27; Coxsackievirus tipo A, B1, B2 y B3; Reovirus tipo 1 y Myxoma. La línea está depositada en el "Centro de Instrumentación Científica" de la Universidad de Granada. Referencia: Health Lab. Science 1974, 11:275.
- Tapiz celular. Se formará cuando las células hayan ocupado toda la superficie disponible, de manera que no quede ningún espacio vacío entre ellas; en estos momentos hablamos de un tapete celular continuo.
- Medio de crecimiento. Medio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con un 3 % de bicarbonato sódico, un 1 % de L-Glutamina, un 1 % de Penicilina/Estreptomicina 10000 IU/ml y un 5 % de Suero Fetal Bovino (FBS); se utilizará una vez se ha tripsinizado, para el crecimiento de las células.
- Medio de mantenimiento. Medio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con un 3 % de bicarbonato sódico, un 1 % de L-Glutamina, un 1 % de Penicilina/Estreptomicina 10000 IU/ml y un 1 % de Suero Fetal Bovino; se utilizará para mantener las células en buenas condiciones durante un periodo más o menos largo de tiempo.

ÁMBITO DE APLICACIÓN

INSTRUCCIONES

1. Material

Material de plástico:

Roux de 175 cm²

Placas de 90 x 20 mm

Material de vidrio:

Botellas de 500 y 1000 ml estériles

Baño de agua a 37 °C y a 45 °C

Estufa a 37 °C con 5 % de CO₂

2. Reactivos

Bicarbonato sódico 7.5 %
Glutamina 200 mM
Penicilina 10000 IU/ml, Estreptomicina 10000 mg/ml
Suero Fetal Bovino
MEM Deshidratado
Tripsina
PBS

3. Preparación de medios

3.1 Preparación del Medio de Cultivo de Crecimiento

3.1.1 Pesar la cantidad especificada por el fabricante de MEM deshidratado y disolverlo en 900 ml de agua bidestilada.

3.1.2 Autoclavar esta solución a 121 °C durante 20 minutos. Esta solución se guardará a 4 °C.

3.1.3 En la vitrina de flujo laminar, añadir:

NaHCO ₃ al 7.5 %	30 ml
L-Glutamina 200 mM	10 ml
Penicilina/Estreptomicina 10000 IU/ml y 10000 g/ml	10 ml
Suero Fetal Bovino	50 ml

Agitar.

El medio completamente preparado tiene una durada máxima de 15 días.

3.2. Preparación del Medio de Mantenimiento

3.2.1 Pesar la cantidad especificada por el fabricante de MEM deshidratado y disolverlo en 900 ml de agua bidestilada.

Autoclavar esta solución a 121 °C durante 20 minutos. Esta solución se guardará a 4 °C.

3.2.2 En la vitrina de flujo laminar, añadir:

NaHCO ₃ al 7.5 %	30 ml
L-Glutamina 200 mM	10 ml
Penicilina/Estreptomicina 10000 IU/ml y 10000 g/ml	10 ml
Suero Fetal Bovino	10 ml

Agitar.

El medio completamente preparado tiene una durada máxima de 15 días.

4.Descripción del procedimiento

4.1.Templar el PBS y la tripsina a 37 °C.

- 4.2 Observar mediante un examen al microscopio invertido que los rouxes presentan un tapete celular continuo.
- 4.3 Decantar el medio de cultivo y añadir 5 ml / 25 cm² (35 ml en un roux de 175 cm²) de PBS por el lado opuesto del roux al que hay crecimiento celular, para realizar un lavado eliminando los restos de suero fetal bovino que interferirían con la acción de la tripsina, inhibiéndola.
- 4.4 Decantar el PBS y añadir 3 ml / 25 cm² de tripsina por el lado opuesto al crecimiento.
- 4.5 Dejar el roux en posición horizontal de forma que la monocapa de células quede totalmente cubierta por la tripsina durante 15-30 segundos. Decantar asegurándose de que el tapete no ha empezado a saltar.
- 4.6 Incubar de 5 a 15 minutos en posición horizontal hasta que las células se desprendan de la superficie del roux. No provocar que las células salten antes de tiempo con el fin de evitar la formación de agregados y la no homogeneidad de la suspensión celular.
- 4.7 Añadir 0.1 – 0.2 ml/cm² de medio de crecimiento (de 18 a 35 ml en un roux de 175 cm²) y disgregar las células al máximo con la ayuda de una pipeta estéril al mismo tiempo que se hacen saltar las pocas células que quedasen todavía adheridas a la superficie del roux.
- 4.8 Contar las células con el hemocitómetro o la cámara de conteo de células.
- 4.9 Diluir la suspensión celular con medio de crecimiento hasta tener una concentración de entre 10⁴ y 5x10⁴ células/ml (concentración adecuada para el subcultivo de las líneas celulares continuas)
- 4.10 Cerrar el roux e incubar a 37 °C.
- 4.11 En caso de no querer nuevos rouxes y sólo querer tripsinizar el roux inicial, se seguirá el mismo procedimiento eliminando el volumen de suspensión celular necesario para obtener la concentración de entre 10⁴ y 5x10⁴ células/ml y se añadirá medio de crecimiento fresco (0.2 – 0.5 ml/cm²).
- 4.12 Incubar a 37 °C durante 3 ó 4 días transcurridos los cuales se realiza un examen visual de los rouxes con el microscopio invertido.
- 4.13 Si las células forman un tapete continuo y no se quieren volver a tripsinizar ni se quiere utilizar el roux para inocular una muestra, se hará un lavado con 5 ml/25 cm² de PBS y añadir un volumen de 0.2 – 0.5 ml/cm² de medio de mantenimiento.
- 4.14 Incubar a 37 °C. Si el medio vira de color quedando amarillo-naranja indica que se ha acidificado y será necesario cambiarlo o tripsinizar el roux.

Preparación de PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
H ₂ O bidestilada	1000 ml

Disolver y ajustar el pH a 7.1 – 7.2 con HCl 1 N.

Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

DETECCIÓN DE VIRUS ENTÉRICOS POR CULTIVO CELULAR. INOCULACIÓN DE MUESTRAS EN MEDIO SÓLIDO (“MONOLAYER”)

OBJETIVOS

Describir una metodología válida para la cuantificación de virus entéricos en muestras de aguas no tratadas o sucias mediante cultivo celular, utilizando la línea celular BGM

DEFINICIONES

- Línea celular BGM. Línea celular continua, que crece a 37°C y que tiene una morfología fibroblástica. Proviene de células de riñón de mono africano (*African green monkey*). Esta línea es susceptible de ser infectada por los siguientes virus: Poliovirus 1, 2 y 3, Ecovirus tipo 3, 6, 7, 9, 11, 12 y 27; Coxsackievirus tipo A, B1, B2 y B3; Reovirus tipo 1 y Myxoma. La línea está depositada en el “Centro de Instrumentación Científica” de la Universidad de Granada. Referencia: Health Lab. Science 1974, 11:275.
- Tapiz celular. Se formará cuando las células hayan ocupado toda la superficie disponible, de manera que no quede ningún espacio vacío entre ellas; en estos momentos hablamos de un tapete celular continuo.
- Medio de crecimiento. Medio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con un 3 % de bicarbonato sódico, un 1 % de L-Glutamina, un 1 % de Penicilina/Estreptomicina 10000 IU/ml y un 5 % de Suero Fetal Bovino (FBS); se utilizará una vez se ha tripsinizado, para el crecimiento de las células.
- Medio de mantenimiento. Medio MEM (*Minimal Essential Medium*) suplementado con un 3 % de bicarbonato sódico, un 1 % de L-Glutamina, un 1 % de Penicilina/Estreptomicina 10000 IU/ml y un 1 % de Suero Fetal Bovino; se utilizará para mantener las células en buenas condiciones durante un periodo más o menos largo de tiempo.
- Overlay. Medio de mantenimiento de cultivo celular sólido por la adición de 7 g/l de agar purificado, usado como medio de post-infección.

ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método está pensado para realizar una cuantificación de los virus entéricos presentes en la muestra de agua que sean viables y capaces de infectar una célula.

INSTRUCCIONES

1. Material

Material de plástico:

Roux de 175 cm²

Placas de 90 x 20 mm

Material de vidrio:

Botellas de 500 y 1000 ml estériles

Baño de agua a 37 °C y a 45 °C
 Estufa a 37 °C con 5 % de CO₂

2. Reactivos

Bicarbonato sódico 7.5 %
 Glutamina 200 mM
 Penicilina 10000 IU/ml, Estreptomicina 10000 mg/ml
 Suero Fetal Bovino
 MEM Deshidratado
 Tripsina
 PBS
 Fijador Cristal Violeta
 Agar purificado

3. Descripción del procedimiento

3.1 Preparación de las placas (se trabajará en la vitrina de flujo)

- 3.1.1 Templar el PBS y la tripsina a 37 °C.
- 3.1.2 Observar mediante un examen al microscopio invertido que los rouxes presentan un tapete celular continuo.
- 3.1.3 Decantar el medio de cultivo y añadir 5 ml / 25 cm² (35 ml en un roux de 175 cm²) de PBS por el lado opuesto del roux al que hay crecimiento celular, para realizar un lavado eliminando los restos de suero fetal bovino que interferirían con la acción de la tripsina, inhibiéndola.
- 3.1.4 Decantar el PBS y añadir 3 ml / 25 cm² de tripsina por el lado opuesto al crecimiento.
- 3.1.5 Dejar el roux en posición horizontal de forma que la monocapa de células quede totalmente cubierta por la tripsina durante 15-30 segundos. Decantar asegurándose de que el tapete no ha empezado a saltar.
- 3.1.6 Incubar de 5 a 15 minutos en posición horizontal hasta que las células se desprendan de la superficie del roux. No provocar que las células salten antes de tiempo con el fin de evitar la formación de agregados y la no homogeneidad de la suspensión celular.
- 3.1.7 Añadir 0.1 – 0.2 ml/cm² de medio de crecimiento (de 18 a 35 ml en un roux de 175 cm²) y disgregar las células al máximo con la ayuda de una pipeta estéril al mismo tiempo que se hacen saltar las pocas células que quedasen todavía adheridas a la superficie del roux.
- 3.1.8 Contar las células con el hemocitómetro o la cámara de conteo de células.
- 3.1.9 Diluir la suspensión celular con medio de crecimiento hasta tener una concentración de entre 10⁴ y 5x10⁴ células/ml y distribuir en placas con la ayuda de una botella de 500 ml estéril.
- 3.1.10 Incubar las placas en una estufa al 5 % de CO₂ a 37 °C de 2 a 3 días.
- 3.1.11 Pasados los 2 ó 3 días, comprobar que el tapete esté bien formado mediante el examen al microscopio invertido.

3.2 Inoculación de la muestra (se trabajará en la vitrina de flujo vertical).

- 3.2.1 Descongelar las muestras a temperatura ambiente y preparar el “overlay”.

- 3.2.2 Decantar el medio de las placas y añadir, como máximo, 2 ml de muestra por placa.
- 3.2.3 Incubar las placas durante 60 minutos en la estufa de CO₂ a 37 °C agitándolas cada media hora.
- 3.2.4 Pasados los 60 minutos, eliminar el inóculo de las placas y añadir el *overlay* (20 ml por placa) templado a 45 °C y esperar que solidifique.
- 3.2.5 Incubar las placas en la estufa de CO₂ a 37 °C durante 5 días.
- 3.2.6 Pasados los 5 días eliminar el *overlay* de las placas y añadir 5 ml por placa del fijador Cristal Violeta.
- 3.2.7 Pasados 5 ó 10 minutos, decantar el fijador y lavar las placas con agua corriente. En las zonas donde se haya producido lisis de las células, aparecerán calvas (zonas transparentes) y, las zonas donde no haya lisis del tapete, quedaran teñidas de color violeta.
- 3.2.8 Contar las calvas y expresar el resultado referido al volumen de agua analizado.

ANEXO

Preparación de PBS

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
H ₂ O bidestilada	1000 ml

Disolver y ajustar el pH a 7.1 – 7.2 con HCl 1 N.

Autoclavar a 121 °C durante 20 minutos.

Preparación del Medio de Cultivo de Crecimiento

1. Pesar la cantidad especificada por el fabricante de MEM deshidratado y disolverlo en 900 ml de agua bidestilada.
2. Autoclavar esta solución a 121 °C durante 20 minutos. Esta solución se guardará a 4 °C.
3. En la vitrina de flujo laminar, añadir:

NaHCO ₃ al 7.5 %	30 ml
L-Glutamina 200 mM	10 ml
Penicilina/Estreptomicina	10 ml
10000 IU/ml y 10000 g/ml	
Suero Fetal Bovino	50 ml

Agitar.

El medio completamente preparado tiene una durada máxima de 15 días.

Preparación del overlay**Agar**

Agar purificado	7 g
H ₂ O bidestilada	500 ml

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

MEM x2

MEM deshidratado	los gramos indicados por el fabricante para preparar un litro
H ₂ O bidestilada	500 ml (en botella de litro)

Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Preparar el medio líquido añadiendo a los 500 ml de MEM x2:

Bicarbonato sódico al 7.5 %	30 ml
L-Glutamina 200 mM	10 ml
Penicilina/Estreptomicina	10 ml
Suero Fetal Bovino	10 ml

Verter el agar autoclavado y templado a 45 °C en la botella de litro que contiene el medio de cultivo celular (MEM al 1 % de Suero Fetal Bovino) y agitar bien la mezcla.

Preparación del fijador Cristal Violeta

Cristal Violeta	1.3 g
Alcohol isopropílico al 95 %	50 ml

Disolver

Formolina al 37 %	300 ml
-------------------	--------

Mezclarlo todo en una botella de 1000 ml y añadir agua hasta obtener un volumen final de un litro.

Conservar a temperatura ambiente.