

Colifagos, el nuevo indicador vírico en las regulaciones y normativas del agua potable

Julia Martín Díaz, directora de desarrollo de Bluephage; Miriam Pascual Benito, directora de calidad de Bluephage



1. INTRODUCCIÓN

Como es sobradamente conocido el agua es fundamental para la viabilidad de todas las formas de vida en nuestro planeta, pero a la vez es también un soporte que permite la transmisión de agentes patógenos perjudiciales para nuestra salud, al ser causantes de enfermedades como la diarrea, que, cada año, origina unas 500.000 muertes de niños menores de 5 años.

El indicador de la población potencialmente en riesgo para su salud (PPHR, de *Population Potentially at Health Risk*), tomando como referencia el año 2050, estima

que 20 millones de personas pueden encontrarse en riesgo de su salud debido a problemas de calidad del agua potable, lo que equivale al 3,8% de la población de la Unión Europea (UE28) en ese año.

Así, muchas instituciones como la Organización Mundial de la Salud -OMS- (WHO, 2017a) y normativas relacionadas con la salud en los estados, como la reciente directiva de la UE sobre agua potable (Directiva UE 2020/2184), han establecido normas de calidad de las aguas, tanto desde una perspectiva fisicoquímica como microbiológica, que incorporan nuevos parámetros



para mejorar la seguridad sanitaria del agua. Este artículo de Bluephage (www.bluephage.com) se centra en el uso de colifagos como indicador vírico de la calidad del agua.

2. LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Para afrontar esta problemática se han realizado históricamente múltiples estudios de los que se ha deducido, claramente, que el principal foco de transmisión de patógenos es la contaminación fecal, la cual no solo la producen los seres humanos, sino también un gran número de animales, bien sean vinculados a la actividad humana, como también los que están en forma salvaje. Por lo tanto, la contaminación fecal puede encontrarse en fuentes de agua completamente naturales y será crucial conocer las cargas de patógenos (parásitos, bacterias y virus) para ver si superan los límites considerados tolerables para el uso del agua.

En el último siglo se ha identificado un número importante de patógenos transmitidos por el agua. El análisis exhaustivo y rutinario de todos ellos es insostenible en términos de coste e implementación tecnológica práctica y rutinaria en la gestión del agua. Para hacer frente a estas limitaciones, se definieron los indicadores microbianos como aquellos microorganismos que permiten evaluar la contaminación fecal y la posible presencia de patógenos en el agua.

Los indicadores bacterianos se han utilizado y aplicado con éxito para la vigilancia y el control de la calidad del agua desde finales del siglo XIX. Su análisis rutinario aplicado a los recursos hídricos y en los diferentes usos del agua ha disminuido significativamente las infecciones transmitidas por el agua en todo el mundo. Sin embargo, todavía se producen brotes infecciosos causados por virus (de características biológicas diferentes a las bacterias: 50 veces más pequeños, multiplican más rápidamente) debido a su mayor resistencia a los tratamientos y a su persistencia en el medio ambiente respecto a los indicadores y patógenos bacterianos.

Las bacterias indicadoras fecales (BIF) constituyen un grupo que reúne los principales indicadores bacterianos que se están utilizando habitualmente en el control microbiológico del agua. No obstante, este grupo de bacterias indicadoras presentan limitaciones para el control virológico de la calidad del agua. Las BIF tienen un destino y unas características de transporte diferentes dentro de las plantas de tratamiento de aguas y de los medios acuáticos en comparación con los patógenos víricos y protozoarios. Las mejoras tecnológicas realizadas en las

últimas décadas basadas en técnicas moleculares como nuevos sistemas analíticos para la detección rápida de patógenos han contribuido solo en parte a facilitar el seguimiento de estos microorganismos. Estas técnicas presentan una importante limitación, ya que no proporcionan información sobre la infectividad del patógeno que se pretende detectar, siendo este un aspecto esencial para la evaluación de riesgos en la gestión del agua, el saneamiento y la seguridad.

En el caso de los virus humanos de interés para la industria del agua, todavía hay algunos ejemplos, como los norovirus, los virus de la hepatitis A y los rotavirus, para los que no existen métodos rutinarios de análisis de su viabilidad y consecuentemente de su infectividad. Existen algunas excepciones, como son los enterovirus, que sí pueden ser detectados mediante métodos de cultivo utilizando líneas celulares como las BGM (*Buffalo Green Monkey*). No obstante, su aplicación en análisis rutinarios es claramente prohibitiva por los costes analíticos, los requisitos logísticos en el laboratorio y la cualificación requerida a los analistas.

3. LOS COLIFAGOS: NUEVO PARÁMETRO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Desde hace más de 40 años se han propuesto los bacteriófagos de bacterias entéricas (origen intestinal) como indicadores víricos y de contaminación fecal de la calidad microbiológica de las aguas. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y, por lo tanto, son inocuos (no virulentos) para la especie humana. Así, se le confiere un interés adicional a su uso como indicadores microbianos por su seguridad para los analistas. Los colifagos (bacteriófagos que infectan enterobacterias, principalmente *Escherichia coli* pero no exclusivamente) se han confirmado y consolidado por las agencias nacionales e internacionales de salud como los indicadores víricos más adecuados para el control microbiológico de las aguas y de los procesos de potabilización, tratamiento y reutilización de aguas, lodos y biosólidos (Jofre *et al.*, 2016; Martín-Díaz *et al.*, 2016; Martín-Díaz *et al.*, 2020; Jofre *et al.*, 2021). Además, existe un consenso científico de que los indicadores bacterianos como las bacterias coliformes y *Escherichia coli* no son parámetros adecuados para evaluar la calidad virológica del agua potable. En su lugar, es más apropiado utilizar colifagos (US-EPA, 2015; WHO, 2017a).

El posible uso de bacteriófagos como mejores indicadores de la calidad virológica del agua ha recibido progresivamente más interés, y ya se consideran como

parámetros necesarios en la gestión de las aguas. Se han desarrollado métodos estandarizados para su detección y enumeración (ISO y US-EPA) de manera que se disponen de estos procedimientos operativos indispensables para poder ser incorporados como nuevos parámetros en la revisión o creación de normativas y directivas de calidad de las aguas. Dichos métodos permiten la detección y el recuento de tres grupos diferentes de bacteriófagos entéricos: colifagos somáticos, colifagos F-específicos y fagos de bacteroides. Actualmente, se ha establecido la aplicación de los dos primeros grupos para su uso rutinario como indicadores víricos de calidad del agua. No obstante, son los colifagos somáticos los que principalmente se consideran en las regulaciones, aunque en algunas circunstancias pueden considerarse también los colifagos F-específicos o incluso el contaje conjunto de ambos tipos refiriéndonos entonces a los colifagos totales (Jebri *et al.*, 2017).

La capacidad de los colifagos para infectar y crecer en una cepa huésped concreta es lo que define a cada uno de estos grupos de bacteriófagos. Así pues, los colifagos somáticos utilizan como células huésped aquellas procedentes de las cepas C de *E. coli* y los mutantes espontáneos resistentes al ácido nalidíxico WG5 y CN13, tal y como se establece en los correspondiente métodos ISO y US-EPA respectivamente (ISO 10705-2, US-EPA 1602, 1642 y 1643). Por su parte, los colifagos F-específicos utilizan como células huésped aquellas células procedentes de las cepas de *E. coli* HS (Famp) y *Salmonella typhimurium* WG49, de acuerdo con los métodos ISO y US-EPA respectivamente (ISO 10705-1 y US-EPA 1602, 1642 y 1643).

En consecuencia, los colifagos como indicadores víricos se han incluido progresivamente en guías de la OMS (WHO, 2017a y 2017b), en normativas como la nueva directiva de la UE sobre agua potable, el reglamento de la UE sobre requisitos mínimos para la reutilización del agua y el agua regenerada para el riego agrícola (Reglamento UE 2020/741) o también en la valoración de procesos de higienización de lodos de depuradora de aguas en las normativas nacionales francesas (Arrêté 20/04/2021 TREL2111671A). También hay normativas relacionada con la industria alimentaria y más en concreto el marisco.

No obstante, aunque los protocolos estandarizados disponibles para la detección y enumeración de los colifagos resultan más rápidos que los de detección de virus patógenos entéricos, siguen siendo lentos y laboriosos. Tal y como ha indicado la OMS, la disponibilidad de kits

comerciales fáciles, simples y económicos facilitarían su aplicación rutinaria en los laboratorios de control de las aguas, tanto en países desarrollados como en aquellos de economías en desarrollo (WHO 2017b). En los últimos años se han realizado diferentes desarrollos tecnológicos con este objetivo (Blanch *et al.*, 2020).

Tal y como se ha indicado anteriormente, los bacteriófagos de origen entérico (colifagos) son indicadores virales adecuados y proporcionan una solución eficaz a la limitación de los BIF como indicadores de los virus transmitidos por el agua. Evidentemente, los colifagos, como virus que son, dependen de un soporte celular, en este caso una cepa huésped bacteriana, para poderse replicar. Por lo tanto, los que infectan a las BIF o a otras especies intestinales comensales (en el caso que nos concierne, los colifagos) son liberados posteriormente al lisis de las células bacterianas huéspedes donde se han multiplicado y, después, siguen rutas de difusión en el medio ambiente similares a las de los patógenos víricos de origen entérico. Además, los bacteriófagos tienen características morfológicas similares a las de muchos virus patógenos entéricos, lo que sugiere que pueden imitar mejor su comportamiento en el medio ambiente y frente a los diferentes tratamientos del agua. En consecuencia, los análisis de los colifagos se han considerado sustitutos adecuados de la monitorización rutinaria y de control de los patógenos víricos, siendo además unos excelentes indicadores de contaminación fecal en muchos tipos diferentes de agua: agua potable, aguas residuales, agua regenerada y agua recreativa, entre otras.

3.1. MÉTODOS ESTÁNDARES DE ANÁLISIS DE COLIFAGOS

Los métodos estandarizados para el análisis de colifagos (ISO 10705-1, ISO 10705-2 y US-EPA 1602, 1642 y 1643) son procedimientos de varios pasos que requieren de 18 a 24 horas para obtener un resultado y que, además, implican una cantidad importante de tiempo y recursos para preparar los materiales biológicos calibrados necesarios. Estos métodos tradicionales de recuento

FIGURA 1. Método estándar para la enumeración de colifagos.

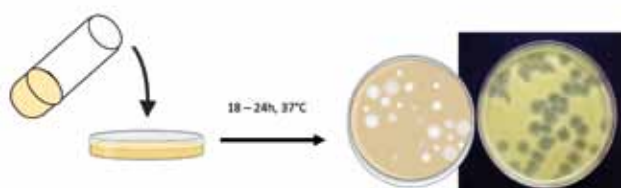




TABLA 1

COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO ESTÁNDAR ISO Y EL MÉTODO BLUEPHAGE.

Parámetro	Método ISO	Bluephage Easy Kit
Sensibilidad	1 PFU/1 mL	1 PFU/1 mL 1 PFU/100 mL
Facilidad de uso	*	**
Aplicabilidad	Agua, alimentación, biosólidos	Agua, alimentación, biosólidos
Disponibilidad cepas	No incluido	Incluido
Preparación del material (h) (pasos iniciales)	40-60	0
Preparación del cultivo inoculado (h)	3-4	2
Tiempo para los resultados (h)	18-24 h	18-24 h
Horas técnico	4-5	1

de los colifagos se basan principalmente en la visualización de la lisis de las células huésped bacterianas a las que infectan. Cuando esto ocurre, las células lisadas forman unos halos transparentes denominados calvas de lisis, que se pueden observar a simple vista (**Figura 1**). Los resultados se expresan en unidades formadoras de calvas (en inglés PFU, de *Plaque Forming Units*) por volumen de muestra analizado.

Bluephage, empresa de biotecnología nacida en la Universidad de Barcelona, está especializada en productos para el análisis de colifagos como indicadores

virales en agua, alimentos y biosólidos. Su primera línea de productos (Easy Kits) facilitan la realización de estos métodos estándar ISO o US-EPA. Estos kits proporcionan todos los componentes, reactivos y materiales biológicos calibrados de forma que se simplifica la fase de preparación requerida para los métodos ISO o US-EPA, pero se necesitan 12 pasos y un mínimo de 18 horas para obtener los resultados (**Tabla 1**). Los Easy Kits de Bluephage están disponibles para enumerar tanto los colifagos somáticos como los F-específicos (**Figura 2**).

FIGURA 2. Componentes de los Easy Kits.



3.2. EL MÉTODO BLUEPHAGE

La tecnología Bluephage se basa en la detección de los virus que infectan a las bacterias intestinales (colifagos) mediante una cepa bacteriana propia que convierte el color del medio de cultivo de amarillo a azul-verde en presencia de 1 o más virus en 100 mL, en un tiempo total máximo de 6 h, frente a la incubación de 18-24 h que requieren los métodos estandarizados. Esta tecnología permite una sensibilidad de detección de 1 colifago (PFU) en 100 mL (presencia/ausencia según la normativa de aguas), y una preparación sencilla que reduce los engorrosos protocolos de los métodos estandarizados a tan solo algunos pasos (Muniesa *et al.*, 2018; Toribio-Avedillo *et al.*, 2019; Toribio-Avedillo *et al.*, 2020).

Esta nueva metodología Bluephage se basa en la modificación de una cepa bacteriana huésped (*E. coli*) utilizada para enumerar los colifagos. Esta modificación se localiza en un operón específico de *E. coli*, el sistema β -glucuronidasa. Sobre la base de esta modificación, se han desarrollado tres cepas adaptadas de *E. coli*: CB10 para la detección de colifagos somáticos; CB12 para la detección de colifagos totales; y CB14 para la detección de colifagos F-específicos. Estas cepas modificadas no tienen los genes implicados en la introducción de un sustrato en la célula y sobreexpresan la enzima β -glucuronidasa que hidroliza este sustrato. En el mé-

todo Bluephage, el sustrato utilizado por estas especies incorpora una molécula cromogénica (X-gluc) que da un color azul tras la degradación cuando la enzima está presente (**Figura 3**).

A la hora de plantear un análisis de agua, la primera pregunta que hay que hacerse es el grado de contaminación que se espera en la muestra. Normalmente, si se trata de aguas residuales, muestras de ríos con alta presión antrópica o lodos de depuradora, los niveles de colifagos serán lo suficientemente altos como para diluir la muestra y analizar 1 mL de las diluciones más adecuadas. En cambio, cuando se trata de aguas potables, recreativas o regeneradas, será necesario el análisis directo de una alícuota de 100 mL, ya que las concentraciones esperadas son bajas. Una buena solución es el análisis previo de algunos indicadores bacterianos, como coliformes o *E. coli*, para conocer el grado de contaminación fecal de cada nuevo tipo de muestra que llega al laboratorio. Además, las muestras sólidas, como los sedimentos, los biosólidos y los mariscos, requieren una extracción previa mediante soluciones tamponadas y medios mecánicos como la agitación para 'desprender' los colifagos de las partículas sólidas y transferirlos a una matriz líquida para su análisis. Por último, las muestras con una alta carga bacteriana deben ser descontaminadas previamente mediante una

FIGURA 3. Muestras de agua analizadas con el método Bluephage. Izquierda, control negativo (ausencia de colifagos); y derecha, muestra de agua positiva (presencia de colifagos).





filtración de baja adsorción de proteínas para evitar la interferencia con las cepas del huésped utilizadas para detectar los colifagos. Todas estas necesidades quedan facilitadas mediante los diferentes productos disponibles en el portafolio de Bluephage.

4. CONCLUSIONES

La crisis climática está acelerando la urgencia de mejorar la calidad del agua en todo el mundo, un problema que se ve agravado por la falta de acceso al agua potable para muchas personas. En este sentido las administraciones como la OMS y la UE están promoviendo el uso de colifagos como indicador viral de la calidad del agua. En consecuencia, la mejora de la evaluación de la calidad microbiológica del agua incorporando los indicadores víricos es un reto empresarial, tecnológico y social para abordar la seguridad del agua y una oportunidad de mercado que hay que aprovechar.

Este nuevo parámetro aplicado en el control microbiológico rutinario del agua contribuye a reducir las enfermedades víricas transmitidas a través de la misma. Por ello, su incorporación en normativas nacionales e internacionales no tan solo va a contribuir a mejorar la seguridad y la calidad microbiológica del agua en los próximos tiempos, si no que resulta uno de los elementos determinantes del incremento esperado en la activación del mercado del análisis de las aguas.

La pandemia de covid-19 ha generado una mayor sensibilización social en relación a los virus y su presencia en nuestro entorno. El virus causante de la covid-19 (SARS-CoV-2) no es un virus de transmisión hídrica y, por lo tanto, no comporta un riesgo relacionado con los usos del agua. Además, los procedimientos habituales de potabilización y depuración eliminan perfectamente también cualquier partícula vírica infecciosa, si la hubiere, del SARS-CoV-2. Además, se ha establecido recientemente (Varbanova *et al.*, 2021) que los colifagos somáticos de nuevo constituyen un sustituto simple, fácil de implementar y rentable para comprobar que los tratamientos rutinarios son efectivos contra el SARS-CoV-2. Se debe ser especialmente estrictos en el control de los virus en las aguas potables, ya que cualquier error o negligencia en este ámbito sería valorado socialmente de forma extremadamente desfavorable.

Bluephage es una empresa especializada en el análisis de colifagos que provee de productos y servicios de formación profesional vinculados a este indicador aparecido dentro de la nueva Directiva Europea de aguas de consumo humano.

Bibliografía

- [1] Arrêté 20/04/2021 (2021). TREL2111671A. modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la période de covid-19. Journal Officiel de la République Française, texte 4 sur 188, 27 mai 2021. <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043534752>.
- [2] Blanch, A.R.; Lucena, F.; Muniesa, M.; Jofre, J. (2020). Fast and easy methods for the detection of coliphages. *J. Microbiol. Methods*, núm. 173, pág. 105.940.
- [3] Directiva UE 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2020. DOUE 22.12.2020 L 435/1. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184&from=EN>.
- [4] ISO 10705-1:2002. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 1: Recuento de bacteriófagos ARN F específicos. International Organisation for Standardisation, Ginebra, Suiza.
- [5] ISO 10705-2: 2000. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 2: Recuento de colifagos somáticos. International Organisation for Standardisation, Ginebra, Suiza.
- [6] Jofre, S.; Muniesa, M.; Jofre, J. (2017). General and host-associated bacteriophage indicators of fecal pollution. In: J. B. Rose and B. Jiménez-Cisneros (eds.). *Global Water Pathogens Project. Part 2: Indicators and Microbial Source Tracking Markers*. A. Farnleitner and A.R. Blanch (eds.). UNESCO Global Water Pathogen Project. <http://www.waterpathogens.org/book/coliphage>.
- [7] Jofre, J.; Lucena, F.; Blanch, A.R. (2021). Coliphages as a complementary tool to improve the management of urban wastewater treatments and minimize health risks in receiving waters. *Water*, núm. 13(8), pág. 1.110.
- [8] Jofre, J.; Lucena, F.; Blanch, A.R.; Muniesa, M. (2016). Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water*, núm. 8, pág. 199.
- [9] Martín-Díaz, J.; Casas-Mangas, R.; García-Aljaro, C.; Blanch, A.R.; Lucena, F. (2016). Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. *Water Sci. Technol.*, núm. 73, págs. 2.182-2.188.
- [10] Martín-Díaz, J.; Lucena, F.; Blanch, A.R.; Jofre, J. (2020). Review: Indicator bacteriophages in sludge, biosolids, sediments and soils. *Environ. Res.*, núm. 182, pág. 109.133.
- [11] Muniesa, M.; Balleste, E.; Imamovic, L.; Pascual-Benito, M.; Toribio-Avedillo, D.; Lucena, F.; *et al.* (2018). Bluephage: A rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water. *Water Res.*, núm. 128, págs. 10-19.
- [12] Reglamento UE 2020/741 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de mayo de 2020 relativo a los requisitos mínimos para la reutilización del agua. D.O. UE 5.6.2020 L 177/32 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R0741&from=EN>.
- [13] Toribio-Avedillo, D.; Díaz, J.M.; Jofre, J.; Blanch, A.R.; Muniesa, M. (2019). New approach for the simultaneous detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages as indicators of fecal pollution. *Sci. Total Environ.*, núm. 655, págs. 263-272.
- [14] Toribio-Avedillo, D.; Martín-Díaz, J.; Blanco-Picazo, P.; Blanch, A.R.; Muniesa, M. (2020). F-specific coliphage detection by the Bluephage method. *Water Res.*, núm. 184, pág. 116.215.
- [15] US-EPA 2015. Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality. 820-R-15-098. EPA Office of Water, Office of Science and Technology, Health and Ecological Criteria Division. Washington D.C.
- [16] US-EPA Office of Water. 2001. Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure; EPA 821-R-01-029; US-EPA Office of Water: Washington, DC, USA.
- [17] US-EPA Office of Water. 2018a. Method 1642: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Recreational Waters and Wastewater by Ultrafiltration (UF) and Single Agar Layer (SAL) Procedure; EPA 820-R-18-001; US-EPA Office of Water: Washington, DC, USA.
- [18] US-EPA Office of Water. 2018b. Method 1643: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Secondary (No Disinfection) Wastewater by the Single Agar Layer (SAL) Procedure; EPA 820-R-18-003; US-EPA Office of Water: Washington, DC, USA.
- [19] Varbanova, M.; Bertrand, I.; Philippot, S.; Retourney, C.; Gardette, M.; Hartard, C.; Jeulin, H.; Duval, R.E.; Lore, J.F.; Schvoerer, E.; Gantzer, C. (2021). Somatic coliphages are conservative indicators of SARS-CoV-2 inactivation during heat and alkaline pH treatments. *Sci. Tot. Environ.* núm. 797, pág. 149.112.
- [20] World Health Organization (2017a). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first. Ginebra, Suiza, 631 pp. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>.
- [21] World Health Organization (2017b). Potable reuse. Guidance for producing safe drinking water. Ginebra, Suiza, 152 pp. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258715/9789241512770-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.