



Els bacteriófags com microorganismes model

JUAN JOFRE i FRANCISCO LUCENA

Departament de Microbiologia

Facultat de Biologia

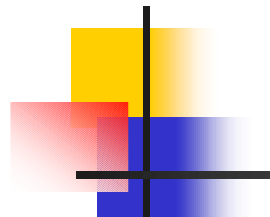
Universitat de Barcelona



Infecciones de transmisión hídrica

- a **Poca incidencia de los brotes causados por bacterias**
- a **Aumento de los brotes causados por virus y protozoos parásitos**
- a **Aparición de algunos problemas emergentes**

Virus humanos de transmisión fecal-oral



VIRUS	Transmisión probada		Detección por	
	Agua residual contaminada	Marisco contaminado	Cultivo celular	Tests de ácidos nucleicos
Enterovirus				
Polio	±	–	+	+
Coxsackie A	–	–	+	+
Coxsackie B	–	–	+	+
Echovirus	–	–	+	+
Entero 68-71	–	–	+	+
Hepatitis A	+	+	±	+
Sapovirus	+	+	–	+
Norovirus	+	+	–	+
Calicivirus (Hepatitis E)	+	+	–	+
Rotavirus	+	–	±	+
Adenovirus entéricos	–	–	+	+
Astrovirus	+	+	±	+
Coronavirus	–	–	±	+



INFECCIONES DE TRANSMISION HIDRICA

- n Porqué se producen infecciones víricas y de protozoos en aguas bacteriológicamente seguras

Persistencia en medio acuático

Resistencia a desinfección

Dosis infecciosas muy bajas



NECESIDAD DE INDICADORES

Detectar y enumerar virus en muestras de aguas y alimentos es difícil

Cultivo celular en algunos casos

Métodos moleculares (PCR)

(no diferencian infeccioso de no infeccioso)

Usualmente los números de virus son demasiado bajos para:

Seguir el desarrollo de procesos

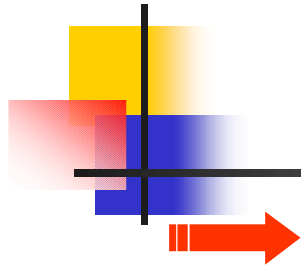
Depuración

Potabilización

Desinfección

Seguir los movimientos de agua

BACTERIÓFAGOS DE BACTERIAS ENTÉRICAS



SON VIRUS

Presumiblemente en el medio acuático se comporten como virus

- ➡ PRESUMIBLEMENTE SE ORIGINAN EN EL INTESTINO
- ➡ DETECCION RÁPIDA, FÁCIL Y BARATA
- ➡ SON MÁS ABUNDANTES EN HECES QUE LOS VIRUS (excepto en individuos infectados)
- ➡ NÚMEROS MUY CONSTANTES EN AGUAS RESIDUALES URBANAS

GRUPOS DE BACTERIÓFAGOS PROPUESTOS



Se definen en función de la bacteria huésped

➡ Colifagos somáticos

★ Infectan *E. coli* a través de la pared celular

➡ Bacteriófagos ARN F-específicos

★ Infectan *E. coli* y otras enterobacterias a través de los pelos sexuales codificados por el plásmido F

➡ Bacteriófagos de *Bacteroides*

★ Infectan *Bacteroides* a través de la pared celular



Bacteriófagos como indicadores

Métodos

- n Detección y enumeración
- n Materiales de referencia
- n Conservación en laboratorio y durante transporte
- n Concentración
- n Extracción (biosólidos, sedimentos)



Métodos estandarizados de detección y enumeración

ISO

- 4 10705-1. Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1. Enumeration of F-specific RNA bacteriophages
- 4 10705-1. Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1. Enumeration of somatic coliphages
- 4 10705-1. Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1. Enumeration of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis*

EPA

- 4 1602. Male-specific (F⁺) and Somatic Coliphages in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure
- 4 1602. Male-specific (F⁺) and Somatic Coliphages in Water by Two-step Enrichment Procedure.

“Standard methods” (colifagos somáticos)

A grayscale electron micrograph showing numerous bacteriophages. Each phage consists of a circular head, a long tail, and a tail sheath. The heads are arranged in a somewhat regular pattern, while the tails are more randomly oriented. A pink arrow on the left points towards the text.

Enumeración de bacteriófagos.

1. Método cualitativo.

En medio líquido. Determinación de la presencia-ausencia de bacteriófagos en un volumen determinado de muestra. Confirmación por el “test” de la gota.

2. Método cuantitativo.

En medio sólido. Determinación de las unidades formadoras de calvas, mediante el método de la doble capa de agar (DAL).

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

1 ml de la muestra
(o dilución o concentrado)

1 ml cultivo inóculo de
la bacteria huésped *

2.5 ml de agar
blando (45 ± 1) °C

1.- Agitar suavemente

2.- Verter sobre placa de agar, distribuir uniformemente
por toda la superficie evitando la formación de burbujas

3.- Dejar solidificar la capa superior de agar blando

4.- Incubar toda la noche, en posición invertida, (36 ± 2 °C)
(y en anaerobiosis, si se trata de *Bact. fragilis*)

5.- Contar el número de calvas (zonas de lisis) que
aparecen sobre el césped confluyente de la bacteria huésped.
Expresar los resultados como pfu / 100 ml.

Placa agar base

* Manejo de cultivos de trabajo





METODOS DE CONCENTRACION

- n Están disponibles métodos de concentración de hasta un litro con eficiencia contrastada de approx. un 50%
 - 8 Floculación (aguas turbias)
 - 8 Adsorción-elución filtros de acetato-nitrato de celulosa (aguas con poca turbidez)

- a Estándar de validación de métodos de concentración
 - 4 ISO10705-3 F. Water quality-Detection and enumeration of bacteriophages – Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water



Los bacteriófagos como microorganismos indicadores

Organismos modelo

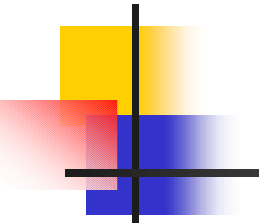
Organismos índice

Concepto ligado a presencia

Organismos indicadores

Concepto ligado a comportamiento

Bacteriófagos como índices de contaminación fecal



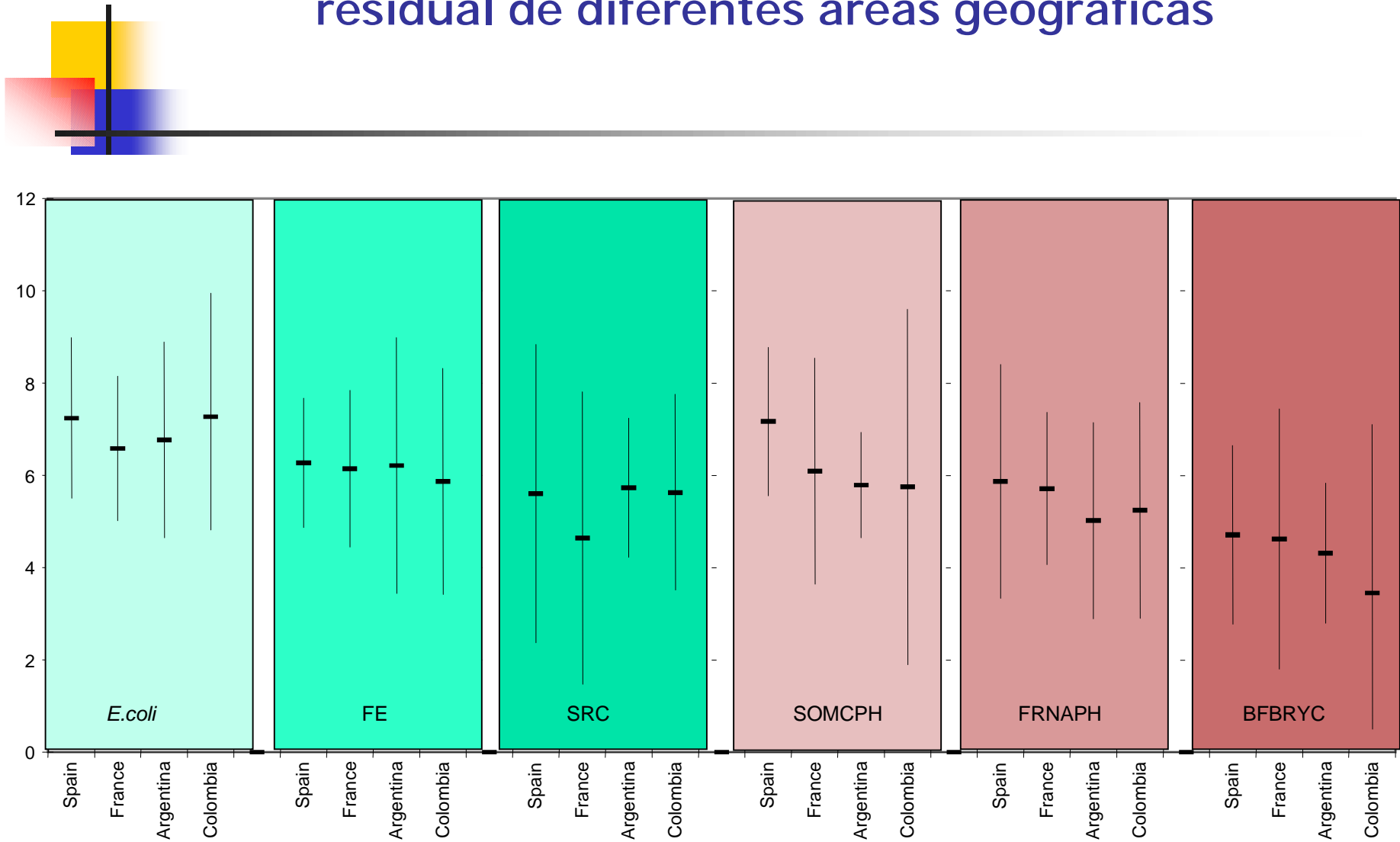
% +vos	CF	EF	Bacteriófagos		
			CS	F-RNA	BBfr
Heces humanas	100	100	>50	<20	10-30
Heces animales	100	100	>50	<30	10-30
Purines	100	100	100	100	100
Fosas sépticas	100	100	100	100	75



Bacteriófagos como índice de contaminación por agua residual

% + vos	CF	EF	Bacteriófagos		
			CS	F-RNA	BBfr
Urbana	100	100	100	100	100
De mataderos	100	100	100	100	100

« Box plots » de los valores de microorganismos en agua residual de diferentes areas geográficas





Bacteriófagos como índices de contaminación fecal humana o animal

Genotipos de bacteriófagos ARN F-específicos

II y III preferentemente humanos

I y IV preferentemente animales

Bacteriófagos de *Bacteroides*

HSP40 y GA17 distinguen bien (restricción geográfica)

RYC2056 distingue peor



Bacteriófagos como índices de virus humanos

	Periodos normales	Período brote
Diluciones máximas positivo PCR (% +vos)		
NLV	10^{-4} (67)	10^{-7} (45)
Rotavirus	10^{-4} (-)	-
Indicadores	Valores similares	

Loder et a. 1999. AEM 65:5624-5627



Bacteriófagos como indicadores

- n **Bacteriófagos como
microorganismos indicadores**



BARRERAS DESDE HECES HASTA POTENCIAL INGESTIÓN



Remoción (separación)

- Sedimentación
- Adsorción en suelo o en filtros
- Retención por filtración

Cambio de compartimento



Inactivación

- Factores físicos :temperatura, radiaciones
- Factores químicos: pH, amoniaco, concentración de sal, desinfectantes.
- Factores biológicos: "grazing", agentes virucidas, etc.

Eliminación



Barreras microbianas: Coliformes fecales en le control de la contaminación del agua

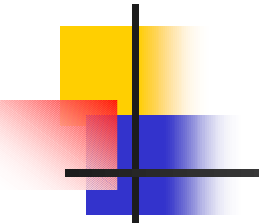
	Reducción acumulativa (%)	Coliformes fecales (CFU/100ml)
Agua residual municipal	-	12.000.000
Tratamientos de agua residual		
Primario + secundario	90-95	1.500.000
Terciaria	98	150.000
Desinfección	99.99	800
Dilución y autopurificación	10-50	400-700
Almacenamiento	50	200-350
Tratamientos de potabilización		
Coagulación/sedimentación	60	80-140
Filtración	99.9	0.8-1.4
Desinfección	99.999	0.00008-0.000014

Inactivación de bacteriófagos en agua de río

T90 (en horas) de bacteriófagos e indicadores bacterianos
en agua de río

	Verano	Invierno
Coliformes fecales	64	233
Streptococos fecales	88	303
Clostridios sulfito reductores	270	667
Colifagos somáticos	118	385
Fagos F-RNA	62	323
Fagos <i>B. fragilis</i>	141	417

REDUCCION (en logaritmos decimales) DE MICROORGANISMOS EN PLANTAS CONVENCIONALES



	Floculación	Flocul. + cal.	Fangos activados	Fangos activ. + floculación.
CF	0.5-1.0	2-3	1-2	2-3
EF	0.5-1.0	1-2	1-2	2-3
CS	0.5-1.0	1-1.5	1-2	2-3
F-ARN	0.5-1.0	2-3	1-2	2-3
<i>B. B frag.</i>	0.5-1.0	1-2	1-2	2-3
Enterov.	0.5-1.0	2-3	1-2	2-3
Rotav.	0.5-1.0	1-2	-	-

ELIMINACIÓN DE DIFERENTES MICROORGANISMOS POR CLORACIÓN DE UN EFLUENTE SECUNDARIO

	Efluente secundario	Efluente terciario	Reducción en log.decimales
	Ufc o ufp por 100 ml		
CF	1.6×10^5	251	3.8
EF	5.0×10^4	70	2.8
Clostridios	5.6×10^3	109	1.7
Colifagos somáticos	5.6×10^4	320	2.2
Bacteriófagos F-específicos	6.3×10^3	142	1.7
Bacteriófagos de <i>Bacteroides</i>	1.7×10^2	42	0.6
Enterovirus(por I)	3.5	0.2	1.2



REDUCCIÓN (en logaritmos decimales) DE MICROORGANISMOS POR OZONIZACIÓN

	CF	EF	SRC	SOMCPH	FRNAPH	BFRPH
Dosis baja	1.4	0.4	0.2	0.5	0.1	0.8
Dosis alta	2.0	-	0.3	1.1	0.2	1.4

Pruebas realizadas con un ozonizador doméstico



REDUCCIÓN (en logaritmos decimales) DE MICROORGANISMOS POR CLORACIÓN DE AGUAS DE CONSUMO

	<i>E.coli</i>	SOMCPH	FRNAPH	BFRPHRYC	Polio1-v	Enterovirus
Naturales	< 1.4	1.4	0.5	0.3	-	-
Inoculados	5.6	3.2 - 1.5	3.0	1.6	5.3	3.2



REDUCCIÓN (en logaritmos decimales) DE MICROORGANISMOS EN LAGUNAJE

	INVIERNO	VERANO
Coliformes fecales	2.5 – 3.0	4.5 - 5.0
Estreptococos fecales	2.5 – 3.0	2.5 –3.0
Clostridios reductores sulfito	1.0 - 1.5	1.0 -1.5
Colifagos somáticos	2.5 – 3.0	3.5 - 4.0
Fagos ARN F-específicos	1.5 – 2.0	3.0 - 3.5
Fagos de <i>B. fragilis</i>	1.0 – 1.5	1.0 - 1.5

Para enterovirus se han descrito valores desde 1 hasta 4 logaritmos.



Sensibilidad a la radiación ultravioleta

	Experimentación laboratorio	Planta tratamiento (Reducción log ₁₀)
Coliformes fecales	++++	2-3
Estreptococos fecales	+++	2-3
Colifagos somáticos	+++	2-3
Fagos F-RNA	+	1.0-1.5
Fagos <i>B fragilis</i>	++	1.5-2.0
Poliovirus	++	1.5-2.0



Reduccions logaritmiques d'indicadors bacterians i bacteriòfags a Tossa (datos preliminares)

n	CF	EF	SCR	SOMCPH	FRNAPH	BactPH	Ent
Efluent terciari	> 4.7	> 3.5	>3.5	3.3	3.1	> 2.3	> 2.4
Pou	4.0	>3.9	2.6	3.9	3.2	>2.3	> 2.4



Los bacteriófagos como microorganismos modelo

Aunque no son perfectos, los bacteriófagos pueden dar información adicional significativa a la proporcionada por los indicadores bacterianos

Además tienen algunas ventajas adicionales:

- No estados como “estresados”, “viables-no cultivables”, etc.
- El análisis retardado es posible
- Algunos posibilitan medidas a tiempo real (4 horas)