



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Desarrollo de métodos rápidos para la detección de bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal

Daniel Toribio Avedillo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

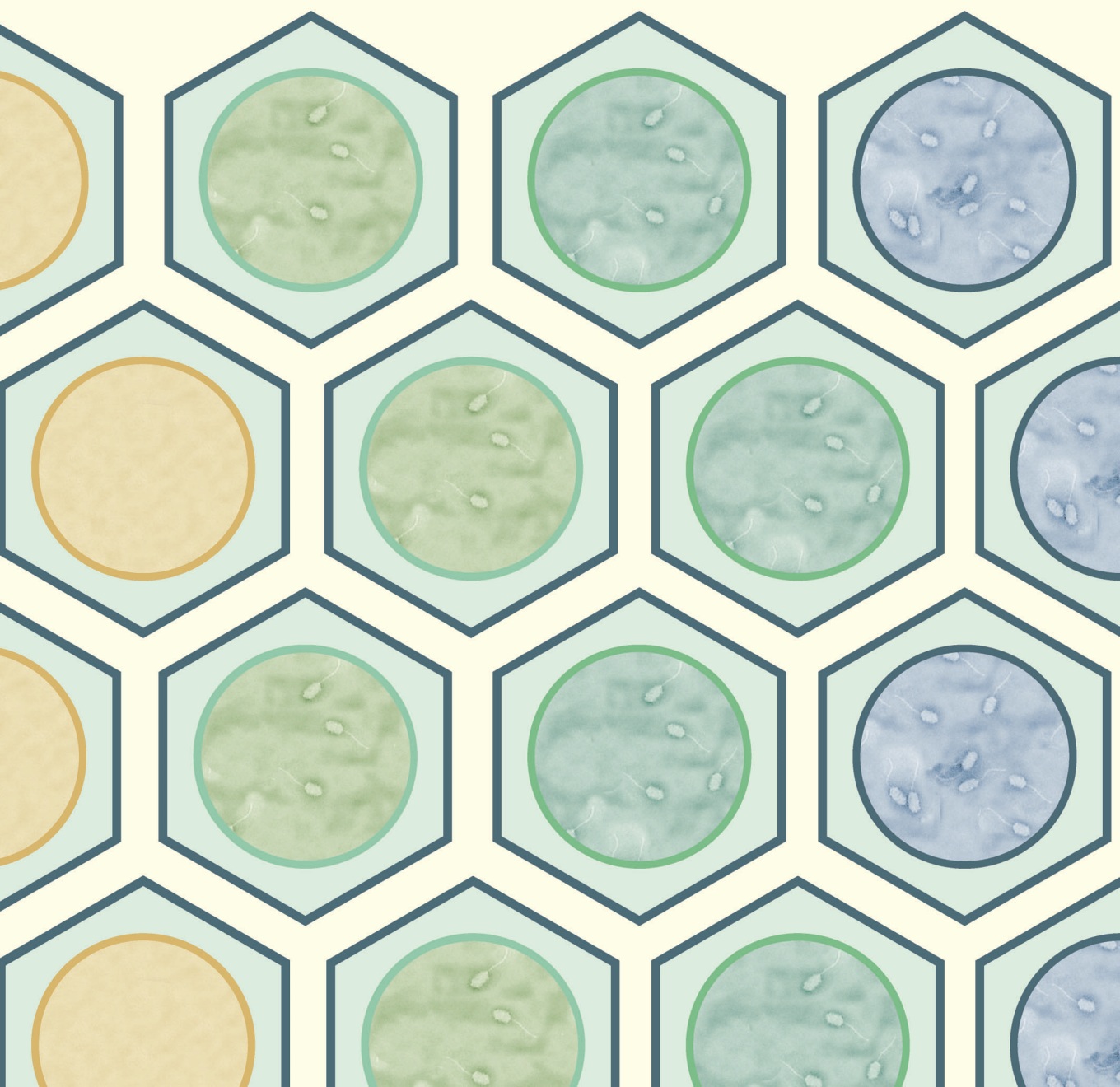
Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

Desarrollo de métodos rápidos para la detección de bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal

DANIEL TORIBIO AVEDILLO

Abril 2021





UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departamento de Genética, Microbiología y Estadística

Facultad de Biología

Desarrollo de métodos rápidos para la detección de bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal

Memoria presentada por DANIEL TORIBIO AVEDILLO para optar por el
título de

Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa de doctorado EEES: Biotecnología

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Anicet Blanch Gisbert y la Dra. Maite Muniesa Pérez en el Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

El director,

Anicet Blanch Gisbert

La directora,

Mª Teresa Muniesa Pérez

El tutor,

Francisco Lucena Gutiérrez

El doctorando,

Daniel Toribio Avedillo
Barcelona, abril de 2021

A mi familia, mi constante

AGRADECIMIENTOS

Empezar a escribir esta sección es posiblemente la parte que más tiempo me está llevando. Tal vez sea la presión de que será la que más gente leerá, tal vez sea que significa un cierre de etapa que cuesta aceptar o tal vez simplemente sea la pereza de empezar una nueva sección tras haber terminado el resto. Parece que ha pasado poco tiempo, y más tras 2020, pero en realidad ya han pasado 6 años desde que entré aquí por casualidad a hacer un TFM que ni siquiera era el que esperaba hacer. Y desde entonces mi vida ha sido diferente. No esperaba encontrar un sitio de trabajo donde no me importaría pasar tiempo, y sin embargo aquí estoy, viniendo al laboratorio a escribir, aunque no lo necesito porque me gusta compartir parte de mi día con todos vosotros. De todos modos, ¡Menos divagaciones y más escribir! ¡Que hay mucho por delante y mucha gente a la que quiero agradecer!

Empezaré por las personas responsables de que esté hoy aquí escribiendo estos párrafos con tranquilidad en el laboratorio y no en otro lugar, mis dos directores de tesis.

Primero a mi primer jefe, desde el momento en el que entré en el grupo MARS hasta hoy. La pasión y emoción que demuestras por tu trabajo es algo que considero admirable, que no todo el mundo posee y espero llegar a tener una capacidad de dedicación similar en algún momento de mi vida. Siempre has estado dispuesto a ayudarme cuando lo necesitaba aun cuando estabas muy ocupado y se agradece esa clase de preocupación que no siempre es fácil de conseguir. Muchas gracias **Anicet** por todo el apoyo y la confianza que me has dado durante todos estos años.

Segundo a mi jefa en primera línea durante toda la tesis, que inicialmente no esperaba, pero he agradecido mucho esta coincidencia a lo largo de los años. Tu estilo de trabajo y tu dedicación por tu gente es algo que no pensaba encontrar en una universidad después de previas experiencias. El nivel de eficiencia en tu trabajo y la preocupación que tienes por todos los que trabajamos contigo son cualidades de una gran jefa, que no son fáciles de encontrar. Aun desde los despachos no te has olvidado de lo que era trabajar en un laboratorio y recuerdas, aceptas e intentas ayudarnos en todos los problemas que nos surgen en esta etapa que no estamos aún seguros de cómo solucionar. Espero que, si algún día llego a ser jefe en algo, sea capaz de seguir tu ejemplo en tantísimas cosas que me has demostrado en estos años. Muchas gracias, **Maite** por todo tu apoyo, resolución y liderazgo durante todo este viaje que es elaborar una tesis.

Muchas gracias también al resto de jefes del grupo, a **Francisco** por los buenos momentos en las numerosas horas de charlas sobre temas, tanto importantes como no, en los laboratorios y los múltiples consejos de vida que nos has dado a lo largo de estos años. A **Joan**, por tu cercanía y toda la ayuda que me has dado en estos años de tesis desde tu gran experiencia en el ámbito. A **Cristina**, mi primera jefa en el grupo MARS, por toda la ayuda y el apoyo que me has dado en estos años, tanto como jefa directa, como de manera más indirecta. Me alegro de haber visto a lo largo de estos años tu crecimiento como jefa y en la capacidad de liderazgo de un equipo. Me alegra poder tenerte formando parte mi tribunal de tesis cerrando esta etapa.

Muchas gracias también a las jefas más recientes del grupo por toda la ayuda que me habéis proporcionado. Gracias **Eli** por tu cercanía, tu lucha por lo correcto, buen humor y disposición. También por todas las numerosas charlas en las múltiples tardes de filtrar en el 10. La pasión que tienes por la ciencia es algo maravilloso que espero que nunca pierdas de vista. Gracias **Lorena** por todos los buenos momentos de grupo que hemos pasado en múltiples cafés, escape rooms, comidas, cenas, carnavales etc. Muchas gracias también por todos los buenos consejos y la orientación que me has dado de un modo tan cercano en estos años respecto a mis posibilidades de futuro. Espero haber aprendido lo suficiente de ellos para lo que me viene ahora.

Pero un grupo no es solo quien lo lidera, necesita miembros para funcionar más allá de los despachos y hay personas que tienen un valor igual de importante y una experiencia inestimable que permiten que todas las piezas funcionen de la manera perfecta posible. Una de esas personas eres tú, **Aiora**. No pensaba al comienzo de todo esto, cuando apenas hablábamos que podríamos encajar tan bien, pero eres una de las personas en las que más he confiado y cuya opinión he respetado durante todo este tiempo. Tanto si se trata de coordinar algo, como de responsabilizarse, tanto de ayudar a quien necesite, como de bromear de cualquier cosa que estemos hablando en el momento. Siempre has estado a mi lado para poder cerrarte la puerta antes de que entres. Siempre has estado ahí para hablar de cosas profundas a las 9 de la mañana. Siempre has estado ahí para comentar cualquier chorrada y desarrollarla hasta su máxima expresión mientras otra gente nos mira confusa. Por todos esos momentos, toda la ayuda que me has dado y lo mucho que me has enseñado a crecer como persona, gracias. Echaré mucho de menos no poder contestar a los pensamientos en voz alta de alguien con completa seriedad.

Hay más personas con las que he compartido todo mi trayecto a las que me encantaría agradecer muchas cosas. Muchas gracias, **Raquel** por todo tu ánimo y energía. Somos el yin y el yang del sonido en este laboratorio, y esta última época en la que no has estado tanto o no con tanta

energía se ha notado mucho el desequilibrio. Agradezco mucho todos los momentos que hemos pasado juntos, tanto hablando de tonterías como de múltiples frikadas como de cosas más serias. Eres parte del alma de este grupo y sin tu energía, tu alegría e hiperactividad no sería lo mismo. Otra persona que siempre ha estado presente a mi lado todo este tiempo eres tú **Julia**. Desde nuestra cercanía de origen (ni León tú, ni Salamanca yo, pero equivalentes) he sentido comprensión por tu parte en muchos aspectos, al haber crecido en ambientes similares. Tu alegría, emoción y dedicación por las cosas pequeñas de la vida como ir de café, hacer disfraces elaborados, hacer regalos, celebrar que un experimento sale bien y muchas más cosas me han alegrado el día frecuentemente. Aunque el COVID no nos lo haya permitido aumentar más, nuestro grupo de Cronologic siempre se mantendrá infalible. Muchas gracias por todos estos buenos momentos compartidos. Otro de los siempre presentes, **Pablo**. He aprendido muchas cosas de ti, y aunque pueda sorprenderte muchas de ellas no son relacionadas ni siquiera con la ciencia. Detrás de esa alta fachada de flores lanzadas a uno mismo hay una persona que se preocupa y que nunca falla cuando se le necesita. Una de las primeras personas que se acerca de manera desinteresada a preocuparse por la vida de una persona, simplemente porque es lo correcto y por hacer sentir a la otra persona mejor. Por todo eso y lo demás, muchas gracias.

No todo el trayecto, pero si la mayor parte de mi tiempo aquí, he compartido muy buenos momentos con mucha más gente, algunos presentes aquí en los laboratorios aún, otros ya no. Empezaré por los que aún estáis aquí. Muchas gracias, **Miriam**. Prácticamente siempre hemos estado juntos en este camino de tesis, tú siempre un paso por delante, tanto de manera real por tiempo, como a nivel de preparación y organización mental. Muchas gracias por todas las charlas de vida que hemos tenido, todos los momentos de diversión tanto dentro como fuera del laboratorio y toda la preocupación que siempre me has mostrado por intentar ayudarme con cualquier cosa que necesitara. Pero por encima de todo, muchas gracias y lo siento por haberte hecho aguantar todos los múltiples crujidos de todas mis articulaciones. Otra persona que no puede faltar en estos agradecimientos es mi tocayo de nombre, gemelo y recientemente unidad familiar, muchas gracias, **Pedro**. Aunque ya no hagamos cosas divertidas desde que viniste, yo me lo he pasado muy bien hablando de todo contigo, leyendo biofilms mensualmente, revisando fotografías para buscar la verdadera historia detrás, creando teorías estúpidas sobre el funcionamiento del departamento, hablando de nuestros planes para cada momento de vacaciones... muchos buenos momentos por los que darte las gracias. Sin ti no hubiera sido lo mismo estos años de tesis. Eres el siguiente de la cola, pero no te preocupes, seguro que te irá "fenómeno". No me puedo olvidar tampoco de otra persona con la que empecé, aunque ahora

a finales ya no hayamos compartido tanto tiempo juntos, muchas gracias **Anna** por todo. Empezamos el sufrimiento en conjunto, pero no todo han sido malos ratos. Agradezco mucho todas las buenas y largas charlas que hemos tenido cada vez que has venido de visita, aunque ahora ya no sean tan comunes. Puede que termine yo antes la tesis, pero no te preocupes porque estoy seguro de que te irá genial en la tuya, así que, ¡Mantén tu energía zen y tu mindfulness a tope para esta última recta final! Tampoco me puedo olvidar de mi compañera de beca (y casi de piso) y joven investigadora polar, muchas gracias por todo **Paula**. Compartir las penas por las estancias y las injusticias, el sufrimiento de escribir, pero también los buenos momentos tanto en el laboratorio como fuera me ha alegrado muchos días. ¡Ya no te queda nada tampoco a ti para acabar, así que mucho ánimo con el último tramo y no te dejes caer en la Isla de la Decepción antes de terminar!

Pero el camino también he estado acompañado por gente que no siempre ha estado, que también me ha aportado mucho en estos años y me encantaría agradecerse. Empezar por alguien que ha regresado recientemente y, si todo va bien, para quedarse. **Clara**, muchas gracias por todos estos años de amistad, tanto dentro como fuera del lab. Me alegro mucho de tu vuelta estos últimos meses. Siempre es divertido poder hablar con alguien de frikadas o tener con quien compartir dulces en las mañanas (o tardes, que no me olvido de las deudas de dulces). Sin ti no habría tenido el ánimo suficiente como para atreverme a aprender japonés, así que el resto del agradecimiento irá en ese idioma (con múltiples fallos posiblemente). これら数年間は本当に楽しかったです。一緒に時間を過ごすのは幸せにしました。クララさんがアドバイスするので、日本語の勉強に上手になっています。それから、お世話になっております、クララ先生。お菓子をたべたいなら、いっしょに行きましょうよ! Gracias también a **Laura**, aunque no hayamos compartido más tiempo que el comienzo de mi tesis con tu final. Te agradezco mucho toda la preocupación que has tenido por ayudarme siempre, tanto dentro como fuera del laboratorio, pese al poco tiempo juntos. También agradecer a **Maryury**, otra persona con la que solo coincidió poco más que mi comienzo. Muchas gracias por todos esos buenos momentos y charlas de tardes de laboratorio, así como por tu ayuda en los primeros momentos de comenzar a desenvolverse por uno mismo en el laboratorio. Muchas gracias también a las minions, **Laia** y **Lucifer**, aunque no coincidimos demasiado tiempo juntos recuerdo con mucho cariño esos meses de mi tesis por la cantidad de buenos momentos que compartimos juntos en múltiples comidas, cenas, escape rooms y demás planes divertidos juntos. Espero que algún día podamos repetirlos y mejorarlos. También muchas gracias a todos los demás TFGs/ TFMs / estudiantes / técnicos / ayudantes/ etc. que han pasado por el lab

durante mi estancia con los que he pasado buenos momentos durante sus cortas estancias en el grupo: **Olatz, Lirain, Sergio, Irene, Sara, Alejandra, Gabi, Gus, Manu, Roger, Lina, Adán, Alex, Jennifer, Ariadna**, Gracias también a todos los que me haya olvidado en esta lista, aunque mi memoria no sea lo suficientemente buena, os agradezco igualmente haber estado presentes en mi vida este tiempo.

Aunque sé que no te gusta y que este formato no te importa, te quiero agradecer también por escrito por todo **Robert**. Desde el primer momento que comencé, me ayudaste completamente de manera desinteresada, siendo apenas conocidos y desde entonces me alegro mucho de haber forjado nuestra amistad estos años. Aprecio mucho tu sinceridad, tus opiniones y tu pasión por descubrir cosas nuevas. Me alegro mucho de que hayas conseguido sobreponerte a las múltiples trabas de tu camino y hayas conseguido salir, tal y como querías. Espero que el futuro nos depare mejores momentos y fuera de un horario laboral a ser posible, en comidas, cenas, partidas, escape rooms o lo que apetezca.

Judith, tampoco te vas a librar de ser agradecimentada. No hay mucho que decirte que no sepas, porque cualquier cosa que te escriba por aquí respecto a lo importante que has sido y eres para mi es algo que ya sabes personalmente y que te diría en cualquier día normal. Pero no podía escribir unos agradecimientos sin incluir al motivo por el que acabé aquí, aunque ya no compartamos los días trabajando al lado. Sin ti, toda mi experiencia estos años en Barcelona hubiera sido mucho más gris y aburrida. Muchas gracias por todo, lo pasado, lo presente y lo futuro, porque, aunque esta etapa se acabe la siguiente será mejor definitivamente → | ↓.

Brevemente, también quiero dar gracias al resto de miembros del departamento que me han acompañado durante todos estos años, si bien por brevedad no será de manera tan exhaustiva. A todos los miembros de secretaria por el buen ambiente que generan y la inestimable ayuda que me han ofrecido durante todo este tiempo, al resto de jefes del departamento por su disposición y ayuda, y al resto de compañeros de ambas fases con los que he compartido muchos buenos momentos más allá del sufrimiento conjunto de la tesis, todos los videos compartidos, las comidas prevacacionales con pizzas, las prácticas juntos, las cenas de departamento en grupo y las múltiples reuniones respecto a temas que no merece la pena hablar. Muchas gracias por todos estos años y mucho ánimo a los que aún estáis en el camino.

Dejando el aspecto laboral, también hay varias personas a las que me gustaría agradecer:

Alba, muchas gracias por todos estos años. Que vinieras a Barcelona me ha alegrado mucho estos últimos años poder seguir compartiendo nuestra vida y amistad, aunque ya no sea lo

mismo que en Salamanca como pseudo compañeros de piso. Animo con el resto de los años que te quedan y nos volveremos a ver en el futuro para múltiples partidas juntos. **Lucas**, gracias por todo este tiempo juntos. Me alegro de haber podido conocerte de verdad ahora en Barcelona, aunque ahora que te has marchado a Canadá ya no coincidiremos tanto. Muchas gracias por toda tu ayuda y amistad estos años. A **Mario, Delia, Nuria, Álvaro, Julio, Gerard, María, Ori, Álvaro, Alex, Marc, Nieves, Noelia, Clara, Marina, Héctor, Auri, Belén, Sara, Fran, Albert, Kazuko, Nanami**, y el resto de gente que posiblemente me olvide con la que he compartido tantos buenos momentos estos años, muchas gracias por todo.

Gracias también **Mario, Sara, Cuque, Jota, Alba y Prada** porque, aunque no habéis estado físicamente presentes, siempre habéis estado conmigo durante innumerables horas todos estos años. Sin vosotros habría perdido la cabeza durante el tiempo de cuarentena sin duda. No cambiaría por nada todos estos momentos que hemos pasado juntos y que espero que con los años no cambien, salvo tal vez a más y más cerca si las cosas salen bien. Nos veremos en la tumba, en Vajra, en el infierno o donde sea necesario.

Gracias también a toda mi **familia**, por el apoyo constante e incondicional que me habéis dado todos estos años. Si no fuera por vosotros no habría crecido a ser quien soy y, aunque no lo reconozca lo suficientemente a menudo, sois lo más importante de mi vida. Muchas gracias por todo.

Por último, no puedo irme sin terminar mi ronda de agradecimientos sin añadir algo tan propio de mí como los agradecimientos aleatorios e inesperados para finalizar:

Gracias Alexandra Elbakyan, por tu lucha por el conocimiento libre. A Juan Manuel Gálvez por el diseño de la portada. Al cast de Critical Role por las incontables horas de alegría y tiempo invertido. A Shoji Meguro, Keiichi Okabe, Toby Fox, Danny Baranowsky, Autumn Orange y todos los compositores por toda la concentración que he necesitado. A mis vecinos, por no estar presentes durante casi todo mi tiempo en Barcelona. A los repartidores (no todos), por causar continuas distracciones en el laboratorio. A los gatos de la Facultad por alegrar mis mañanas de camino. A ti, persona del futuro que está leyendo mi tesis años más adelante por algún motivo (posiblemente por protocolos), gracias por mantener esta tesis viva. Y, por último, gracias a la única persona sin la que esto jamás hubiera sido posible. Gracias a mí.

Pd: Al comienzo pensaba que no podría escribir nada y aquí estoy, intentando que solo sean 6 páginas...

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| Agradecimientos | 5 |
| Índice | 11 |
| Abreviaturas | 13 |
| Abstract | 15 |
| Resumen | 16 |
| 1. Introducción | 17 |
| 1.1 Importancia del agua y la calidad hídrica en la vida humana | 19 |
| 1.1.1 Demanda hídrica y estrés hídrico | 19 |
| 1.1.2 Saneamiento, higiene y control microbiológico del agua..... | 21 |
| 1.2 Presencia de microorganismos patógenos en matrices acuáticas..... | 24 |
| 1.2.1 Posibles rutas de transmisión de patógenos..... | 24 |
| 1.2.2 Patógenos transmitidos por el agua y sus características principales | 25 |
| 1.3 Microorganismos indicadores | 31 |
| 1.3.1 Microorganismos indicadores de contaminación fecal | 31 |
| 1.3.2 Microorganismos indicadores fecales utilizados en el análisis del agua..... | 32 |
| 1.3.3 Parámetros microbiológicos y valores de indicadores recogidos en las normativas actuales y perspectivas de futuro | 35 |
| 1.4 Uso de los bacteriófagos como microorganismos indicadores | 38 |
| 1.4.1 Características de los bacteriófagos..... | 38 |
| 1.4.2 Tipos de bacteriófagos usados como microorganismos indicadores..... | 39 |
| 1.4.2.1 Colifagos Somáticos | 39 |
| 1.4.2.2 Colifagos F-específicos y F-ARN específicos..... | 40 |
| 1.4.2.3 Bacteriófagos que infectan a <i>Bacteroides</i> | 41 |
| 1.4.3 Valoración de los bacteriófagos como microorganismos indicadores | 42 |
| 1.4.3.1 Bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal..... | 42 |
| 1.4.3.2 Bacteriófagos como indicadores de proceso..... | 45 |
| 1.4.3.3 Bacteriófagos como índices y modelos de virus humanos | 46 |
| 1.4.3.4 Idoneidad de los subgrupos como indicadores y normativas que incluyen bacteriófagos | 47 |
| 1.5 Métodos para la detección de bacteriófagos | 49 |
| 1.5.1 Métodos tradicionales para la detección de bacteriófagos indicadores | 49 |
| 1.5.1.1 Detección de colifagos somáticos..... | 49 |
| 1.5.1.2 Detección de colifagos F-específicos | 52 |
| 1.5.1.3 Detección de colifagos totales | 54 |
| 1.5.1.4 Detección de bacteriófagos que infectan a <i>Bacteroides</i> | 55 |

| | | |
|---------------------|--|------------|
| 1.5.2 | Métodos de detección rápida de bacteriófagos..... | 55 |
| 1.5.2.1 | Mejoras en el proceso de detección de calvas | 55 |
| 1.5.2.2 | Detección de la lisis en cultivos líquidos del huésped..... | 56 |
| 1.5.2.3 | Métodos moleculares..... | 57 |
| 1.5.2.4 | Sensores microelectrónicos | 57 |
| 2. | Objetivos..... | 59 |
| 3. | Informes..... | 63 |
| 3.1 | Informe sobre el factor de impacto | 65 |
| 3.2 | Informe de participación en las publicaciones | 67 |
| 4. | Artículos | 69 |
| 4.1 | Artículo 1: <i>Bluephage</i> : Un método rápido para la detección de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal en aguas..... | 71 |
| 4.2 | Artículo 2: <i>Bluephage</i> , un método para la detección eficiente de colifagos somáticos en muestras de agua de cien mililitros..... | 89 |
| 4.3 | Artículo 3: Evaluación de nuevos componentes en el medio Modificado de Scholten para la detección de colifagos somáticos | 101 |
| 4.4 | Artículo 4: Nueva aproximación para la detección simultánea de colifagos somáticos y F-específicos como indicadores de contaminación fecal..... | 117 |
| 4.5 | Artículo 5: Detección de colifagos F-específicos mediante el método <i>Bluephage</i> | 133 |
| 5. | Discusión general | 149 |
| 6. | Conclusiones..... | 169 |
| 7. | Bibliografía..... | 173 |
| Anexos | 211 | |
| | Anexo 1: Otras publicaciones del doctorando..... | 213 |
| | Anexo 2: Medios de cultivo y tampones. | 215 |
| | 2.1 Medios de cultivo | 215 |
| | 2.2. Tampones y disoluciones..... | 221 |
| | 2.3 Antibióticos empleados en los estudios..... | 225 |
| | Anexo 3: Protocolos realizados | 227 |
| | Anexo 4: Plásmidos..... | 243 |
| | Anexo 5: Cebadores de PCR | 247 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| °C | Grados centígrados |
| (x)g | Fuerza centrífuga |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análisis de Varianza |
| APHA | Asociación Americana de la Salud Pública |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNasa | Ribonucleasa |
| ATCC | Colección Americana de Cultivos Tipo |
| bd | Bidestilada |
| BGM | Medio de crecimiento de <i>Bluephage</i> (<i>Bluephage Growth Medium</i>) |
| BTM | Medio de ensayo de <i>Bluephage</i> (<i>Bluephage Test Medium</i>) |
| CG | Copias génicas |
| CrAssphage | En inglés, <i>cross-assembly phage</i> |
| DAL | Técnica de la doble capa de agar (<i>Double Agar Layer</i>) |
| DO _{600nm} | Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda |
| EDAR | Estación Depuradora de Aguas Residuales |
| F-ADN | Colifagos F-específicos de ADN |
| F-ARN | Colifagos F-específicos de ARN |
| g | Gramo |
| h | Hora |
| ICTV | Comité Internacional sobre la Taxonomía de Virus |
| ISO | Organización Internacional para la Estandarización |
| Kb | Kilobase |
| L | Litro |
| LB | Luria- Bertani |
| Lp | Cebador 3''- 5'' (<i>Lower primer</i>) |
| M | Molar |
| MET | Microscopio Electrónico de Transmisión |
| Min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimolar |
| MS | Medio Modificado de Scholtens (<i>Modified Scholtens medium</i>) |

| | |
|--------------------------|---|
| MSA | Agar Modificado de Scholtens (<i>Modified Scholtens Agar</i>) |
| MSB | Caldo Modificado de Scholtens (<i>Modified Scholtens Broth</i>) |
| MST | En inglés, <i>Microbial Source Tracking</i> |
| MUG | 4- metil umbeliferil β -D-Glucurónido |
| NMP | Número Más Probable |
| nm | Nanómetros |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| O/N | En inglés, <i>Overnight</i> |
| ONU | Organización de las Naciones Unidas |
| P | Valor de probabilidad de significancia estadística |
| PES | Poliéter sulfona |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PVDF | Fluoruro de Polivinilideno |
| qPCR | PCR cuantitativa |
| RD | Real Decreto |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT-qPCR | PCR cuantitativa con transcripción inversa |
| SAL | Técnica de la capa única de agar (<i>Single Agar Layer</i>) |
| SOB | En inglés, <i>Super Optimal Broth</i> |
| SOC | En inglés, <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> |
| SOMCPH | Colifagos somáticos |
| spp | Especie |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| UFP | Unidades formadoras de calvas de lisis |
| UNESCO | Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, |
| Up | Cebador 5' – 3' (<i>Upper primer</i>) |
| U.S. EPA | Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos |
| UV | Ultravioleta |
| wt | Salvaje, silvestre, natural (<i>Wild type</i>) |
| X-Glu | Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido |
| μl | Micro litro |
| μm | Micrómetro |

ABSTRACT

Relevance and public interest in controlling fecal transmission of viral pathogens has been recently increasing worldwide. Consequently, this has created a need for establishing suitable indicators for predicting viral behavior and transmission in the environment. Bacteriophages have been proposed as viral fecal indicators for decades and they are currently being incorporated into multiple guidelines and regulations of water management, such as the new European Union directives for maintaining water quality of drinking water and reclaimed water. Thus, the development and improvement of methods that allow a fast, user-friendly, robust, and efficient bacteriophage detection is required, as traditional methods entail more than a day of work to provide results and their implementation can be cumbersome for routine analysis laboratories.

Under these global circumstances, *Bluephage* has been developed as a possible solution for these difficulties. *Bluephage* is a colorimetric methodology qualitatively capable of detecting all groups of coliphages thanks to the release into the external medium of the enzyme β -glucuronidase during lytic processes. This is attainable thanks to the genetic modifications performed on the host bacteria used to detect these coliphages, which blocks the import of the substrate into the cells and overexpresses this intracellular enzyme. Only after phage-mediated lysis, the overexpressed enzyme can be released from the cells, encounter the substrate in the medium, cleave it and produce a colorimetric change of the medium from yellow to blue.

This method is an improvement over traditional methods, allowing the detection of up to 1 coliphage in samples up to 100 ml in less than 6 hours. Its sensitivity, specificity and precision are equivalent to standardized methods and it can be scaled to different sample volumes, adapted for analysis of samples from different origins and detection of different types of coliphages. It is also possible to achieve quantitative results from the qualitative data using the Most Probable Number approach. Overall, *Bluephage* is the fastest microbiological culture-based method for detecting viral fecal pollution described to date and can provide results where rapid information about fecal pollution is essential.

RESUMEN

El control de la transmisión de patógenos víricos a través de la ruta fecal-oral ha adquirido recientemente relevancia e interés público. Para mantener este control, es necesario determinar indicadores apropiados para la predicción de comportamiento y transmisión de los virus en las matrices ambientales. Los bacteriófagos han sido propuestos como indicadores víricos de contaminación fecal desde hace varias décadas y están siendo incorporados gradualmente como organismos indicadores en numerosas normativas de gestión del agua, como las nuevas directivas de la Unión Europea para el control de calidad de aguas de consumo y aguas regeneradas. Como consecuencia, será necesario disponer de métodos que permitan detectar bacteriófagos de manera sencilla, rápida, robusta y eficiente. Esta necesidad ha impulsado la mejora y el desarrollo de nuevos métodos de detección, ya que los métodos tradicionales requieren más de un día de trabajo para proporcionar resultados y pueden ser difíciles de implementar en laboratorios de análisis rutinario.

Bajo este contexto se ha desarrollado el método *Bluephage*, un método colorimétrico que permite la detección cualitativa de los diferentes grupos de colifagos mediante la liberación de la enzima β -glucuronidasa al exterior celular por la lisis bacteriana. Este método es posible gracias a una serie de modificaciones genéticas realizadas en las cepas huéspedes empleadas para la detección de colifagos, bloqueando el transporte de los sustratos de la enzima al interior celular y sobreexpresando la enzima intracelularmente. Sólo después de la lisis mediada por fagos, la enzima sobreexpresada puede salir de la célula, encontrar el sustrato en el medio, degradarlo y producir un cambio colorimétrico del medio de amarillo a azul. Este método supone una mejora respecto a los métodos tradicionales, ya que permite la detección en menos de 6 horas de hasta 1 colifago en volúmenes de muestra de hasta 100 ml. Presenta una sensibilidad, especificidad y precisión equivalentes a los métodos estandarizados y es adaptable a volúmenes de muestra grandes y pequeños, a muestras de diferentes orígenes, a la detección de todos los grupos de colifagos y a resultados cuantitativos mediante la aplicación de la técnica del Número Más Probable sobre los resultados cualitativos. En definitiva, *Bluephage* es el método microbiológico más rápido descrito hasta la fecha para la detección de contaminación fecal utilizando microorganismos cultivables y puede proveer resultados cuando la información rápida de contaminación fecal es esencial.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del agua y la calidad hídrica en la vida humana

1.1.1 Demanda hídrica y estrés hídrico

El agua es un recurso renovable indispensable para el sustento y desarrollo de la vida en nuestro planeta. Aproximadamente un 71% de la superficie terrestre se encuentra cubierta por agua, pero, de este total, el agua salada de mares y océanos supone un 97,5% correspondiendo solamente un 2,5% al agua dulce. Si no se considera el agua que forma parte de casquetes polares y zonas de alta montaña debido a que no es posible su utilización, esta cifra se vería reducida a solo un 0,7 % de agua dulce disponible en acuíferos, lagos, humedad del suelo y ríos. Este escaso porcentaje de agua dulce disponible es crucial para el desarrollo de la vida y de las sociedades (Gleick 1993).

Las actividades socioeconómicas del ser humano necesitan agua para su desarrollo. En la actualidad, la demanda hídrica se reparte fundamentalmente entre tres grandes destinos: el sector primario (69%) el sector industrial (19%) y el uso doméstico (12%) (AQUASTAT 2014). Se prevé que durante los próximos años el consumo de agua industrial y doméstico sufrirá un incremento debido al aumento de la demanda hídrica en estos sectores en los países en vías de desarrollo, siendo la agricultura el sector que aún demandará más agua (UNESCO 2019). Globalmente, el uso del agua se ha multiplicado por seis durante el último siglo y continúa aumentando anualmente a un ritmo del 1%. A este ritmo constante, las previsiones actuales estiman que en el 2050 la demanda hídrica incrementará hasta un 30 % en comparación con la cifra actual (Burek et al. 2016).

Este aumento en la demanda de agua conllevará una consecuente disminución progresiva de los recursos hídricos que se verá intensificada por el cambio climático, produciendo un suministro más errático e incierto a causa de los cambios generados en las precipitaciones y la temperatura (Schewe et al. 2014). Asumiendo que la escasez de agua seguirá incrementando de este modo, se estima que alrededor del 52% de la población mundial vivirá en regiones con alto estrés hídrico en 2050 (Köbel et al., 2018). El concepto de **estrés hídrico** hace referencia al déficit de agua, tanto por escasez del recurso como por su calidad deficiente. El estrés hídrico ya es uno de los principales problemas a nivel global a los que se enfrentan muchas sociedades en el siglo XXI (Figura 1). Aunque en el año 2010 el derecho humano al agua y al saneamiento fue reconocido por primera vez por la Asamblea General de las Naciones Unidas mediante la

Resolución 64/292, millones de personas viven en regiones con elevado estrés hídrico, bien por escasez o por mala calidad del agua, especialmente en países con rentas bajas (Mekonnen and Hoekstra 2016). Se estima que alrededor de 1.600 millones de personas se enfrentan a escasez de agua en la actualidad, al carecer de las infraestructuras necesarias que garanticen el acceso al agua. El suministro de agua urbana es particularmente vulnerable debido a la alta densidad poblacional de las ciudades y al aumento global de la urbanización. (UNESCO 2020).

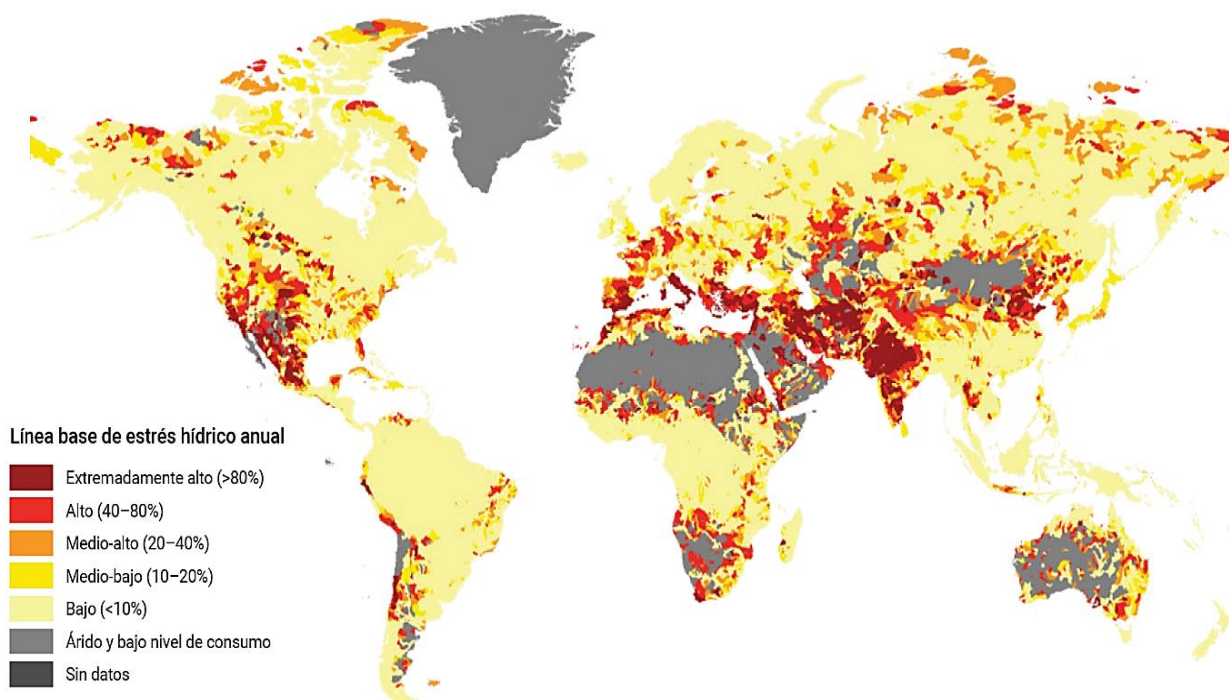


Figura 1. Distribución de los niveles del estrés hídrico en todo el planeta en 2020 (UNESCO 2020).

El aumento de la población mundial que se prevé en los próximos años y la influencia intensificada del cambio climático conllevará un aumento en la demanda hídrica que repercutirá de manera directa en la acentuación del estrés hídrico. Los problemas generados por el estrés hídrico afectarán tanto a países desarrollados como en desarrollo, ya que en este concepto se incluyen tanto la escasez física de agua derivada de problemas de sequía como los cambios en la calidad del agua, tales como el aumento de los contaminantes emergentes o la propagación de especies invasoras que suponen una pérdida en la calidad de los cuerpos de agua. Esta mala calidad hídrica contribuye a limitar aún más su disponibilidad, aumentando los riesgos para la salud humana.

El agua debe tener características específicas que garanticen su seguridad a nivel físico, químico y microbiológico en función de su origen, sus características y su uso destinado. En caso contrario, las enfermedades relacionadas con el agua, capaces de transmitirse a través de ella, proliferan. Por ejemplo, el cólera y la esquistosomiasis siguen siendo frecuentes en muchos países en desarrollo, donde solo una fracción muy pequeña de las aguas residuales domésticas y urbanas son tratadas antes de su liberación al medio ambiente (UNESCO 2017). Para mitigar los efectos nocivos que el aumento de la población, la actividad humana y el cambio climático ejercen sobre la cantidad y la calidad de las aguas naturales, es imprescindible la aplicación de tratamientos adecuados a cada caso (potabilización, depuración, regeneración, etc.), así como la mejora en la eficiencia de utilización de este recurso y la búsqueda de nuevas vías de abastecimiento como el reciclaje y la reutilización de aguas contaminadas.

1.1.2 Saneamiento, higiene y control microbiológico del agua

El saneamiento se define como acceso y el uso de instalaciones y servicios para la eliminación segura de orina y heces humanas (OMS 2018). En 2015, solamente el 39% de la población mundial tenía acceso a servicios de saneamiento gestionados de manera segura, donde las aguas de desecho se controlan a través de un sistema de colección de alcantarillado y son tratadas en plantas de depuración de aguas residuales (Figura 2). Un saneamiento adecuado es esencial para la salud, tanto en la prevención de infecciones como para la mejora y mantenimiento de un bienestar mental y social. La falta de un sistema seguro de saneamiento contribuye al aumento de la prevalencia de diarreas, una de las principales preocupaciones sanitarias mundiales ya que son la causa primordial de enfermedad y muerte en niños menores de 5 años en países con rentas medias y bajas. Aunque el derecho a saneamiento es un derecho fundamental reconocido, la contaminación del agua no tratada por la carencia de este servicio causa anualmente casi 2 millones de muertes prevenibles en todo el mundo, así como la pérdida de 123 millones de DALYs (años de vida ajustados en función de la discapacidad, del inglés *disability-adjusted life years*)(UNESCO 2020).

El cambio climático y los fenómenos extremos como sequías o inundaciones, constituyen también una amenaza para las infraestructuras hídricas de saneamiento e higiene. Como consecuencia, el riesgo sanitario se ve agravado por la posible expansión de contaminaciones microbiológicas, específicamente de patógenos, derivadas de la actuación de estos fenómenos extremos. La contaminación con patógenos es el problema más extendido de calidad del agua

en los países en desarrollo debido a la mala calidad inicial del agua, fallos en el procedimiento o ausencia de saneamiento (OMS and UNICEF 2017).

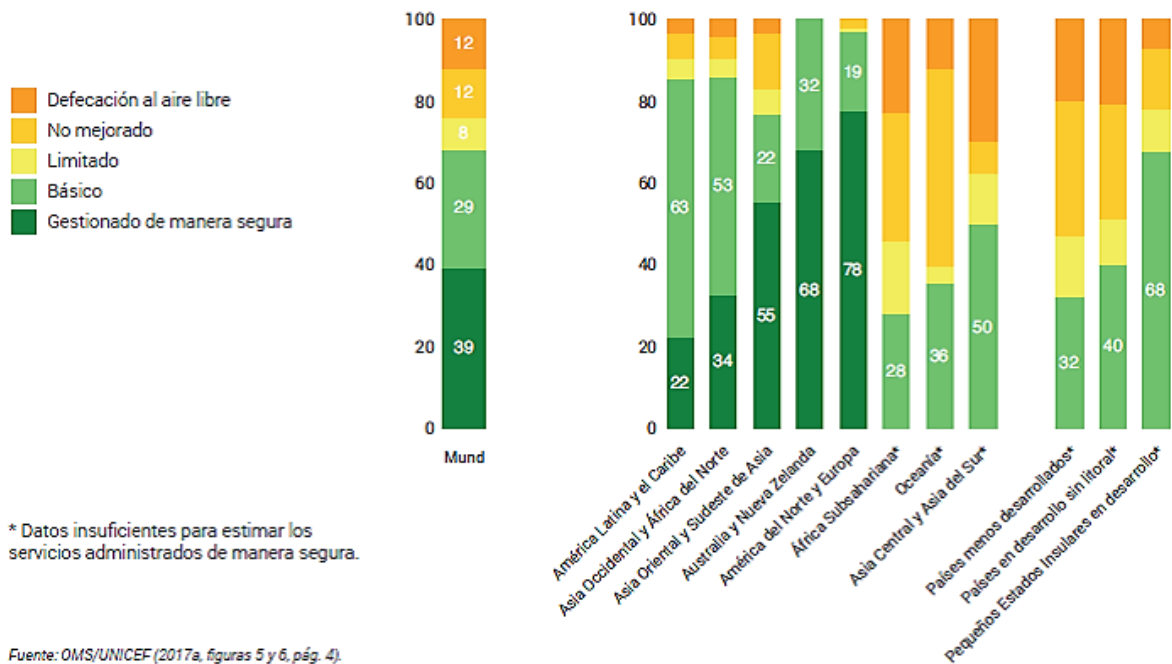


Figura 2. Distribución porcentual de la cobertura mundial de saneamiento global (UNESCO 2020)

Con el objetivo de garantizar una calidad, acceso y saneamiento del agua adecuados para su población, y eliminar los patógenos de transmisión hídrica, los países han adoptado diferentes normas de gestión. El establecimiento de consensos entre varias naciones es ocasionalmente requerido debido a la posibilidad de que el agua sea un recurso compartido por diferentes países, haciendo necesario establecer políticas de gestión comunes. En el año 2000, la Unión Europea aprobó la Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, conocida como la Directiva Marco del Agua (DMA). La gestión integral de las masas de agua propuesta por esta directiva sigue el principio de **One Health**, es decir, defiende la interconexión de la salud humana, animal y ambiental para llevar a cabo estrategias y políticas de gestión integradoras (World Health Organisation 2017). Las relaciones entre la salud humana, animal y ambiental se hacen patentes en los recursos hídricos, ya que numerosas enfermedades humanas de transmisión hídrica tienen su origen en animales y otros organismos que se diseminan por los hábitats acuáticos.

Además de la perspectiva de One Health, existe un concepto similar denominado **Global Health**. Este concepto hace referencia al estudio e investigación cuyo objetivo prioritario es mejorar la salud y alcanzar una salud igualitaria para toda la población mundial (Koplan et al. 2009). En cierto modo, se puede entender One Health como la versión local del concepto de Global Health, haciendo referencia a una interconexión de ecosistemas regionales frente a la interconexión global defendida por la perspectiva de Global Health. Por lo tanto, la relación intrínseca entre ambos conceptos es evidente, existiendo múltiples conexiones en el planeta, de diferente índole y no siempre bajo control humano, que hacen que la salud humana, animal y ambiental de un territorio concreto puedan repercutir sobre la salud del resto de territorios del planeta. Estas conexiones incluyen el comercio, los movimientos migratorios, los fenómenos meteorológicos y los viajes de seres humanos que por diferentes motivos pueden ser responsables de que diversos problemas sanitarios pueda ser extendidos globalmente en muy poco tiempo (Hernando-Amado et al., 2019). Uno de los ejemplos más actuales de esta conexión es la reciente pandemia de COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2. Este virus de origen zoonótico, fue presuntamente transmitido al ser humano en Wuhan (China) durante el año 2019 por malas prácticas de manipulación de animales y alimentos, causando una posterior expansión global con múltiples repercusiones sanitarias, sociales y económicas (Zhou et al. 2020). Por ello, el control de la contaminación microbiológica abordado desde una perspectiva global e integradora es fundamental para minimizar los riesgos sanitarios asociados.

1.2 Presencia de microorganismos patógenos en matrices acuáticas

1.2.1 Posibles rutas de transmisión de patógenos

Debido a la extensa distribución de los microorganismos en el ambiente, los seres humanos entran en contacto cercano con ellos de manera continuada, aunque solamente un pequeño porcentaje son capaces de interactuar y desencadenar una enfermedad. Estos microorganismos capaces de causar enfermedades se denominan patógenos y según sus características se diferencian en 5 grandes grupos: Bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos (NIH 2007).

La transmisión ambiental de los patógenos se ve favorecida por 3 características comunes clave: Son excretados en altos números en las heces, capaces de persistir en el medio ambiente y altamente infecciosos (Aw 2018).

Si los patógenos excretados por individuos infectados no se contienen ni se tratan de manera adecuada pueden suponer un riesgo para los humanos que entren en contacto con ellos mediante diferentes vías de transmisión (Naughton and Mihelcic 2017). Se pueden encontrar las siguientes posibilidades en las matrices acuáticas:

- La **ingestión** hídrica de fuentes con un saneamiento deficiente conlleva a un incremento de la transmisión de patógenos por la vía fecal-oral, así como de otros contaminantes químicos tóxicos como arsénico o flúor. Además del agua que se ingiere directamente, también incluye la mala calidad del agua utilizada en la producción, procesamiento y preparación de los alimentos.
- Una **higiene** personal pobre e inadecuada por la calidad deficiente y/o la ausencia de agua que garantice una correcta higiene (por ejemplo, en el caso del tracoma).
- La generación de **aerosoles** en sistemas de agua mal controlados (por ejemplo, en la transmisión de la legionelosis).
- El **contacto directo** con aguas contaminadas (por ejemplo, en la esquistosomiasis).
- Los **vectores** de transmisión de patógenos que proliferan en el agua o que la utilizan como reservorio (por ejemplo, en el caso de la transmisión de la malaria).

Entre éstas, destacan por su frecuencia especialmente 3 rutas de transmisión de patógenos: La ingestión (agua de bebida y alimentos), la inhalación y aspiración (aerosoles) y el contacto

directo con la piel (aguas de baño). Estas vías no son exclusivas entre sí, de modo que existen algunos grupos patogénicos capaces de transmitirse a través de varias de ellas (Figura 3).

El vertido de residuos fecales constituye una de las principales fuentes de contaminación del agua, al introducir cantidades elevadas de microorganismos al ciclo del agua, incluyendo los patógenos entéricos. Para reducir la transmisión de patógenos por la ruta fecal-oral se necesitan mejoras en la calidad hídrica, la disponibilidad del agua, la eliminación de excreciones y la higiene general, de manera que se establezcan **barreras** de contención de esta transmisión fecal-oral de los patógenos.

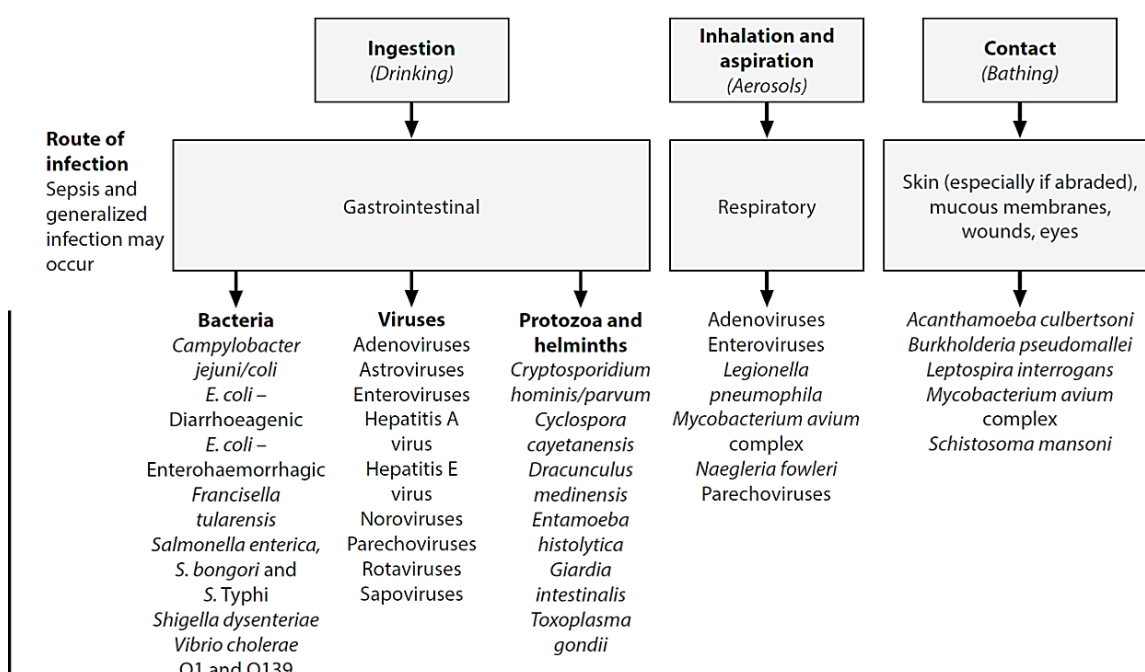


Figura 3. Vías de transmisión hídrica de patógenos y ejemplos de patógenos transmitidos a través de cada una de ellas (World Health Organisation 2017).

1.2.2 Patógenos transmitidos por el agua y sus características principales

Los patógenos hídricos son microorganismos taxonómicamente muy diferentes que comparten en común su transmisibilidad a través del medio acuático, confirmada mediante estudios epidemiológicos. Presentan una serie de propiedades que los diferencian de otros tipos de contaminantes propios de matrices acuáticas (World Health Organisation 2017):

- Son capaces de multiplicarse en sus huéspedes durante un proceso de infección, pudiendo causar efectos agudos y crónicos en la salud del huésped. La enfermedad desencadenada por la exposición al patógeno dependerá de su dosis infectiva, capacidad invasiva y virulencia, así como del estado inmunológico del individuo infectado.
- Son capaces de agregarse entre sí y adherirse a partículas en suspensión. Como consecuencia, su dosis infectiva real no puede ser predicha correctamente por el análisis de la concentración del patógeno libre en el agua. La diferencia entre las concentraciones teóricas y reales se ve intensificada por la potencial capacidad de crecimiento de los patógenos en el ambiente, alimentos o estructuras artificiales como tuberías o sistemas de refrigeración, perpetuando o incluso aumentando la probabilidad de infección por encima de los niveles teóricos esperados.
- No presentan efectos acumulativos en la salud, al contrario que determinados contaminantes químicos.

Los patógenos hídricos pertenecen fundamentalmente a 4 grandes grupos taxonómicos: Bacterias, virus, protozoos y helmintos. La valoración del riesgo que supone cada patógeno para la salud humana utiliza parámetros que se correlacionan con su pertenencia a un determinado grupo taxonómico como su potencia, su presencia y persistencia en el ambiente o su transmisibilidad entre animales (zoonosis) (Aw 2018). La potencia o infectividad de un patógeno se estima mediante la relación dosis-respuesta observada (Tabla 1). La presencia y persistencia en el ambiente de los patógenos influyen en su capacidad de transmisión, así como su posible transmisión entre diferentes especies.

El primer paso de la transmisión de un patógeno a un nuevo huésped es su llegada al ambiente, generalmente a través de las heces. Consecuentemente, la cantidad total y concentración de patógenos en las heces es fundamental, ya que su concentración final en el ambiente se verá condicionada por la cantidad inicial del patógeno en su llegada. A continuación, la persistencia en el ambiente de los patógenos es un factor crucial para alcanzar nuevos huéspedes (Yates 2019). Si un patógeno no es capaz de crecer en el ambiente, perderá de manera gradual su viabilidad y capacidad infectiva tras la salida de su anterior huésped. Por lo tanto, cuanto más tiempo pueda persistir un patógeno, la posibilidad de entrar en contacto con un nuevo huésped susceptible es superior. Determinar el tiempo de persistencia de los patógenos en diferentes muestras de aguas es esencial para comprender el potencial impacto en la salud pública que puede estar asociado a su consumo (Murphy 2019; Yates 2019). La supervivencia en el

ambiente de los patógenos depende tanto de condiciones físicas como químicas. Algunos de los factores más importantes que influyen en la supervivencia son: La temperatura (en general mayor persistencia a menores temperaturas), la actividad microbiana, el oxígeno disuelto, la materia orgánica, el tipo de microorganismo, la agregación, el pH, el contenido de humedad y la adsorción a materiales sólidos (Murphy 2019; Yates 2019). Dentro de los diferentes grupos taxonómicos de patógenos hídricos, la persistencia ambiental de los helmintos es la más elevada, seguida por los virus y los protistas, siendo las bacterias el grupo menos persistente.

| Patógeno | ID50 | Unidad de dosis | Referencia |
|--|----------------------|-----------------|-----------------------------|
| Virus | | | |
| Adenovirus, Tipo 4 | 1,14 | TCID50 | Couch et al., 1966 |
| Echovirus, cepa 12 | 9,22x10 ² | UFP | Schiff et al., 1984 |
| Enterovirus | 1,85x10 ² | UFP | Cliver, 1981 |
| Poliovirus, Tipo 1 | 1,41 | PD50 | Koprowski, 1956 |
| Rotavirus | 6,17 | FFU | Ward et al., 1986 |
| Bacterias | | | |
| <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) | 3,18x10 ³ | UFC | Cornick and Helgerson, 2004 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> / <i>C. coli</i> | 8,90x10 ² | UFC | Black et al., 1988 |
| <i>Salmonella</i> Typhi | 1,11x10 ⁶ | UFC | Hornick et al., 1970 |
| <i>Shigella</i> | 1,48x10 ³ | UFC | DuPont et al., 1972 |
| <i>Vibrio cholera</i> | 2,43x10 ² | UFC | Hornick et al., 1971 |
| <i>Yersinia pestis</i> | 4,26x10 ² | UFC | Lathem et al., 2005 |
| Protistas | | | |
| <i>Cryptosporidium parvum</i> / <i>C.hominis</i> | 1,21x10 ¹ | Ooquistes | Messner et al., 2001 |
| <i>Giardia duodenalis</i> | 3,48x10 ¹ | Quistes | Rendtorff, 1954 |

Tabla 1. Dosis infectivas medias de algunos de los patógenos hídricos representativos de los diferentes grupos taxonómicos (Adaptado de Aw, 2018) Estas referencias pueden ser consultadas en Aw 2018. FFU: *Fluorescent Focus Units*. TCID50: *Median Tissue Culture Infectious Dose* PD50: *In vivo 50% Protective Dose* UFC: Unidad formadora de colonias. UFP: Unidad formadora de calvas

Los patógenos hídricos categorizados dentro de las **bacterias** presentan con mayor frecuencia la persistencia más ambiental baja en comparación con el resto de grupos. Esto se debe a que son más sensibles a la inactivación por desinfección, no crecen típicamente en el agua y sobreviven durante periodos de tiempo más cortos en matrices hídricas con bajas concentraciones de nutrientes, aunque existen excepciones como las especies de *Legionella* capaces de crecer en el agua y transmitirse con cierta facilidad (Murphy 2019; Aw 2018). Sin embargo, como su importancia a nivel sanitario y posible transmisión por zoonosis son elevadas (Tabla 2), el estudio de su comportamiento y el control de su transmisión a través de matrices acuáticas resulta importante pese a su inferior transmisibilidad.

| Patógeno | Tipo de especie/género | Importancia sanitaria | Persistencia en agua | Resistencia al cloro | Infectividad relativa | Fuente animal |
|--|--|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------|
| Bacterias | | | | | | |
| <i>Burkholderia</i> | <i>B. pseudomallei</i> | Alta | Puede multiplicarse | Baja | Baja | No |
| <i>Campylobacter</i> | <i>C. coli</i> <i>C. jejuni</i> | Alta | Moderada | Baja | Moderada | Si |
| <i>Escherichia coli</i> Diarreagénica | | Alta | Moderada | Baja | Baja | Si |
| <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica | <i>E. coli</i> O157 | Alta | Moderada | Baja | Alta | Si |
| <i>Francisella</i> | <i>F. tularensis</i> | Alta | Larga | Moderada | Alta | Si |
| <i>Legionella</i> | <i>L. pneumophila</i> | Alta | Puede multiplicarse | Baja | Moderada | No |
| Micobacterias (no tuberculosas) | <i>Mycobacterium avium</i> complex | Baja | Puede multiplicarse | Alta | Baja | No |
| <i>Salmonella</i> Typhi | | Alta | Moderada | Baja | Baja | No |
| Otras <i>Salmonella</i> | <i>S. enterica</i> <i>S. bongori</i> | Alta | Puede multiplicarse | Baja | Baja | Si |
| <i>Shigella</i> | <i>S. dysenteriae</i> | Alta | Corta | Baja | Alta | No |
| <i>Vibrio</i> | <i>V. cholerae</i> O1 y O139 | Alta | Corta hasta larga | Baja | Baja | No |
| Virus | | | | | | |
| Adenoviridae | Adenovirus | Moderada | Larga | Moderada | Alta | No |
| Astroviridae | Astrovirus | Moderada | Larga | Moderada | Alta | No |
| Caliciviridae | Norovirus, Sapovirus | Alta | Larga | Moderada | Alta | Potencial |
| Hepeviridae | Virus de la Hepatitis E | Alta | Larga | Moderada | Alta | Potencial |
| Picornaviridae | Enterovirus, Parechovirus, Virus de la Hepatitis A | Alta | Larga | Moderada | Alta | No |
| Reoviridae | Rotavirus | Alta | Larga | Moderada | Alta | No |
| Protozoos | | | | | | |
| <i>Acanthamoeba</i> | <i>A. culbertsoni</i> | Alta | Puede multiplicarse | Alta | Alta | No |
| <i>Cryptosporidium</i> | <i>C. hominis</i> / <i>C. parvum</i> | Alta | Larga | Alta | Alta | Si |
| <i>Cyclospora</i> | <i>C. cayetanensis</i> | Alta | Larga | Alta | Alta | No |
| <i>Entamoeba</i> | <i>E. histolytica</i> | Alta | Moderada | Alta | Alta | No |
| <i>Giardia</i> | <i>G. intestinalis</i> | Alta | Moderada | Alta | Alta | Si |
| <i>Naegleria</i> | <i>N. fowleri</i> | Alta | Puede multiplicarse | Baja | Moderada | No |
| Helmitos | | | | | | |
| <i>Dracunculus</i> | <i>D. medinensis</i> | Alta | Moderada | Moderada | Alta | No |

Tabla 2. Patógenos más importantes transmitidos en aguas de bebida y sus riesgos asociados más relevantes (Adaptada de World Health Organisation 2017).

Los **virus** son el grupo de tamaño más pequeño dentro de los patógenos hídricos, por lo que son los más difíciles de eliminar mediante métodos físicos como la filtración. Los virus entéricos tienen una alta persistencia ambiental y una gran capacidad de supervivencia a procesos de tratamiento de residuos (Tabla 2). Esto es consecuencia de algunas de sus propiedades intrínsecas como: su tamaño pequeño, su estabilidad en amplios rangos de temperatura y pH, su resistencia a agentes químicos oxidantes y enzimas proteolíticas o su tendencia a agregarse y adsorberse a partículas o superficies (Yates 2019). Su espectro de huéspedes suele ser muy limitado, siendo frecuentemente patógenos específicos de especies. Los grupos de virus patógenos más transmitidos a través del agua pertenecen a las familias de los rotavirus, enterovirus y norovirus (Aw, 2018) (Tabla 3).

| Tipo de agua implicada | Virus | Enfermedad | Referencias |
|-------------------------------------|--------------|-------------------|--|
| <i>Agua de consumo</i> | Polio | Poliomielitis | Mosley, 1967; Lippy and Waltrip, 1984 |
| | Echo | Meningitis | Cliver 1984 ; Amvrosieva et al., 2001 |
| | Rotavirus | Gastroenteritis | Murphy et al., 1983; Hopkins et al., 1984; Hung et al., 1984; Craun et al., 2002; Villena et al., 2003 |
| | Norovirus | Gastroenteritis | Kaplan et al., 1982; Blacklow and Cukor, 1982; Kukkula et al., 1999; Craun et al., 2002 |
| | Adenovirus | Gastroenteritis | Murphy et al., 1983 |
| | Hepatitis A | Hepatitis | Craun, 1988; Bosch et al., 1991 |
| | Hepatitis E | Hepatitis | Khuroo, 1980; Ramalingaswami and Purcell, 1988 |
| | Parvovirus | Gastroenteritis | Lippy and Waltrip, 1984 |
| <i>Aguas recreacionales marinas</i> | Rotavirus | Gastroenteritis | Fattal and Shuval, 1989 |
| | Adenovirus | Gastroenteritis | Foy et al., 1968; D'Angelo et al., 1979 |
| | Hepatitis A | Hepatitis | Birch and Gust, 1989 |
| <i>Aguas recreacionales dulces</i> | Coxsackie | HFMD | Cabelli, 1983 |
| | Enterovirus | Gastroenteritis | Lenaway et al., 1989 |
| | Rotavirus | Gastroenteritis | Andersson and Stenström, 1987 |
| | Norovirus | Gastroenteritis | Koopman et al., 1982 |
| | Hepatitis A | Hepatitis | Bryan et al., 1974 |

Tabla 3. Brotes de enfermedades generados por la presencia de virus entéricos en diferentes matrices acuáticas (Adaptada de Goyal, 2006). Estas referencias pueden ser consultadas en (Goyal, 2006).

Finalmente, los patógenos pertenecientes a los grupos de los **protozoos y los helmintos** son los que presentan mayor persistencia ambiental y resisten mejor los tratamientos de desinfección químicos (Tabla 2). Sus dosis infectivas son bajas, pero sus concentraciones en las excreciones suelen ser significativamente inferiores a las de otros patógenos y su eliminación por métodos

físicos suele ser eficaz dado su mayor tamaño, por lo que su presencia y transmisibilidad es frecuentemente inferior (World Health Organisation 2017). No obstante son capaces de causar también brotes de gran magnitud, por lo que es necesario tenerlos en consideración a la hora de valorar los posibles riesgos sanitarios (Amoah et al., 2017; Fletcher et al., 2012).

Las técnicas de detección de patógenos pueden diferenciarse fundamentalmente entre métodos basados en cultivo y métodos moleculares. Históricamente, los métodos de cultivo eran los únicos disponibles para el análisis de microorganismos en el agua. Sin embargo, no todos los patógenos de interés son cultivables. Por ejemplo, los norovirus humanos, uno de los patógenos más comunes transmitidos por el agua y alimentos, carecen de un método basado en cultivo celular que sea de fácil aplicación (Straub et al. 2013). Los métodos de cultivo requieren tiempo para el crecimiento microbiano, tienen una baja sensibilidad y son incapaces de detectar las células viables no cultivables, conllevando una infraestimación de las células infectivas en las muestras que podría conllevar potencialmente efectos perjudiciales en la salud (Li et al., 2014). Los métodos moleculares han sido desarrollados en las últimas décadas tras la invención de la PCR y nos permiten detectar microorganismos que previamente no se podían observar mediante cultivo. Son métodos más rápidos, sensibles, específicos y automatizables. No obstante, presentan desventajas importantes como la incapacidad de diferenciar de manera directa entre células infectivas y no infectivas, la facilidad de contaminación en el laboratorio, la posible inhibición de la reacción por la presencia de determinados compuestos en muestras altamente concentradas, la inexactitud en la valoración del número de microorganismos como consecuencia del volumen pequeño analizado y el desconocimiento de la correlación entre copias genómicas y células infectivas (Girones et al., 2010; Ramírez-Castillo et al., 2015; Yates, 2019). Ninguno de los métodos es perfecto y aplicable para todas las situaciones, por lo que es necesario tener en cuenta las ventajas y desventajas que conllevan en función de la aplicación deseada.

1.3 Microorganismos indicadores

1.3.1 Microorganismos indicadores de contaminación fecal

El análisis de todos los posibles patógenos presentes en una muestra es inviable debido a la gran variedad de patógenos existente y la falta de métodos apropiados para su extracción, concentración y/o detección. Además, muchos países donde serían necesarios estos análisis no disponen de los recursos para realizarlos, limitando en gran medida sus procesos de monitorización del control de la calidad del agua. Como solución, se estudian microorganismos indicadores como alternativa al análisis de muchos de estos patógenos, ya que mediante un único análisis es posible inferir la presencia de un determinado tipo de contaminación fecal y, por tanto, la plausible presencia de patógenos de dicho origen. Estos microorganismos, aún con ciertas limitaciones, proporcionan una herramienta válida para el control de la calidad microbiológica del agua (Fewtrell and Bartram, 2001; Momba et al., 2019).

Existen diferentes tipos de indicadores, pero en los análisis de calidad de aguas se emplean habitualmente los indicadores microbiológicos de contaminación fecal. Éstos permiten detectar la presencia (o ausencia) de contaminación fecal y controlar la eficacia de los procesos de desinfección o depuración, lo que nos alerta de la posible presencia o prevalencia de patógenos de origen fecal. No hay que confundir el término indicador con el término índice. Mientras los indicadores suelen indicar el buen funcionamiento de un proceso o tratamiento, los índices son organismos que se correlacionan con la presencia de determinados patógenos.

Los criterios definidos por la OMS que identifican a un microorganismo indicador de contaminación fecal son los siguientes (World Health Organisation 2017):

- No ser un microorganismo patógeno.
- Estar presente universalmente en heces de humanos y animales en números elevados.
- No multiplicarse en el agua bajo condiciones naturales.
- Estar presente en números más elevados que los patógenos fecales.
- Persistir o inactivarse en el agua de un modo similar a los patógenos fecales.
- Responder a tratamientos de desinfección de un modo similar a los patógenos fecales.
- Ser detectables con facilidad mediante métodos de cultivo simples y baratos.

Estos criterios asumen que los mismos organismos pueden emplearse tanto como indicadores de contaminación fecal como de eficacia de un proceso o tratamiento. No obstante, no existe un indicador que significativamente pueda predecir la presencia de todos los posibles patógenos. Por consiguiente, se deberían considerar diferentes organismos para diferentes propósitos. La asociación entre indicadores y patógenos no es perfecta, pero, si existen datos suficientes, los organismos indicadores pueden llegar a correlacionarse con los patógenos. La monitorización a largo plazo de organismos indicadores proporciona una indicación fiable del grado potencial de contaminación patogénica de una matriz ambiental y por tanto permite establecer riesgos potenciales y relativos de manera consecuente (Wu et al., 2011).

1.3.2 Microorganismos indicadores fecales utilizados en el análisis del agua

Los coliformes totales, coliformes fecales termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos fecales son los indicadores bacterianos más frecuentemente utilizados a nivel mundial con propósitos regulatorios (Harwood et al., 2019). El término **coliforme** representa un amplio grupo de especies bacterianas que no están rígidamente definidas por su taxonomía sino por su capacidad para fermentar la lactosa produciendo ácidos y gas. Los coliformes son bacilos anaerobios facultativos, Gram negativos, no formadores de esporas, oxidasa negativos. Resisten a las sales biliares y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* cuyos géneros dominantes son *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Los coliformes se expulsan en las heces humanas y de animales en unas tasas diarias que exceden las 10^9 bacterias por individuo. Se ha observado que determinadas especies y cepas (particularmente de *Klebsiella* spp) pueden proceder de ambientes naturales como sedimentos marinos, fluviales o arenas de playas y pueden crecer en ellos bajo condiciones determinadas (Sadowsky and Whitman, 2011). Durante más de un siglo, el recuento de coliformes se realizó de manera exclusiva mediante métodos de cultivo cuya selectividad se ve influenciada por factores como la capacidad de degradación de un sustrato como fuente de carbono o energía, la temperatura de incubación o la detección de productos secundarios capaces de causar alguna reacción colorimétrica. Algunos de los indicadores más frecuentemente representados en las normativas son los siguientes:

- Los **coliformes totales** se emplean como indicación general sobre las condiciones sanitarias de una muestra, ya que debido a su ubicuidad en el ambiente no pueden utilizarse como indicadores de contaminación fecal. Este grupo está formado por bacterias que poseen la enzima β -galactosidasa, capaz de degradar lactosa o sus análogos

cromógenos sintéticos (Pisciotta et al., 2002; Sadowsky and Whitman, 2011). Los coliformes totales se analizan frecuentemente en muestras de agua subterránea y suministros de agua potable.

- Los **coliformes fecales o termotolerantes** son un subgrupo de coliformes capaces de crecer en 24 h a 44,5°C con actividad de la β -galactosidasa (Sadowsky and Whitman, 2011) que están frecuentemente presentes en heces humanas y animales. El grupo se compone fundamentalmente por *Escherichia coli* y *Klebsiella* spp., siendo *E. coli* la especie aeróbica más abundante en las fuentes fecales, aunque otros miembros de géneros como *Enterobacter* o *Citrobacter* son también capaces de crecer a 44,5°C independientemente de su procedencia fecal o no (Figueras et al., 1994).
- *E. coli* es un miembro termotolerante de los coliformes, habitualmente móvil mediante sus flagelos. *E. coli* es cultivable en laboratorio con facilidad y su identificación fenotípica está basada en la fermentación de lactosa, reducción de nitratos, producción de indol a partir del triptófano e incapacidad de uso de citrato como única fuente de carbono (Sadowsky and Whitman, 2011). Además, se diferencia de otros coliformes termotolerantes por la producción de la enzima β -glucuronidasa (más del 95 % de las cepas de *E. coli* poseen esta actividad). Forma parte de las comunidades intestinales y heces de la mayor parte de animales y humanos. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, algunas cepas pueden causar enfermedades potencialmente fatales (Levine 1987). *E. coli* es la bacteria más utilizada para la monitorización de la calidad microbiológica y la contaminación fecal en todo tipo de muestras ambientales. Muchos países han adoptado el uso de coliformes termotolerantes o específicamente *E. coli* para regular la calidad de sus aguas y alimentos. Al igual que los otros coliformes termotolerantes, bajo condiciones ambientales determinadas podría ser capaz de crecer en el agua (Solo-Gabriele et al., 2000).
- Los **enterococos y estreptococos fecales** son cocos catalasa negativos, Gram positivos fermentadores que forman colonias características en medios selectivos y diferenciales que contienen azida de sodio, un compuesto inhibitorio de Gram negativos. Su metabolismo es principalmente fermentativo, pero no son dañadas por el oxígeno. Los estreptococos fecales son menos numerosos en muestras humanas que los coliformes, pero también se utilizan como indicadores de contaminación fecal en diversas muestras

ambientales (APHA, 2012), particularmente en muestras marinas, debido a su tolerancia a concentraciones elevadas de sal.

- **Bacterias fecales anaerobias** de las familias *Bifidobacteria*, *Clostridia* y *Bacteroidales* se utilizan también como indicadores de contaminación fecal, aunque en menor medida debido al requerimiento de anaerobiosis para su incubación. Los clostridios reductores de sulfitos son bacilos anaerobios estrictos, Gram positivos, formadores de endosporas inmóviles que pueden fermentar lactosa y producir gas. Están normalmente presentes en heces, aunque en concentraciones más bajas que las de *E. coli*. Sus esporas son excretadas por menos del 35% de los huéspedes humanos y les permiten sobrevivir en el agua durante mayor tiempo, al ser más resistentes a mecanismos de desinfección que las células vegetativas (Ashbolt et al., 2001).

Al igual que los patógenos, los indicadores bacterianos pueden ser detectados mediante dos tipos de técnicas: Métodos de cultivo y métodos moleculares. Los métodos de cultivo permiten medir la capacidad de determinadas bacterias para crecer bajo determinadas condiciones y/o expresar determinadas enzimas en presencia de un medio de crecimiento concreto, que puede ser tanto selectivo como diferencial. Ciertos medios pueden incluir ingredientes que permiten la medida de la actividad de enzimas de bacterias que son capaces de hidrolizar algunos carbohidratos en azúcares. Un ejemplo muy extendido es la detección de la presencia de *E. coli* basada en la actividad β -glucuronidasa para el método IDEXX Quanti-tray. La aproximación más básica para la medida de bacterias indicadoras es un test de presencia/ausencia que puede utilizarse para estimar cuantitativamente en la muestra mediante el Número Más Probable (NMP) gracias al uso de diferentes diluciones y múltiples réplicas. Otra opción es el recuento directo de colonias a partir de las muestras inoculadas en un agar nutritivo o con filtración previa, contando las unidades formadoras de colonias (UFC) en función del volumen analizado. Estos métodos se usan para el recuento de coliformes, *E. coli* y enterococos en múltiples normativas de control de calidad del agua (Harwood et al., 2019).

Los métodos moleculares nos permiten detectar o estimar la concentración de marcadores genéticos en una muestra tras su obtención y aislamiento molecular. Las técnicas de PCR y qPCR son los métodos moleculares más comunes para la detección de bacterias indicadoras fecales y secuencias de ADN asociadas a bacterias fecales. Estas técnicas se utilizan para la detección de presencia de algunos de los grupos bacterianos, como el orden *Bacteroidales*, en muchas ocasiones con el objetivo de inferir el origen de la contaminación fecal humana o

animal (Harwood et al., 2019). La complejidad de las matrices de muestra, el muestreo, la preparación de ADN, su procesamiento y secuenciación dificultan su uso en el análisis rutinario de muestras como el agua residual (García-Aljaro et al., 2019).

1.3.3 Parámetros microbiológicos y valores de indicadores recogidos en las normativas actuales y perspectivas de futuro

Existen numerosas normativas elaboradas por diferentes países para garantizar la calidad microbiológica del agua. Los valores límites de los diferentes parámetros recogidos en la legislación varían en función del uso al que se destine el agua, siendo siempre más restrictivos en el caso del agua potable. Las normativas de agua destinadas a los diferentes usos humanos varían en función de cada país según su contexto social y geográfico. No obstante, organizaciones como la OMS o la *Environmental Protection Agency* de los EE.UU. (U.S. EPA) elaboran guías generales y establecen directrices para el desarrollo de políticas de gestión, saneamiento e higiene del agua (Fewtrell and Bartram 2001; U.S. EPA 2017).

En la legislación española, los parámetros microbiológicos establecidos y sus límites para los diferentes tipos de agua dependen de su uso final en función del riesgo que suponga la actividad para la salud humana (Tabla 4). Por ejemplo, dentro de los posibles usos del agua regenerada se diferencia entre los usos urbanos, agrícolas, industriales, recreativos y ambientales. La legislación española de aguas residuales urbanas no indica el uso de parámetros microbiológicos en el vertido al medio ambiente (Tabla 4), aunque sí establece unos límites de reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO), midiendo indirectamente la actividad microbiana por el proceso de degradación de la materia orgánica.

A pesar del uso de bacterias entéricas (especialmente *E. coli*) para controlar la calidad microbiológica del agua, desde finales del siglo pasado han surgido dudas en la comunidad científica respecto a la utilidad de los indicadores bacterianos para predecir la transmisión de enfermedades relacionadas con patógenos cuya persistencia es superior a las bacterias, como virus o protozoos. Se da el caso de que estos grupos puedan permanecer en las muestras incluso cuando las bacterias (y por ende los indicadores bacterianos) ya no están presentes (Gerba et al., 1979; Grabow, 2001; IAWPRC Study group on health related water microbiology, 1991; Jofre, 2007; Payment et al., 1997). Estas dudas se ven justificadas fundamentalmente por dos observaciones: La primera es que no se ha encontrado una buena correlación entre los indicadores bacterianos y la presencia de microorganismos más persistentes como los virus en

muestras de agua (Borchardt et al., 2004; Gerba et al., 1979; Lucena et al., 1996). La segunda es que los virus persisten más que los indicadores bacterianos convencionales ante estreses naturales y procesos de desinfección (Anderson et al., 2005; Hagler et al., 1986; Payment et al., 1985). Esto es aplicable tanto a muestras de agua como de alimentos como el marisco, los productos frescos y comidas preparadas listas para el consumo, los cuáles son muy susceptibles a la contaminación con virus entéricos (Goyal, 2006). Por lo tanto, la presencia de microorganismos persistentes como los virus puede generar brotes de gran magnitud (Tabla 5) por muestras contaminadas a pesar que éstas cumplen con los estándares de calidad dictados por los indicadores bacterianos y pudieran ser consideradas aptas para consumo humano (Doré et al., 2000; Le Guyader et al., 2008; Lowther et al., 2019; Richards, 1985). Por tanto, es necesario definir indicadores para estos organismos que permitan su monitorización de manera adecuada. Se han propuesto como potenciales indicadores víricos dos grupos: los virus humanos entéricos y los bacteriófagos de bacterias entéricas.

| Tipo de agua | Parámetros microbiológicos recogidos en la legislación española |
|---|---|
| Aguas residuales urbanas (RD 508/1996) | No establecidos |
| Aguas potables (RD 140/2003) | Enterococos intestinales, <i>E. coli</i> , <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Cryptosporidium</i> (turbidez superior a 5 UNT) |
| Aguas de baño (RD 1341/2007) | Enterococos intestinales y <i>E. coli</i> |
| Aguas regeneradas (RD 1620/2007) | Nematodos intestinales y <i>E. coli</i> (en todo tipo de usos) <i>Legionella</i> , <i>Salmonella</i> y otros patógenos de referencia (dependiendo del uso) |
| Aguas minerales y envasadas (RD 1799/2010) | <i>E. coli</i> , Estreptococos fecales, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , anaerobios sulfito reductores esporulados Recuento de colonias a 22°C (72 horas incubación) Recuento de colonias a 37°C (24 horas incubación) |

Tabla 4. Parámetros microbiológicos recogidos en la legislación española en función del tipo de muestra de agua analizada.

Dentro de los **virus humanos entéricos**, los enterovirus se han propuesto como potenciales indicadores al ser los más fácilmente detectables mediante cultivo celular de todos los virus entéricos. Sin embargo, la detección mediante cultivo celular conlleva mucho tiempo, es difícil y cara de realizar, dificultando su implementación en países de bajo poder adquisitivo (Momba et al., 2019). Tras la llegada de las técnicas genómicas, la evaluación de la abundancia de diferentes genomas víricos se ha propuesto como posibles indicadores víricos en aguas. Dentro de este grupo, los genomas de adenovirus están ganando terreno gracias a su alta prevalencia y

estabilidad en aguas residuales y su resistencia a estreses ambientales y desinfectantes. Estas características se deben a sus propiedades intrínsecas como virus de ADN de doble cadena, que además contribuyen a reducir los costes, la complejidad y el tiempo el proceso de amplificación de ácidos nucleicos al no requerir un paso de retrotranscripción (Bofill-Mas et al., 2006; Gerba et al., 2002; Ogorzaly et al., 2010). Sin embargo, una desventaja que presentan los adenovirus es que son patógenos, no indicadores, por lo que sólo se excretan por individuos enfermos. Además, los métodos moleculares presentan inconvenientes ya mencionados anteriormente, no permitiendo diferenciar entre virus infecciosos y no infecciosos sin añadir pasos adicionales (Nuanualsuwan and Cliver 2002).

| Año | País | Marisco | Nº de casos | Virus responsable | Referencia |
|-----------|-------------|------------------|-------------|-------------------|----------------------------|
| 1976-1977 | Reino Unido | Almejas | 800 | SRSV | Appleton and Pereira, 1977 |
| 1978 | Australia | Ostras | 2000 | NoV | Murphy et al., 1979 |
| 1978 | Australia | Ostras | 150 | NoV | Linco and Grohmann, 1980 |
| 1980-1981 | Reino Unido | Berberechos | 424 | NoV | O'Mahony et al., 1983 |
| 1982 | EE.UU. | Ostras | 472 | NoV | Richards, 1985 |
| 1983 | Reino Unido | Ostras | 181 | SRSV | Gill et al., 1983 |
| 1983 | Malasia | Berberechos | 322 | HAV | Goh et al., 1984 |
| 1986 | EE.UU. | Almejas y ostras | 813/204 | NoV | Morse et al., 1986 |
| 1988 | China | Almejas | 292/301 | HAV | Halliday et al., 1991 |
| 1999 | España | Almejas | 183 | HAV | Bosch et al. 2001 |

SRSV: Virus pequeños redondos y estructurados; NoV: Norovirus; HAV: Virus de la hepatitis A

Tabla 5. Brotes de enfermedades víricas de gran tamaño asociados al consumo de marisco no cocinado (Adaptada de Goyal 2006). Estas referencias pueden ser consultadas en (Goyal, 2006)

Tanto los virus infecciosos como los genomas víricos presentan otros inconvenientes que perjudican su uso como indicadores, como el hecho que sus concentraciones suelen ser bajas en el medio, requiriendo procedimientos de concentración complejos. Por otro lado, no se ha podido demostrar con certeza una correlación entre las concentraciones de diferentes virus, posiblemente como consecuencia de la estacionalidad de muchos de ellos y las diferentes resistencias a estreses ambientales y desinfectantes que presentan (Chapron et al., 2000; Gerba et al., 2002; Girones et al., 1989; Payne et al., 1986).

El segundo grupo que se ha propuesto como indicadores víricos de contaminación fecal son los **bacteriófagos que infectan a bacterias entéricas.**

1.4 Uso de los bacteriófagos como microorganismos indicadores

1.4.1 Características de los bacteriófagos

Los bacteriófagos, también denominados fagos, son virus que infectan a bacterias. Son parásitos intracelulares obligados de las células bacterianas a las que parasitan, empleando su maquinaria celular para replicarse (Adams 1959). Son los organismos más abundantes de la biosfera con una estimación de hasta 10^{31} fagos en el planeta (Suttle 1994; Clokie et al. 2011; Hyman and Abedon 2009). En su fase extracelular (virión) los bacteriófagos están formados por un ácido nucleico (ARN o ADN de doble cadena o simple) rodeado de una capa proteica denominada cápside. La cápside puede presentar estructuras adicionales externas como colas o espículas y, menos frecuentemente, una capa lipídica externa. Gracias a su estructura y composición, los viriones pueden persistir en el ambiente y son resistentes a los estreses naturales y antropogénicos (Grabow, 2001). Los fagos que afectan a bacterias indígenas de un hábitat tienden a ser menos persistentes que su huésped, pero los fagos de bacterias ajenas a un ambiente (alóctonas) persisten mejor que sus bacterias huéspedes (Grabow, 2001; Ogunseitan et al., 1990). Este es el caso de los bacteriófagos que infectan a bacterias entéricas, que son más persistentes que éstas cuando se hallan fuera del intestino humano.

Un fago puede tener un rango muy amplio de bacterias a las que infecta o ser muy específico de determinados grupos, llegando a incluso afectar solo a cepas concretas de la misma especie de bacterias (Muniesa et al., 2003; Thingstad et al., 2014). Esto se debe a que el espectro de huéspedes afectados por un fago depende de los receptores expresados en la superficie celular del huésped, a los que el fago se une iniciando el proceso de infección. Los fagos se replican mediante dos ciclos: lítico y lisogénico. En el ciclo lítico, inmediatamente tras la infección, los fagos se multiplican y terminan rompiendo las paredes de sus huéspedes desde el interior, liberando una progenie de entre 10-1000 individuos en función del fago y el estado fisiológico de la bacteria. Los fagos virulentos que siguen este ciclo pueden realizarlo en tiempos tan cortos como 30 minutos. Por el contrario, los fagos atemperados siguen un ciclo lisogénico, durante el cual el fago inyecta su ADN que se integra en el genoma bacteriano (profago) y se replica en conjunto con el mismo. Esta situación se mantiene hasta que el profago se induce (espontáneamente o por factores externos) y revierte su estado original escindiéndose del genoma y siguiendo el ciclo lítico, generando nueva progenie (Adams 1959).

Los fagos desempeñan múltiples funciones tanto en la naturaleza como en sus posibles aplicaciones. Tienen un impacto relevante en el ciclo de la materia orgánica de la biosfera y controlan la diversidad microbiana seleccionando a bacterias resistentes a su infección (Suttle, 1994). Pueden movilizar material genético entre bacterias gracias al proceso de transducción. En este proceso, el material genético de una bacteria puede ser introducido en otra bacteria tras la infección fágica si el fago se ha replicado empaquetando en su cápside ADN bacteriano de manera aleatoria, o bien de zonas adyacentes al sitio de unión del profago. A nivel de laboratorio, también desempeñan múltiples funciones como modelos y herramientas moleculares en el fagotipado de cepas, aplicaciones en terapia fágica, modelos evolutivos e indicadores de contaminación fecal (Hyman and Abedon 2009).

1.4.2 Tipos de bacteriófagos usados como microorganismos indicadores

Se han estudiado diferentes grupos de bacteriófagos como posibles microorganismos indicadores fecales para el control de la calidad del agua. En la actualidad se organizan en tres grupos de trabajo taxonómicamente complejos y diversos: los colifagos somáticos, los colifagos F-específicos y los bacteriófagos que infectan a especies de *Bacteroides*.

1.4.2.1 Colifagos Somáticos

El término colifagos somáticos define a los fagos que infectan a *E. coli* y otras bacterias coliformes del tracto intestinal a través de su pared celular. Tradicionalmente en base a la morfología, *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae* son las principales familias de colifagos somáticos encontrados en aguas residuales, siendo *Myoviridae* y *Siphoviridae* los grupos más abundantes (Muniesa et al., 1999). Nuevos descubrimientos realizados mediante técnicas de análisis genómico han aumentado el número de familias pertenecientes al orden *Caudovirales*, de manera que en 2020 el ICTV determina las siguientes nuevas familias dentro de este grupo: *Ackermannviridae* (nueva familia, aceptada hace unos años), *Autographviridae* (anteriormente un género de *Podoviridae*), *Chaseviridae* (nueva familia), *Demerecviridae* (nueva familia), *Drexelvriidae* (nueva familia) y *Herelleviridae* (nueva familia, aceptada hace unos años) (Koonin et al., 2020; Walker et al., 2020). Para mayor simplicidad, a lo largo de la tesis se hará referencia a los criterios morfológicos tradicionales debido a que son los reflejados en los estudios previos y nos centraremos en los fagos de las tres familias del orden *Caudovirales*, *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* (Figura 4), que presentan su material

genético en forma de ADN de doble cadena y los fagos de la familia *Microviridae* que contienen ADN monocatenario. En cuanto a su morfología, la familia *Myoviridae* tiene cápsides de hasta 100 nm con una cola larga contráctil, los fagos *Siphoviridae* tienen cápsides isométricas de hasta 60 nm con colas largas no contráctiles, los fagos *Podoviridae* tienen cápsides isométricas de hasta 65 nm y colas cortas y los fagos de la familia *Microviridae* tienen cápsides de 25-30 nm isométrica sin cola. Los colifagos somáticos más frecuentemente usados como modelos en investigación son ϕ X174, PDR1, T2 y T7.

Las cepas huéspedes de este tipo de colifagos pertenecen a *E. coli* y/o a especies otros géneros relacionados como *Shigella* y *Klebsiella*. Bajo condiciones fisiológicas óptimas, los colifagos somáticos pueden producir la lisis de sus huéspedes en aproximadamente 30 minutos, liberando entre 100 y 1000 fagos por célula infectada. En los ensayos en placa, sus calvas de lisis presentan una amplia variedad de tamaños y morfologías.

Uno de los principales problemas que se postuló inicialmente respecto a su uso como microorganismos indicadores fue que la replicación de colifagos somáticos en ambientales naturales podría ser posible bajo determinadas condiciones ambientales ya que algunos de sus huéspedes pueden estar presentes de manera natural en muestras no contaminadas fecalmente (Borrego et al., 1990; Seeley and Primrose, 1980). Sin embargo, hay múltiples factores que limitan esta replicación, como el estrecho rango de huéspedes, las altas concentraciones de fagos y bacterias requeridas para la replicación, la posible presencia de microbiota acompañante y partículas que pueden interferir en la replicación, la baja actividad metabólica de los huéspedes bajo condiciones ambientales o posibles respuestas de estrés en el ambiente que podrían desencadenar respuestas que minimicen la infección fágica (Cornax et al., 1991; Muniesa and Jofre, 2004, 2007; Muniesa et al., 2003; Raivio, 2011). Además, se ha probado que ni fagos aislados de muestras de aguas residuales ni de laboratorio son capaces de replicarse en muestras naturales en climas tropicales, concluyendo que la contribución a las muestras de colifagos somáticos replicados en el medio ambiente es prácticamente inexistente. (Hernández-Delgado and Toranzos, 1995; Jofre, 2009).

1.4.2.2 Colifagos F-específicos y F-ARN específicos.

Los colifagos F-específicos son fagos que infectan a *E. coli* y otras bacterias coliformes del tracto intestinal a través del pili sexual codificado en el plásmido F, inicialmente descrito en la cepa de *E. coli* K12. Pertenecen a dos familias de virus principalmente: *Inoviridae* (F-ADN) y

Leviviridae (F-ARN) (Fauquet and Fargette 2005) (Figura 4). Morfológicamente, la familia *Leviviridae* se compone bacteriófagos de ARN monocatenario con cápsides isométricas de aproximadamente 25 nm y sin cola y la familia *Inoviridae* son bacteriófagos de ADN bicatenario con cápsides filamentosas flexibles de aproximadamente 800 nm de longitud. Sin otra actuación que el uso de una cepa huésped que sintetice el pili F, se detectan ambos grupos (F-totales). La diferenciación entre los 2 grupos de colifagos F-específicos se consigue gracias a la adición de ARNasa en el medio de cultivo, ya que esta enzima degradaría los fagos F-ARN dejando solo los F-ADN (Anonymous 1995). Para calcular la cantidad de fagos F-ARN de una muestra se ha de analizar los fagos F-totales y los F-ADN mediante la adición de ARNasa, calculando el valor de F-ARN sustrayendo el valor de F-ADN del valor de colifagos F-totales.

Debido a su mayor similitud con los virus entéricos, se suelen estudiar más a menudo los F-ARN como indicadores de contaminación fecal. Dentro de los fagos F-ARN se diferencian cuatro genotipos o subgrupos (Hsu et al., 1995; Jofre, 2007). Los subgrupos I y II contienen colifagos pertenecientes al género de los *Levivirus* y los subgrupos III y IV se corresponden con el género de los *Allolevirus*. Los fagos más empleados como modelos de cada subgrupo son: MS2 y f2 del genotipo I, GA del genotipo II, Q β del genotipo III y FI del genotipo IV. El estudio de estos subgrupos es muy útil para la identificación del origen de contaminaciones fecales, ya que los subgrupos I y IV predominan en aguas contaminadas fecalmente por residuos animales y los subgrupos II y III se asocian más comúnmente con la contaminación humana (Jofre et al., 2011).

El plásmido F es transferible a un amplio rango de bacterias Gram negativas y hay múltiples huéspedes posibles para los fagos F-específicos, pero su huésped natural es *E. coli*. Como los pili sexuales no se sintetizan por debajo de 32°C, aunque no puede excluirse la posible replicación fuera del intestino, se considera que es extremadamente improbable dada la temperatura ambiental, de modo que su influencia se considera insignificante (Woody and Cliver 1997).

1.4.2.3 Bacteriófagos que infectan a *Bacteroides*

Los bacteriófagos que infectan a cepas de *Bacteroides* están presentes en muestras de heces o contaminadas fecalmente, pudiendo emplearse como indicadores fecales (Jofre et al., 2014). Hasta el momento, la gran mayoría de los bacteriófagos descritos de este grupo, tanto a nivel morfológico como genómico, pertenecen a la familia de los *Siphoviridae* (Jebri et al., 2017).

Son bacteriófagos somáticos, ya que infectan a través de receptores de la pared celular bacteriana, y suelen tener gran especificidad por un huésped determinado. Las cepas de *Bacteroides* spp difieren en su habilidad para recuperar fagos de diferentes matrices acuáticas contaminadas fecalmente y en su capacidad de detección de fagos de diferentes especies animales. Por este motivo, son muy útiles para la determinación de origen de la contaminación fecal (*Microbial Source Tracking* (MST)). En el caso de estos fagos, la replicación en el ambiente es incluso más improbable debido a los requerimientos de anaerobiosis estricta de las cepas huéspedes y la necesidad de nutrientes específicos cuya presencia es muy poco probable en ambientes acuáticos naturales (Tartera and Jofre 1987).

En el año 2014, gracias a la aplicación de técnicas de secuenciación masiva en estudios de secuencias metagenómicas fecales disponibles en las bases de datos, fue descrito el grupo de bacteriófagos más abundante del viroma fecal humano, el **crAssphage**, (cross-assembly phage) (Dutilh et al. 2014). Estudios posteriores han conseguido el aislamiento de especies del grupo mediante de métodos de cultivo (Shkoporov et al. 2018) y en los últimos años se han puesto a punto diferentes qPCR para su detección y cuantificación como indicador de contaminación fecal en muestras ambientales. El interés de estudio de crAssphage radica en su potencial como marcador de MST por su elevada especificidad de origen humano (García-Aljaro et al., 2017; Stachler et al., 2017), su gran abundancia (detectado en aproximadamente el 90% del viroma intestinal humano) y su extensa distribución geográfica (se detecta en todo el planeta). Estas características hacen de los fagos del grupo crAssphage candidatos muy prometedores como microorganismos indicadores de contaminación fecal vírica (Edwards et al. 2019).

1.4.3 Valoración de los bacteriófagos como microorganismos indicadores

1.4.3.1 Bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal

Guelin advocó por los fagos como potenciales indicadores de contaminación fecal desde 1948, al encontrar correlación entre *E. coli* y los bacteriófagos que infectan a *E. coli* en aguas de mar (Guelin 1948). Existen numerosos estudios que confirman la capacidad de los fagos para indicar la presencia de contaminación fecal y de patógenos entéricos en diferentes tipos de muestras (Contreras-Coll et al., 2002; Jiang et al., 2001; Jung et al., 2011; Love et al., 2014; Lucena et al., 2006; Méndez et al., 2004; Skrabber et al. 2002). Como consecuencia, los fagos que infectan a bacterias entéricas ya son aceptados como indicadores fecales útiles para el control de calidad de las aguas.

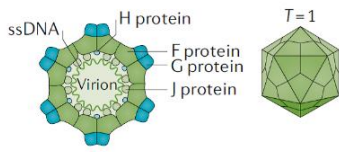
La prevalencia en heces de cada grupo de fagos presenta porcentajes variables. Los colifagos somáticos son los más presentes en muestras de heces humanas (entre 54-90%) y heces animales (1-100%). Los colifagos F-específicos siguen una tendencia similar con una incidencia máxima de 67 % de muestras humanas y porcentajes inconsistentes para muestras animales. Los bacteriófagos que infectan a *Bacteroides* también varían de modo similar, siendo en este caso la cepa huésped empleada un factor clave en la variabilidad. Presentan una prevalencia del 28 % en heces humanas y de 30 % en animales (Calci et al., 1998; Diston and Wicki, 2015; Gantzer et al., 2002; Havelaar et al., 1986; Jung et al., 2009; Schaper et al., 2002). Estos porcentajes de prevalencia en heces posiblemente son inferiores a la realidad, ya que no existen métodos establecidos que definan la cantidad de muestra que se debe analizar o la necesidad de aplicar procedimientos de extracción (Jebri et al., 2017). En el caso de aguas residuales, los 3 grupos de fagos presentan prevalencias del 100%.

Los colifagos somáticos son los más abundantes en el caso de las aguas residuales municipales, de hospital y mataderos (Tabla 6), habitualmente un orden de magnitud inferior a los valores de coliformes fecales. Los bacteriófagos F-específicos son los segundos en abundancia, con valores habitualmente un orden de magnitud inferior a los valores de colifagos somáticos. Respecto a los fagos que infectan *Bacteroides*, se han observado diferentes valores a nivel geográfico y en función de la cepa huésped (Blanch et al., 2006; Calci et al., 1998; Lucena et al., 2004, 2003; Mcminn et al., 2014; Yahya et al., 2015). Tras los tratamientos de las aguas residuales, los valores de bacteriófagos suelen descender entre 0,3- 3,0 unidades logarítmicas de las concentraciones iniciales en función del tratamiento (Jebri et al., 2017; Muniesa et al., 2012; Yahya et al., 2015).

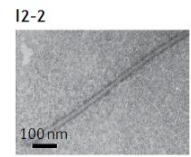
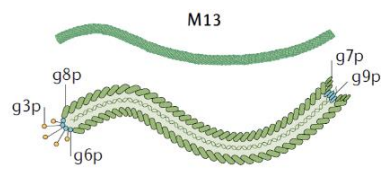
Debido a la falta de métodos estandarizados y los diferentes procedimientos de extracción, no es fácil comparar las concentraciones de fagos en lodos no tratados. La prevalencia en las muestras es similar a las aguas residuales, presentes en un 100 % en las muestras analizadas. La concentración de bacteriófagos en lodos primarios y secundarios se mantiene en proporciones similares con los indicadores bacterianos y no difieren de manera significativa con los determinados en aguas residuales (Guzmán et al., 2007; Jebri et al., 2017; Lasobras et al., 1999; Muniesa et al., 2012; Yahya et al., 2015).

a ssDNA

Microviridae (phiX174)



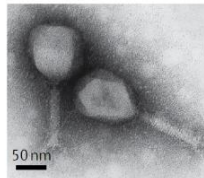
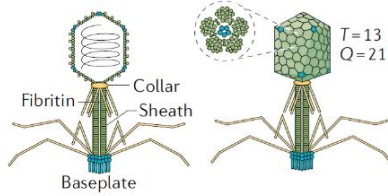
Inoviridae



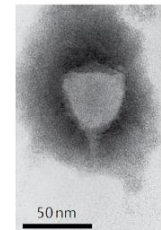
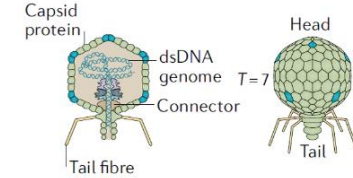
b dsDNA

Tailed

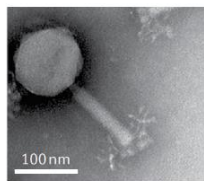
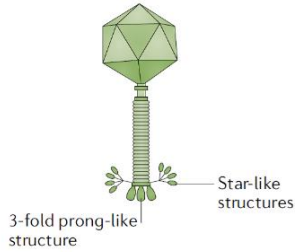
Myoviridae (T4) and Herelleviridae



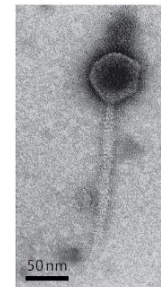
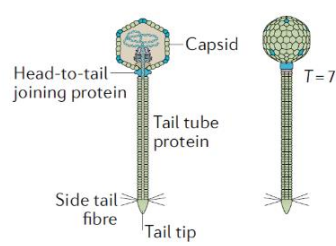
Podoviridae (T7)



Ackermannviridae (AG3)

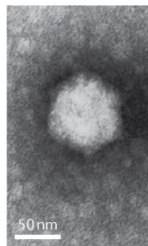
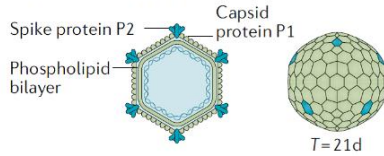


Siphoviridae (lambda)

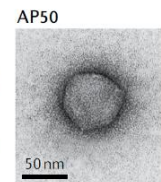
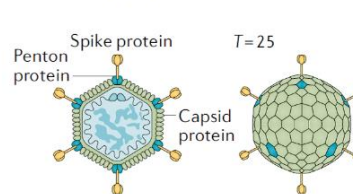


Non-tailed

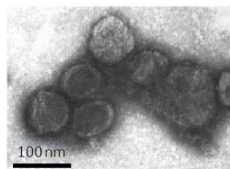
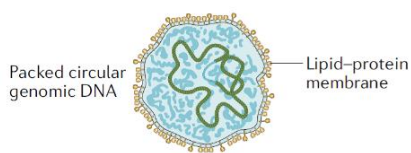
Corticoviridae (PM2)



Tectiviridae (PRD1)

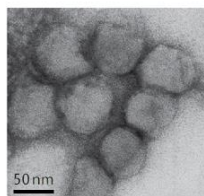
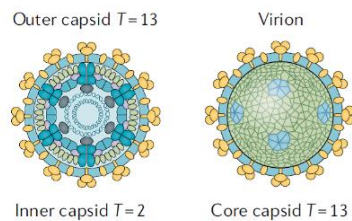


Plasmaviridae (MVL2)



c dsRNA

Cystoviridae (phi6)



d ssRNA

Leviviridae (MS2)

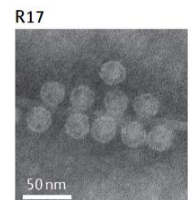
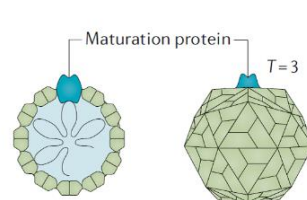


Figura 4. Estructura molecular de las familias de bacteriófagos más destacadas en función de su morfología y su genoma (Dion et al., 2020)

| Tipo de muestra | Concentraciones medias de bacteriófagos | | |
|---|--|---|---|
| | Somáticos (UFP/g o 100 ml) | F-específicos (UFP/g o 100 ml) | Bacteriófagos de <i>Bacteroides</i> * (UFP/g o 100 ml) |
| <i>Heces humanas</i> | <1- 7,3 x 10 ⁵ | <1- 1x 10 ⁴ | <1- 1 x 10 ⁴ |
| <i>Heces animales</i> | <1 - 1 x10 ⁸ | <1 - 1,2 x 10 ⁶ | <1- 1 x 10 ⁴ |
| <i>Aguas residuales sin tratar y post-tratamiento</i> | 10 ⁵ -10 ⁷ 10 ³ -10 ⁵ | 10 ⁴ - 10 ⁶ 10 ² -10 ⁴ | 10 ⁴ -10 ⁵ 5x 10 ¹ -10 ⁴ |
| <i>Lodos</i> | 10 ⁶ - 10 ⁷ | 10 ⁵ - 10 ⁶ | 10 ³ - 10 ⁵ |

Tabla 6. Concentraciones medias de los diferentes grupos bacteriófagos en muestras contaminadas fecalmente. * Los valores de bacteriófagos que infectan a *Bacteroides* pueden presentar diferencias significativas entre las diferentes cepas y geográficamente, los representados en la tabla corresponden a la cepa huésped RYC2056 que detecta fundamentalmente contaminación fecal humana (Jebri et al., 2017; Jofre, 2007).

1.4.3.2 Bacteriófagos como indicadores de proceso

Como indicadores de proceso víricos, se requiere que la eliminación e inactivación de los bacteriófagos entéricos sea similar a la sufrida por los virus humanos patógenos, tanto frente a procesos naturales como a tratamientos. De este modo, con el estudio de las cantidades de virus y fagos antes y después de los procesos se puede evaluar y comparar su eliminación e inactivación. Esta comparación puede resultar difícil de interpretar dado que los métodos de detección y volúmenes analizados para fagos y virus humanos son muy diferentes.

La información disponible sugiere que el destino de los fagos en ambientes naturales acuáticos y en tratamientos de agua y lodos es similar al de los virus humanos. (Armon and Kott, 1996; Grabow, 2001; IAWPRC Study group on health related water microbiology, 1991). Tanto virus como bacteriófagos persisten en el ambiente acuático y en sólidos (biosólidos y sedimentos) más que los indicadores convencionales bacterianos y también frente a procesos de inactivación, tanto naturales como artificiales, a nivel físico, químico y biológico (Contreras-Coll et al., 2002; Girones et al., 1989; Lucena et al., 1994). Existen múltiples factores que afectan a la inactivación y eliminación de los virus en muestras.

Dentro de los **factores naturales**, la temperatura, la luz solar, el pH y el ambiente iónico tienen un papel principal en la inactivación de virus y fagos. En el caso de **tratamientos de desinfección** destacan tratamientos como la filtración y la irradiación (UV, gamma y haz de electrones), los tratamientos térmicos y la desinfección química (cal, halógenos, ozono). Los procesos como la filtración eliminan a los virus del agua mediante la adsorción a partículas en

suspensión, la sedimentación y la filtración a través de matrices porosas. No inactivan a los virus, los transfieren a otro compartimento diferente. Tanto virus como bacteriófagos pueden ser adsorbidos a sólidos en suspensión, contribuyendo a su eliminación del agua en gran medida, ya que facilita su sedimentación tanto en ambientes naturales como en tratamientos, como se refleja en las concentraciones de fagos en sedimentos y lodos (Farahbakhsh and Smith, 2004; Lasobras et al., 1999; Payment et al., 1985). La acumulación y mala depuración de fagos y virus de marisco son comparables, y posiblemente influenciadas por esta tendencia de ambos a adsorberse a sólidos (Lucena et al., 1994; Muniain-Mujika et al., 2002). Tras recibir los tratamientos comúnmente usados para aguas residuales, basados en la sedimentación y digestión, los indicadores bacterianos, bacteriófagos y enterovirus infectivos sufren una reducción similar en sus concentraciones (Lodder and De Roda, 2005; Lucena et al., 2004; Nieuwstad et al., 1988). Sin embargo, si los tratamientos incluyen procesos de desinfección, se observa una reducción de concentraciones de indicadores bacterianos convencionales significativamente superiores a la de los virus y bacteriófagos (Durán et al., 2003; Harwood et al., 2005; Payment et al., 1985).

En conclusión, la eliminación de fagos y virus de ambientes acuáticos y tratamientos de aguas siguen tendencias similares. Por eso, determinados grupos de fagos ya han sido empleados con éxito como sustitutos de los enterovirus para evaluar la efectividad de determinados procesos de tratamiento como la filtración y la desinfección o la calidad final de productos (Abbaszadegan et al., 2008; Amarasiri et al., 2017; Durán et al., 2003; Havelaar et al., 1993; Payment et al., 1985; Persson et al., 2005).

1.4.3.3 Bacteriófagos como índices y modelos de virus humanos

En relación con su capacidad como índices de virus humanos (es decir si la presencia de fagos se correlaciona con ciertos virus patógenos), se ha observado que la ausencia de fagos no siempre garantiza la ausencia de todos los tipos de virus. La situación reportada con mayor frecuencia es que no existe una correlación entre virus y fagos en las muestras analizadas (Borchardt et al., 2004; Boehm et al. 2009; Griffin et al. 1999; Wyer et al. 2012). No obstante, teniendo en cuenta que los bacteriófagos que infectan a bacterias entéricas están siempre presentes en aguas residuales (por ello son indicadores de contaminación fecal) y considerando las similitudes entre ambos tipos de virus frente a los procesos de inactivación, se puede inferir que la presencia de cantidades de fagos de origen fecal en el agua se correlaciona con la presencia de virus humanos fecales en la misma de manera general, aunque dicha correlación

no se observe en grupos de virus específicos. Además, existen otros estudios que sí presentan correlación entre los virus humanos y bacteriófagos en muestras de aguas superficial, subterránea, sedimentos y moluscos (Brion et al., 2005; Havelaar et al., 1993; Jiang et al., 2001; Jofre et al., 1989; Love et al., 2014). Por otro lado, algunos estudios indican que tampoco hay correlación entre diferentes virus humanos en aguas (Abdelzaher et al., 2011; Borchardt et al., 2004; Jiang et al., 2007; Jung et al., 2011; Skraber et al., 2004), mientras que otros estudios sí han mostrado correlaciones entre diferentes virus patogénicos (Haramoto et al., 2005; Lodder et al., 2010; Rezaeinejad et al., 2014), coincidiendo con estudios que también reportan correlaciones entre virus humanos y colifagos. En todo caso, parece claro que los colifagos están más fuertemente asociados a los virus patógenos que los indicadores tradicionales bacterianos e incluso, en ocasiones, más que otros grupos de virus humanos (Wu et al. 2011). Por consiguiente, no son organismos índices de grupos específicos de virus (Lucena and Jofre, 2010), pero la presencia de colifagos sí indica la presencia de contaminación fecal y por tanto la posible presencia de virus fecales (Jofre et al. 2016).

1.4.3.4 Idoneidad de los subgrupos como indicadores y normativas que incluyen bacteriófagos

No existe un consenso en cuanto a la idoneidad de uno de los grupos de bacteriófagos como microorganismos indicadores, ya que cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes. Los **colifagos somáticos** habitualmente son los más abundantes en las muestras y su recuento es sencillo, rápido y fácil de realizar. Los principales inconvenientes que plantean son la posible replicación fuera del intestino (actualmente ya descartada), la heterogeneidad del grupo y la menor resistencia frente a algunos desinfectantes (UV), aunque dicha resistencia continua siendo superior a la de los indicadores bacterianos (Jofre et al. 2016). Los **colifagos F-específicos** suelen estar en concentraciones ligeramente inferiores a los colifagos somáticos y su método de detección es rápido y sencillo, aunque en menor medida debido a los requerimientos del plásmido F en la cepa huésped y la posible adición de pasos para la diferenciación de sus subgrupos, pero ofrecen mejores resultados en ciertos tipos de aguas y tratamientos (UV). La detección de **ambos grupos de colifagos de manera simultánea** podría ser una buena alternativa que pudiera aprovechar las ventajas presentadas por ambos grupos y minimizar sus inconvenientes. (Jofre et al. 2016). Los bacteriófagos indicadores menos abundantes son los **bacteriófagos de *Bacteroides***. Son más resistentes a factores y tratamientos de inactivación que otros grupos y no se replican fuera del intestino humano, pero su método de detección requiere condiciones de anaerobiosis, están presentes en menor concentración y

requieren de huéspedes diferentes en función de las diferentes áreas geográficas. Por ello, su uso es menos frecuente, aunque presentan características muy beneficiosas para la detección del origen de la contaminación fecal (Jofre et al. 2016).

| <u>Organización</u> | <u>Biosólidos</u> | <u>Agua subterránea</u> | <u>Agua recreativa</u> | <u>Agua potable</u> | <u>Agua regenerada</u> | <u>Integridad de membranas y UV</u> | <u>Reutilización directa de agua potable</u> |
|---------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|---------------------|--|-------------------------------------|--|
| <u>Australia</u> | 2012 (AO) | | | 2011* | 2005/2011 (Queensland/AO) | | |
| <u>Canadá</u> | | | | 2011 (Quebec) | | | |
| <u>Colombia</u> | 2014 | | | | | | |
| <u>EEUU</u> | | 2006 | 2015 (Propuesta) | | 2011 (Carolina del norte) | 2015 | |
| <u>India</u> | | | | 2012 | | | |
| <u>OMS</u> | | | | 2017* | 2017 (irrigación y recarga de acuíferos) | | 2017* |
| <u>Singapur</u> | | | | 2017* (OMS) | | | 2017*(OMS) |
| <u>Sudáfrica</u> | | | | 1996* | | | |
| <u>UE</u> | | | | 2020 | 2020 | | |

Tabla 7 Normativas que incluyen bacteriófagos como parámetros microbiológicos en función del tipo de muestra y el año de inclusión. (AO: Australia Oeste, * Guías y recomendaciones)

Pese a la ausencia de consenso en la elección de un subgrupo, durante las últimas décadas algunos de estos grupos de bacteriófagos han sido incorporados como parámetros microbiológicos en diversas normativas y guías para el control de la calidad microbiológica del agua y biosólidos de múltiples países. De hecho, recientemente se han actualizado las legislaciones europeas de aguas potables y aguas regeneradas cuyas propuestas incluyen a los bacteriófagos como parámetros microbiológicos a analizar, por lo que se prevé su futura implementación en todos los países miembros y sus legislaciones de manera consecuente (Tabla 7).

1.5 Métodos para la detección de bacteriófagos

La manera habitual de determinar la presencia de bacteriófagos es mediante la lisis bacteriana que generan o por las consecuencias que acarrea este proceso lítico como la liberación de compuestos intracelulares al medio externo. Por ello, uno de los pasos más importantes es definir la bacteria huésped que se empleará para la detección, ya que debe ser sensible al bacteriófago o grupo de bacteriófagos en cuestión para que pueda desencadenarse este proceso lítico.

1.5.1 Métodos tradicionales para la detección de bacteriófagos indicadores

Desde hace décadas se han descrito métodos sencillos que nos permiten detectar cualitativa o cuantitativamente la presencia de bacteriófagos en una muestra. Algunos de los ejemplos más clásicos son ensayos cualitativos como el test de presencia-ausencia o ensayos cuantitativos en placa mediante el recuento de las calvas de lisis generadas por los bacteriófagos como el método de doble capa de agar (DAL). Los ensayos de presencia-ausencia requieren un enriquecimiento y múltiples diluciones seriadas para posteriormente estimar las concentraciones mediante métodos como la técnica del NMP. Los ensayos cuantitativos proporcionan directamente resultados en forma de unidades formadoras de calvas de lisis (UFP) por unidad volumen (Adams 1959).

1.5.1.1 Detección de colifagos somáticos

En la actualidad están descritos 5 métodos estandarizados para la detección de colifagos somáticos. Dos de ellos pertenecientes a las normativas redactadas por la ISO (Anonymous 2000), otros dos redactados por la U.S. EPA (Métodos 1601 y 1602) (U.S. EPA 2001a, 2001b) y otro en los *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* de la APHA (9224B) (Green et al. 2000; Rice 2012).

Las cepas huéspedes utilizadas en los 5 métodos estandarizados son cepas *E. coli* C o derivadas. Previamente a la elección de estas cepas se observó que el uso de cepas de *E. coli* no derivadas de la cepa C proporcionan menores recuentos de colifagos somáticos (Havelaar and Hogeboom, 1983; Stetler, 1984). En el caso de los *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* la cepa utilizada es la *E. coli* C original (ATCC 13706), mientras que los métodos

descritos por las otras 2 organizaciones optaron por utilizar sus clones resistentes al ácido nalidíxico: *E. coli* CN13 en los métodos definidos por la U.S. EPA y *E. coli* WG5 (también denominada como *E. coli* CN) en el método ISO 10705-2. El motivo por el que fueron seleccionadas las cepas huéspedes resistentes al ácido nalidíxico fue para minimizar el crecimiento de la flora acompañante que interfiere frecuentemente en la visualización correcta de las calvas de lisis. La adición del ácido nalidíxico elimina la flora acompañante no resistente en el medio de análisis, permitiendo evitar un paso previo de filtración que implica el paso de las muestras a través de filtros de membrana de diámetro de poro de 0,22 µm, compuestas de algún material que no retenga proteínas como son el PVDF o la PES. Los filtros empleados requieren este material ya que en caso contrario causarían la adsorción y retención de los fagos en el filtro. Realizando ensayos con un mismo método para reducir la posible variabilidad causada por la composición del medio y condiciones de ensayo, se ha comprobado que las 3 cepas huéspedes son capaces de detectar números similares de fagos somáticos en matrices acuáticas (Grabow et al., 1993; Guzmán et al., 2008).

La normativa ISO 10705-2 (Anonymous 2000) incluye un método cualitativo basado en ensayos de presencia/ausencia (Test de la gota o “*spot test*” tras un paso previo de enriquecimiento), adaptable a resultados cuantitativos mediante la metodología del NMP (Figura 5A) y un método cuantitativo basado en el recuento de unidades formadoras de calvas (UFP) mediante método de la doble capa (DAL) (Figura 5B). Los métodos ISO pueden ser implementados en laboratorios de microbiología de análisis rutinario sin experiencia previa con el trabajo de fagos (Mooijman et al., 2005).

La U.S. EPA describe 2 protocolos diferentes para la detección de colifagos somáticos; El método 1602, que es un método cualitativo basado en ensayos de presencia/ausencia (U.S. EPA 2001b) y el método 1601 que describe un método cuantitativo para recuento de calvas basado en una única capa de agar (SAL) (U.S. EPA 2001a). Ambos métodos han sido validados mediante ensayos interlaboratorio (U.S. EPA 2003b, 2003a) y tienen disponibles versiones simplificadas (U.S. EPA 2001c).

El método descrito en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (American Public Health Association 2012) fue añadido en su 22ª edición y se basa en el recuento de calvas mediante un análisis DAL empleando la cepa *E. coli* C como cepa huésped. Además de las cepas huéspedes, existen diferencias menores en el medio empleado entre los diferentes procedimientos estandarizados, pero los métodos descritos en la APHA, U.S. EPA e

ISO para la detección de colifagos somáticos proporcionan resultados similares (Green et al. 2000; Guzmán et al. 2008).

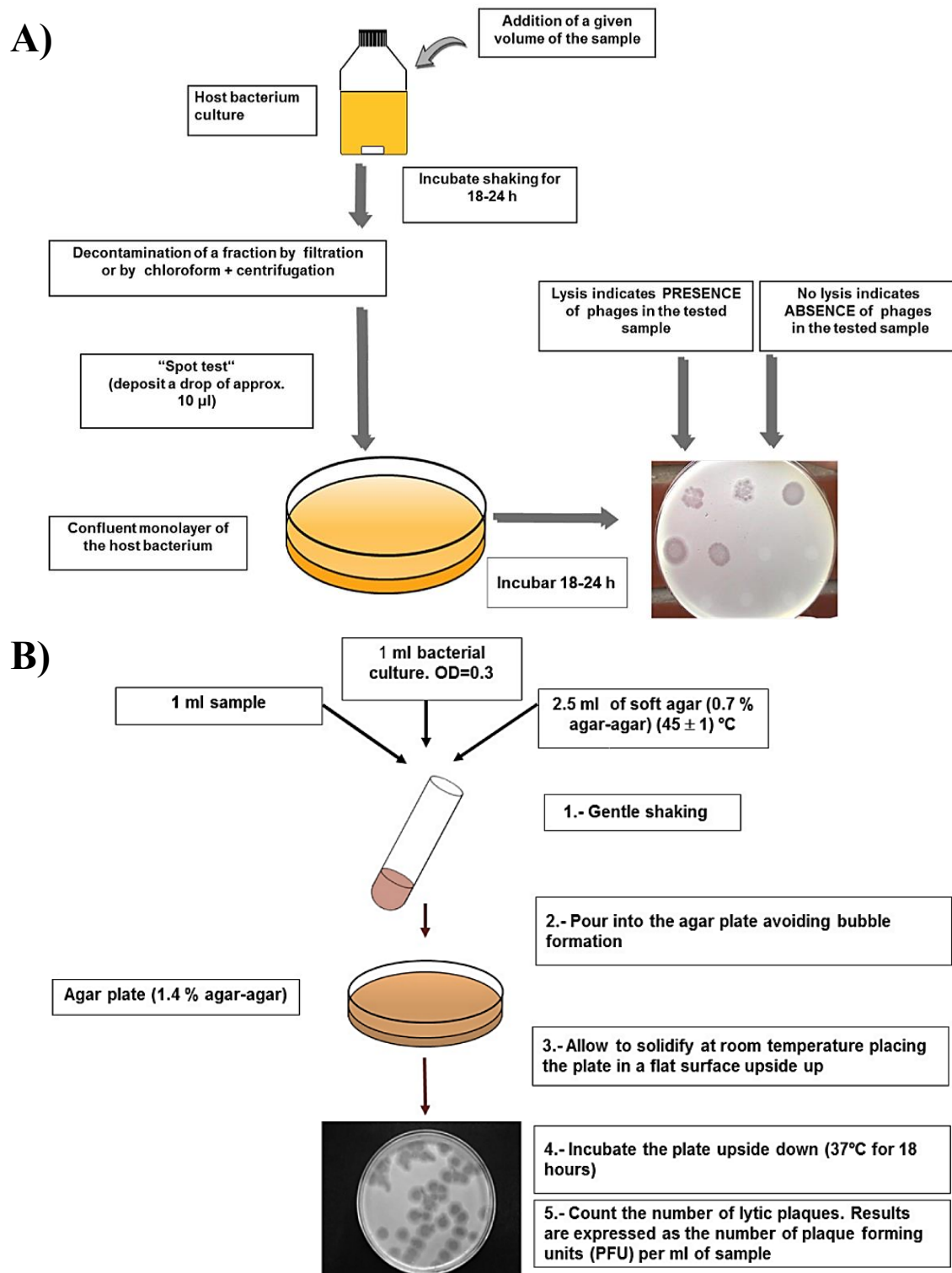


Figura 5. Esquemas representativos de los métodos recogidos en las normativas ISO para la detección de bacteriófagos **A)** Spot test tras enriquecimiento **B)** Método DAL (Jebri et al., 2017).

Los resultados de los ensayos cuantitativos de recuento de calvas pueden ser obtenidos en hasta 6 horas de incubación, pero el tiempo habitual utilizado es de 18 horas para garantizar la visualización de las calvas con una mayor certeza. Por otro lado, los ensayos cualitativos requieren de mínimo 24 horas para observar resultados. No existen referencias de materiales comerciales para ninguno de ellos, pero son métodos sencillos de preparar y económicamente rentables. Los costes de materiales, medios, reactivos y mano de obra son similares a los requeridos para la detección de coliformes fecales o *E. coli*, realizados con frecuencia en laboratorios de análisis rutinario. Además, los procedimientos de la ISO tienen pasos opcionales para laboratorios con una disponibilidad de equipo limitada e incluyen un control de calidad. El volumen de muestra utilizado en los métodos puede ser modificado a volúmenes superiores o inferiores manteniendo las proporciones de medio, cepa huésped y muestra (Jebri et al., 2017).

1.5.1.2 Detección de colifagos F-específicos

Las cepas huéspedes empleadas para detectar colifagos F-específicos deben ser capaces de producir pili sexuales, cuyos genes están codificados en el plásmido F. Inicialmente, para la detección de estos colifagos se utilizaron cepas de *E. coli* Hfr como la cepa C3000 (ATCC 15597) derivada de la cepa *E. coli* K12, que también son capaces de detectar colifagos somáticos. Más adelante se perfeccionó la técnica utilizando cepas capaces de detectar principalmente colifagos F-específicos, como *E. coli* HS/Famp (ATCC 700891) (Debartorlomeis and Cabelli 1991) y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 (NCTC 12484) (Havelaar and Hogeboom 1984), aunque ambas aún detectan una proporción muy pequeña de colifagos somáticos. Estas dos fueron las cepas elegidas para ser incluidas en los métodos estandarizados de detección de colifagos F-específicos. Ambas cepas disponen de marcadores de selección como la resistencia a la ampicilina proporcionada en el plásmido en el caso de *E. coli* HS/Famp o la capacidad de utilizar la lactosa cuando el plásmido F está presente en el caso de la cepa *S. enterica* WG49, que facilitan su estabilidad y selección (Debartorlomeis and Cabelli 1991; Havelaar and Hogeboom 1984). Los recuentos de bacteriófagos obtenidos por ambas cepas son bastante similares (Grabow et al., 1993). Como se menciona anteriormente, para el recuento de colifagos F-ARN específicos se debe realizar la diferencia entre el número de UFP de colifagos realizados en ausencia (colifagos F-totales) y presencia (colifagos F-ADN) de ARNasa en el medio de análisis. Se ha observado que entre el 90-95% de los fagos F-específicos detectados en aguas residuales son fagos F-ARN específicos, aunque

este porcentaje podría ser inferior en el caso de aguas tratadas (Havelaar and Hogeboom 1984; Debartorlomeis and Cabelli 1991).

Existen 4 métodos estandarizados para la detección y recuento de los colifagos F-específicos y el subgrupo de los colifagos F-ARN específicos. La normativa ISO 10705-1 (Anonymous 1995) incluye 2 métodos estandarizados para la detección y recuento de fagos empleando WG49 como cepa huésped. Al igual que en el caso de los colifagos somáticos, la normativa ISO incluye un método cuantitativo por DAL y un método cualitativo de presencia-ausencia adaptable al método del NMP (Figura 5). Ambos incluyen además un paso opcional de adición de ARNasa al medio para la diferenciación de subgrupos. Del mismo modo que en el caso de los colifagos somáticos, los métodos ISO pueden ser implementados en laboratorios de microbiología de análisis rutinario sin experiencia previa con el trabajo de fagos (Mooijman et al., 2005). Los métodos EPA 1601 y 1602 descritos para colifagos somáticos que emplean un método cualitativo basado en la presencia/ausencia y un método cuantitativo basado en SAL respectivamente, también se aplican para la detección de colifagos F-específicos (U.S. EPA 2001b, 2001a) usando la cepa *E. coli* HS/Famp. Ambos métodos han sido validados mediante ensayos interlaboratorio (U.S. EPA 2003b, 2003a) y tienen versiones simplificadas disponibles (U.S. EPA 2001c).

El tiempo requerido para la obtención de resultados en los métodos estandarizados cuantitativos es de 18 horas de incubación como mínimo y, en el caso de los cualitativos, 24 horas. Los costes totales de materiales, medios, reactivos y mano de obra para la detección de colifagos F-específicos son similares al coste de la detección de colifagos somáticos, pudiendo ascender hasta un 10-15% debido a la necesidad de la ARNasa y la duplicación del número de placas para el estudio diferenciado de F-totales y F-ARN. Además, los procedimientos de la ISO también tienen pasos opcionales para laboratorios con una disponibilidad de equipo limitada e incluyen un control de calidad de la cepa y el volumen de muestra utilizado en los métodos puede ser modificado a volúmenes superiores o inferiores manteniendo las proporciones de medio, cepa huésped y muestra (Jebri et al., 2017).

Además de los métodos estandarizados de cultivo, existen métodos moleculares específicos para la detección de determinados colifagos F-específicos o algunos de los subgrupos en los que se dividen. Dentro de estos métodos diferenciamos entre serológicos y genéticos. En el caso de los métodos serológicos se han descrito un método de neutralización y un método de aglutinación en látex (Love and Sobsey 2007; Furuse 1987). Este último método es rápido y aplicable *in situ*, pero requiere de enriquecimientos previos y depende en gran medida de la

accesibilidad a antisueros, que hoy en día es mucho menos práctica que la disponibilidad de sondas y cebadores para los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos. Respecto a los métodos genéticos, pueden estar basados en hibridación de calvas con sondas específicas o en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (RT-qPCR). La hibridación de las calvas obtenidas de los métodos cuantitativos estandarizados implica su transferencia a diferentes membranas y una posterior hibridación con sondas de ADN específicas para alguno de los 4 genotipos. La mayor ventaja que presentan es que permiten el estudio de múltiples calvas en un mismo ensayo (Hsu et al., 1995; Schaper and Jofre, 2000). Los ensayos de RT-qPCR han sido desarrollados fundamentalmente para la detección de MS2 (representativo del subgrupo I de F-ARN), la diferenciación entre genogrupos y ensayos para la detección simultánea de todos los subgrupos (O'Connell et al., 2006; Ogorzaly and Gantzer, 2006; Wolf et al., 2010). Esta aproximación nos permite detectar en pocas horas el número de CG (copias genómicas) presentes en una muestra de manera directa o a partir de fagos recuperados de calvas, pero no proporciona información respecto a la infectividad de los fagos. La tendencia observada es que los valores de CG detectados superen los de fagos infecciosos, pero existen ocasiones en las que no se cumple, debido a la baja eficiencia de la RT-qPCR en algunos tipos de muestras (Hata, et al., 2013). Además, esta diferencia entre CG y UFP no siempre se mantiene constante, aumentando generalmente tras tratamientos de inactivación debido a que las señales de GC en el ambiente son más resistentes.

1.5.1.3 Detección de colifagos totales

Para la detección de colifagos totales inicialmente se utilizó como cepa huésped *E. coli* K12, que es una cepa Hfr, por lo que el plásmido F está integrado en el cromosoma bacteriano en forma de episoma y, por tanto, expresa pili de forma constitutiva. Esta cepa puede también detectar colifagos somáticos, aunque detecta menos que las cepas derivadas de *E. coli* C (Rose et al. 2003). Posteriormente, se han desarrollado cepas más eficientes para la detección de colifagos totales como las cepas *E. coli* CB390 y C3000. El uso de la *E. coli* C3000 (ATCC 15597) para la detección de colifagos totales está extendido principalmente en los EE. UU., aunque también detecta una menor cantidad de colifagos somáticos que las cepas empleadas en los métodos estandarizados. La cepa *E. coli* CB390 fue desarrollada más tarde, pero es capaz de detectar ambos grupos de colifagos con números similares a la suma de los colifagos somáticos y F-específicos detectados por las cepas huéspedes empleadas en los métodos estandarizados. Su uso comenzó en España, donde fue desarrollada, pero posteriormente ha

sido validado por otros laboratorios a lo largo del mundo (Bailey et al., 2017; Guzmán et al., 2008). Los métodos utilizados en la detección de colifagos totales en la actualidad son similares a los métodos estandarizados para la detección de colifagos F-específicos. No existe un método estandarizado descrito en la actualidad que referencie de manera exclusiva los colifagos totales (Guzmán et al. 2008).

1.5.1.4 Detección de bacteriófagos que infectan a *Bacteroides*.

Para la detección de fagos de *Bacteroides*, se emplea los métodos descritos en la ISO 10705-4 que incluye un método cuantitativo basado en la técnica DAL y un método cualitativo para determinar presencia/ausencia (Anonymous 2001) (Figura 5). Son métodos similares a los descritos para colifagos, pero difieren fundamentalmente en el requerimiento anaeróbico de crecimiento de *Bacteroides* que hace que se requieran tiempos superiores de incubación. Además, los costes de material, medios, reactivos y mano de obra son similares a los de la detección de colifagos, pero requieren un gasto un 10-15% superior como consecuencia del requerimiento de condiciones anaeróbicas.

1.5.2 **Métodos de detección rápida de bacteriófagos**

Con la inclusión de los bacteriófagos como parámetros microbiológicos en normativas, regulaciones y guías de aguas a nivel global (Tabla 7), la necesidad de disponer de métodos de detección rápida, idealmente en forma de kits sencillos y fáciles de utilizar para los usuarios, ha aumentado en la actualidad (Blanch et al., 2020). Se diferencian principalmente cuatro aproximaciones empleadas para el desarrollo de métodos rápidos de detección de colifagos:

1.5.2.1 Mejoras en el proceso de detección de calvas

En cuanto a la optimización del proceso de detección de calvas de lisis, existen dos alternativas, buscar mejoras en la composición del medio o realizar cambios en el procedimiento que permitan una detección más rápida. En cuanto a la composición del medio, el objetivo principal es mejorar el tamaño y la nitidez de las calvas, ya que algunas son pequeñas, turbias y difíciles de ver. Se han empleado diversas técnicas como la tinción del césped bacteriano con diversos compuestos, el uso de antibióticos para aumentar el tamaño y claridad de éstas o la adición de componentes adicionales como el glicerol. Sin embargo, la respuesta a estas modificaciones no

es uniforme entre los diferentes bacteriófagos, no reducen el tiempo ni producen un mayor número de calvas (aunque a veces se cuentan más porque se visualizan mejor), por lo que su efecto es incierto (Hurst et al., 1994; McLaughlin and Balaa, 2006; Santos et al., 2009). En relación con los cambios en el procedimiento, se ha buscado mejorar de la eficacia y manejo de la técnica DAL, facilitando la extensión de calvas o aumentando su contraste respecto al medio (Cormier and Janes, 2014; Mazzocco et al., 2009). Aunque estos métodos son sencillos y baratos, carecen de precisión y son útiles solo para un recuento preliminar aproximado sin proveer ninguna mejora sustancial en la facilidad de uso, duración o límite de detección respecto a los métodos estandarizados. Otras aproximaciones como las propuestas de Easyphage (Fung et al., 2007) y Quantiphage (Rames and Macdonald 2019), que incorporan soportes no basados en agar para los ensayos de recuentos de calvas con componentes preparados previamente, proporcionan resultados mucho más interesantes en cuanto a las mejoras que conllevan respecto a su velocidad y facilidad de uso.

1.5.2.2 Detección de la lisis en cultivos líquidos del huésped

Las mejoras conseguidas mediante la detección de la lisis en cultivos líquidos de huéspedes infectados se enfocan en dos campos: La monitorización de cambios en la densidad óptica de un cultivo y la detección de la actividad enzimática de enzimas liberadas por las células durante el proceso infectivo. En relación con los cambios en la densidad óptica, recientemente se ha descrito un método basado en el análisis de la cinética observada a DO_{650nm} de cultivos bacterianos expuestos a un bacteriófago específico (Rajnovic et al., 2019). Este método es rápido, pero tienen un límite de detección considerablemente superior a los métodos estandarizados y actualmente solo está disponible para el bacteriófago T4, por lo que necesita ser evaluado para mezclas de colifagos y suspensiones de fagos naturales. Los métodos basados en la detección de enzimas liberadas por la lisis bacteriana tienen mayor relevancia y existen varias aproximaciones diferentes en función de la enzima detectada. Las principales enzimas detectadas en estos métodos son la β -galactosidasa, la adenilato quinasa y la β -glucuronidasa. Todos estos métodos de detección de actividad enzimática son métodos cualitativos que pueden ser adaptados a un formato cuantitativo mediante la aproximación NMP si fuera necesario. Dentro de los métodos de detección de la β -galactosidasa, hace décadas que fue descrito el primero de los métodos para la detección de lisis celular por infección de bacteriófagos en un cultivo líquido basado en la detección de la actividad de una enzima intracelular (Ijzerman, 1993). Posteriormente, otros métodos han perfeccionado la detección basada en la β -

galactosidasa como el método Fast Phage (Salter et al., 2010). Respecto a los métodos basados en la detección de fagos midiendo la liberación de adenilato quinasa durante la lisis, éstos se aprovechan de la liberación de ATP generada y su conversión en energía lumínica mediante la enzima luciferasa. El protocolo fue evaluado empleando *E. coli* WG5 con el bacteriófago de referencia somático ϕ X174 (Guzmán et al., 2009). Otra posible enzima que se puede detectar en la lisis mediada por bacteriófagos es la β -glucuronidasa. El método descrito y desarrollado en esta tesis se incluye dentro de esta categoría.

1.5.2.3 Métodos moleculares

Dentro de los métodos moleculares, existen tanto técnicas serológicas como basadas en la PCR. Se aplican directamente sobre las partículas virales de la muestra, pero no distinguen entre partículas fágicas infectivas y no infectivas de manera directa. La alta heterogeneidad de los colifagos somáticos dificulta la aplicación de esta clase de métodos específicos para su detección (Muniesa et al., 1999) por la imposibilidad de encontrar cebadores que detecte todos los grupos, pero existen múltiples aproximaciones para la detección de colifagos F-específicos, un grupo más homogéneo, especialmente útiles en las aplicaciones de MST (Jofre et al., 2011).

1.5.2.4 Sensores microelectrónicos

Por último, se han desarrollado sensores microelectrónicos para la detección de virus (incluidos bacteriófagos y colifagos) basados en la detección de partículas virales o la lisis del huésped causada por la infección (Chaturvedi et al., 2016; García-Aljaro et al., 2009; Łoś et al., 2008; Zago et al., 2012). Estas técnicas proporcionan resultados con mucha rapidez, pero no tienen, por el momento, la precisión y sensibilidad de los métodos tradicionales, lo cual limita su posible aplicación. Además, requieren de equipamiento altamente sofisticado y suelen ser difíciles de realizar, proporcionando resultados cuyo análisis e interpretación es difícil.

En resumen, aunque los métodos estandarizados se pueden emplear en laboratorios de análisis rutinario, requieren de una previa preparación de materiales de referencia, stocks de bacterias huéspedes y múltiples pasos durante el análisis. Estos requerimientos pueden resultar engorrosos y crear una cierta complejidad operacional, requiriendo más tiempo del establecido en una jornada laboral para obtener los resultados. Los kits comerciales en desarrollo, que se basan en la lisis de bacterias huéspedes mediante fagos y la liberación de un compuesto enzimático, proporcionan resultados tan rápidos como los métodos moleculares debido al corto

tiempo necesario para el ciclo de replicación del fago, causando la lisis de un alto número de bacterias huéspedes en unas pocas horas, informando además de la presencia de fagos infecciosos en la muestra. Estos kits comerciales son los más prometedores para la optimización de la metodología tradicional, que facilitarían por tanto el uso como indicadores de los colifagos. Entre estas alternativas prometedoras se encuentra el método *Bluephage*, cuyas características, desarrollo y aplicación se describen en este trabajo de tesis. En la discusión se describirán también más en detalle las características de todos estos métodos rápidos disponibles en la actualidad y se comparan con el método desarrollado en esta tesis.



2. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el desarrollo de un método, basado en técnicas de cultivo para la detección de colifagos como microorganismos indicadores de contaminación fecal, que sea rápido, sencillo, económicamente rentable y adaptable a diferentes condiciones. Dicho método ha sido denominado *Bluephage*. De este objetivo general derivan los objetivos específicos planteados durante el desarrollo de esta tesis, que son los siguientes:

- Desarrollar un método colorimétrico sencillo y barato, capaz de detectar de manera rápida la presencia de colifagos somáticos, F-específicos o totales en bajas concentraciones y que sea realizable dentro del horario de una jornada laboral (Artículos 1, 4 y 5).
- Diseñar y desarrollar cepas modificadas genéticamente para ser empleadas en este nuevo método. La modificación de estas cepas se basa en la sobreexpresión de la enzima β -glucuronidasa y la inhibición de la entrada del sustrato dentro de la célula bacteriana, de manera que dicha enzima intracelular solamente pueda ser liberada e interactuar con su sustrato cromógeno tras el proceso de lisis celular causado por la infección de colifagos somáticos, F-específicos o totales (Artículo 1, 4 y 5).
- Comparar que las nuevas cepas modificadas genéticamente para el método *Bluephage* mantienen la misma capacidad de detección de colifagos que las cepas huéspedes originales usadas por los métodos estandarizados (Artículos 1, 2, 4 y 5).
- Adaptar el método *Bluephage* a diferentes volúmenes de muestra, desde 0.1 ml a 100 ml, a diferentes tipos de muestras de aguas y alimentos y evaluar su adaptación como método cuantitativo mediante la aplicación de la técnica del Número Más Probable (NMP) (Artículos 1, 2, 4 y 5).
- Mejorar las técnicas tradicionales de detección de bacteriófagos somáticos y F-específicos, reduciendo los costes y el tiempo de análisis, mediante modificaciones en el medio de cultivo empleado y/o en el procedimiento de análisis (Artículos 3 y 5).



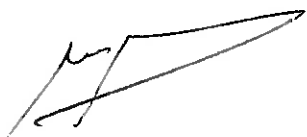
3. INFORMES

3.1 Informe sobre el factor de impacto

Los artículos que constituyen la memoria de esta de tesis doctoral han sido publicados en revistas científicas internacionales indexadas en **Journal Citation Reports**, relevantes en la línea de investigación que se ha desarrollado y cuatro de ellas pertenecen al primer cuartil (Q1) de sus campos de estudio.

- El artículo “*Bluephage: A rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water*” fue publicado en el año 2018 en la revista **Water Research** (DOI: 10.1016/j.watres.2017.10.030). Dicha revista se encuentra en el primer decil (D1) y primer cuartil (Q1) en todas sus categorías (*Water Resources, Environmental Sciences y Environmental Engineering*) y tiene un factor de impacto en 2018 de 7,913.
- El artículo “*Bluephage, a method for efficient detection of somatic coliphages in one hundred milliliter water samples*” fue publicado en el año 2020 en la revista **Scientific Reports** (DOI: 10.1038/s41598-020-60071-w). Dicha revista se encuentra en el primer cuartil (Q1) en su categoría (*Multidisciplinary Sciences*) y presenta un factor de impacto en 2019 de 3,998.
- El artículo “*Evaluation of New Components in Modified Scholten’s Medium for the Detection of Somatic Coliphages*” fue publicado en el año 2020 en la revista **Food and Environmental Virology** (DOI: 10.1007/s12560-020-09419-z). Dicha revista se encuentra en el segundo cuartil (Q2) en la categoría de *Environmental Sciences* y en el tercer cuartil (Q3) de las categorías de *Microbiology* y *Virology* y presenta un factor de impacto en 2019 de 2,819.
- El artículo “*New approach for the simultaneous detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages as indicators of fecal pollution*” ha sido publicado en 2019 en la revista **Science of the Total Environment** (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.198). Dicha revista se encuentra en el primer decil (D1) y primer cuartil (Q1) en la categoría de *Environmental Sciences*. presenta un factor de impacto en 2019 de 6,551.
- El artículo “*F-specific coliphage detection by the Bluephage method*” fue publicado en el año 2020 en la revista **Water Research** (DOI: 10.1016/j.watres.2020.116215). Dicha

revista se encuentra en el primer decil (D1) y primer cuartil (Q1) en todas sus categorías (*Water Resources, Environmental Sciences* y *Environmental Engineering*) y tiene un factor de impacto en 2019 de 9,130.



Dr. Anicet Blanch Gisbert



Dra. Mª Teresa Muniesa Pérez

Barcelona, abril de 2021

3.2 Informe de participación en las publicaciones

El doctorando Daniel Toribio Avedillo ha participado en todas las publicaciones que forman parte de su tesis de la manera que se detalla a continuación. Ninguno de los coautores de los artículos ha utilizado los datos y las publicaciones para la elaboración de su tesis doctoral.

- Muniesa M, Ballesté E, Imamovic L, Pascual-Benito M, **Toribio-Avedillo D**, Lucena F, Blanch AR, Jofre J. *Bluephage*: A rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water. *Water Res.* 2018 Jan 1; 128:10-19. doi: 10.1016/j.watres.2017.10.030. Epub 2017 Oct 16. PMID: 29078067.

El doctorando ha contribuido en el análisis de los resultados obtenidos y ha colaborado en la redacción del artículo y su revisión.

- Méndez J, **Toribio-Avedillo D**, Mangas-Casas R, Martínez-González J. *Bluephage*, a method for efficient detection of somatic coliphages in one hundred milliliter water samples. *Sci Rep.* 2020 Feb 19; 10(1):2977. doi: 10.1038/s41598-020-60071-w. PMID: 32076096; PMCID: PMC7031265.

El doctorando ha contribuido en el diseño de la investigación realizada, en el análisis de los resultados obtenidos y ha colaborado en la redacción del artículo.

- **Toribio-Avedillo D**, Méndez J, Muniesa M, Blanch AR. Evaluation of New Components in Modified Scholten's Medium for the Detection of Somatic Coliphages. *Food Environ Virol.* 2020 Jun; 12(2):148-157. doi: 10.1007/s12560-020-09419-z. Epub 2020 Jan 31. PMID: 32006190.

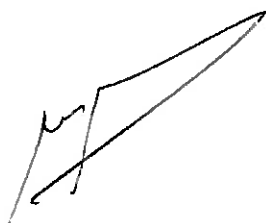
El doctorando ha participado activamente en el diseño experimental del estudio y ha llevado a cabo la investigación detallada en el mismo. También ha realizado el análisis de los resultados obtenidos, su organización y discusión, liderando la redacción del artículo.

- **Toribio-Avedillo D**, Martín-Díaz J, Jofre J, Blanch AR, Muniesa M. New approach for the simultaneous detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages as indicators of fecal pollution. *Sci Total Environ.* 2019 Mar 10; 655:263-272. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.198. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30471594.

El doctorando ha participado activamente en el diseño experimental del estudio y ha llevado a cabo la mayor parte de la investigación detallada en el mismo. También ha realizado el análisis de los resultados obtenidos, su organización y discusión y ha realizado la redacción de la primera versión del artículo.

- **Toribio-Avedillo D**, Martín-Díaz J, Blanco-Picazo P, Blanch AR, Muniesa M. F-specific coliphage detection by the *Bluephage* method. Water Res. 2020 Jul 21; 184:116215. doi: 10.1016/j.watres.2020.116215. Epub ahead of print. PMID: 32726738.

El doctorando ha participado activamente en el diseño experimental del estudio y ha llevado a cabo la mayor parte de la investigación detallada en el mismo. También ha realizado el análisis de los resultados obtenidos, su organización y discusión, liderando la redacción del artículo.



Dr. Anicet Blanch Gisbert



Dra. Mª Teresa Muniesa Pérez

Barcelona, abril de 2021



4. ARTÍCULOS

4.1 Artículo 1:

***Bluephage*: Un método rápido para la detección de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal en aguas**

M. Muniesa, E. Ballesté, L. Imamovic, M. Pascual-Benito, **D. Toribio-Avedillo**, F. Lucena, A.R. Blanch, J. Jofre

Water Research (2018); 128:10-19. DOI: 10.1016/j.watres.2017.10.030.

Introducción

La contaminación fecal en aguas y alimentos es un problema global relevante (LeChevallier and Kwok-Keung 2004). Tradicionalmente, para su monitorización se han empleado microorganismos bacterianos como indicadores de contaminación fecal, pero existen dudas respecto a su eficacia para representar a grupos de microorganismos no bacterianos, como virus o protozoos. Estos grupos se comportan en las diversas matrices de manera diferente a las bacterias, generalmente mostrando una mayor persistencia que éstas (Borchardt et al., 2004; Gerba et al., 1979; Payment et al., 1997). Por ello, existe un consenso en la opinión de que tanto los virus como los protozoos no están debidamente representados por los indicadores bacterianos y que se requiere el uso de otros indicadores adicionales.

Como consecuencia, diversos grupos de indicadores de contaminación fecal vírica han sido planteados como alternativas en aguas. Entre ellos, los bacteriófagos que infectan a bacterias entéricas como *E. coli* (colifagos) han sido estudiados y presentan un gran potencial (Armon and Kott, 1996; Bosch et al., 1991; Grabow, 2001; Jofre, 2007). Los colifagos somáticos, aquellos que infectan *E. coli* a través de la pared celular bacteriana, son los más abundantes en muestras contaminadas fecalmente (IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991). Actualmente, existen métodos rápidos, baratos y robustos para su detección. Diversas normativas y autoridades reguladoras han optado recientemente por la inclusión de colifagos somáticos como indicadores fecales en aguas (North Carolina Administration 2011; Republica de Colombia 2014; Western Australian Government 2012; U.S. EPA 2015, 2016). En el momento de la realización del artículo, en la Unión Europea (The European Parliament and the Council of the European Union 2020b, 2020a) se estaba estudiando su aplicación en normativas de aguas de baño y recreacionales y en aguas

reutilizadas respectivamente. Tras la publicación de este artículo, ambas directivas incluyendo los colifagos como parámetros microbiológicos han sido ya aprobadas.

Se prevé que la aceptación e inclusión de los colifagos en diversas normativas requerirá el desarrollo de métodos simples y rápidos para su detección, ya que los métodos empleados actualmente requieren de un tiempo elevado, inconveniente importante para los laboratorios de análisis rutinarios que suelen necesitar resultados con rapidez, preferiblemente en un mismo día. Por ello, en este estudio se ha desarrollado una nueva metodología denominada *Bluephage*, que permite la detección de colifagos de manera sencilla dentro de una jornada laboral

Objetivos

Para este estudio se han planteado los objetivos detallados a continuación:

- Diseñar una metodología rápida que permita la detección de colifagos somáticos en muestras con altas o bajas concentraciones de colifagos, generando el menor número posible de falsos negativos.
- Desarrollar una nueva cepa huésped derivada de la cepa empleada en las normativas ISO capaz de detectar colifagos somáticos mediante la nueva metodología.
- Ensayar la cepa y el método en diferentes muestras, tanto de laboratorio como ambientales, para demostrar la capacidad de detección de fagos de la nueva cepa y comparar ambas metodologías, la tradicional y la nueva.
- Demostrar la aplicabilidad del método y de la cepa en ensayos cuantitativos usando la técnica del Número Más Probable (NMP).
- Valorar la aplicabilidad de la metodología y la cepa empleada en ella en diferentes volúmenes de muestra.

Resultados

La metodología diseñada (que se ha denominado *Bluephage*) se basa en la detección colorimétrica de la presencia de colifagos. La metodología emplea la enzima β -glucuronidasa y análogos cromógenos de su sustrato (el ácido glucurónico), como el X-glucurónido. Todo este método es posible gracias a la modificación mediante ingeniería genética de una cepa huésped para la detección de los fagos.

La cepa desarrollada se denominó *E. coli* CB10 y deriva de la cepa *E. coli* WG5, capaz de detectar colifagos somáticos y que es empleada como cepa huésped en la normativa ISO 10705-2. Se diseñaron dos modificaciones genéticas en la cepa WG5: Una de ellas se basa en la delección de los genes que codifican los transportadores del sustrato al interior celular, impidiendo así la entrada del sustrato y, por tanto, limitando la interacción entre la enzima y sustrato. La otra modificación es una sobreexpresión de la enzima incorporada a fin de amplificar la respuesta. Gracias a la actuación conjunta de ambas, la enzima solo entraría en contacto con el sustrato tras el proceso de lisis celular, como la causada por la presencia de fagos, gracias a la cual se produciría la liberación de la enzima al medio. En ese caso la enzima sobreexpresada se liberaría al medio, entrando en contacto con el sustrato que, al ser degradado, liberaría el cromógeno asociado, causando un cambio de color en el medio y revelando la presencia de fagos en la muestra.

La primera de las modificaciones fue la sustitución de los genes que codifican para los transportadores de ácido glucurónico al interior celular (*uidB* y *uidC*) por un casete que confiere resistencia a tetraciclina (*tetR*). Siguiendo el esquema recogido en la figura 1 de la publicación, se consiguió un fragmento híbrido con el gen *tetR* flanqueado por regiones parciales de los genes *uidB* y *uidC*. Dicho casete se introdujo mediante recombinación homóloga en el genoma de las células sustituyendo los genes del cromosoma bacteriano por el fragmento diseñado. Esta modificación es seleccionable en los clones por la resistencia a tetraciclina que confirma una inserción correcta del mismo.

La segunda modificación genética realizada fue la sobreexpresión del gen *uidA*, que codifica la enzima β -glucuronidasa. Esta modificación mejora la velocidad del cambio de color al aumentar el número de centros activos disponibles para la catálisis de la reacción. La sobreexpresión fue lograda debido a la inserción del gen *uidA* en un plásmido pBAD bajo un promotor de expresión regulado por la presencia de arabinosa. Esta modificación es seleccionable en los clones por la resistencia a ampicilina.

Antes de proceder al análisis de muestras ambientales, se evaluó la actividad de la cepa CB10 en presencia del sustrato realizando un ensayo colorimétrico comparativo entre las diferentes cepas como se muestra en la Figura 2 del artículo. La cepa CB10, al carecer de los transportadores *uidB* y *uidC*, no permite la entrada del sustrato al interior celular y, por lo tanto, no causa cambios en el color del medio en ausencia de agentes que causen su lisis.

Las modificaciones genéticas realizadas en la cepa CB10 no afectan a su capacidad de detección de colifagos somáticos. Para comprobarlo, se llevaron a cabo ensayos comparativos entre las cepas WG5 y CB10 empleando el método de la doble capa de agar (DAL) descrito en la ISO 10705-2. Los recuentos de colifagos obtenidos con ambas cepas no presentaron diferencias significativas entre sí. Por tanto, la cepa desarrollada es tan eficiente como la cepa original en la detección de colifagos somáticos.

Con la cepa de *E. coli* CB10 se procedió a realizar ensayos en la metodología *Bluephage* empleando el medio BTM (*Bluephage Test Medium*), compuesto por MSB y otros componentes adicionales para el ensayo, al cual se añaden la cepa huésped CB10 y la muestra por analizar. Estos tubos se incuban estáticamente a una temperatura de 37°C, monitorizando a lo largo del tiempo el cambio de color que sucede en el medio. El ensayo termina cuando el control negativo sin fagos cambia de color, por lisis espontánea de las células, lo cual nunca ocurre antes de las 7 horas de incubación. En este estudio se analizaron 5 muestras de agua residual, 2 muestras de agua de río, 3 muestras de lodos de depuradora y 2 muestras de mejillones comerciales. Para todas ellas se realizaron bancos de diluciones en tubo de manera que se mantuvieran concentraciones estimadas de fagos de en torno a 500, 50, 5 y 1 UFP/tubo, como se muestra en la Figura 3 del artículo. Se observaron los cambios de color hacia azul a partir de las 1:30 h para las concentraciones más elevadas y a partir de las 2:15 h para las de menor concentración tardando como máximo 4:30 h en observar un cambio de color en las muestras de 1 UFP/tubo. Para comprobar la sensibilidad y especificidad del método, al final de cada ensayo se realizaron test de la gota (*spot test*) con el sobrenadante de los cultivos. El objetivo de esta prueba era verificar que los cambios de color se correspondían con la presencia de fagos en la muestra y que los negativos observados se correspondían con la ausencia de fagos. Los resultados de presencia/ausencia observados por el método *Bluephage* y el test de la gota fueron idénticos, verificando la ausencia de falsos positivos y falsos negativos en las muestras analizadas.

Los resultados del test de la gota también fueron aplicados a la técnica del Número Más Probable (NMP) para obtener estimaciones cuantitativas de las concentraciones de fagos en los tubos ensayados. Los valores de las concentraciones de los fagos en los tubos positivos y los valores de NMP estimados de sus correspondientes *spot test* fueron comparados entre sí, demostrando que no había diferencias significativas entre ellos (Figura 4).

La variación de la eficiencia del método frente a la temperatura de incubación fue valorada mediante ensayos *Bluephage* a diferentes temperaturas. Los ensayos a las temperaturas de 37°C y 44°C proporcionaron resultados similares, pero, en contraste, a temperaturas de 20°C y 25°C

requirieron tiempos superiores de hasta 5 h de incubación para que el cambio de color tuviera lugar, incluso en muestras de concentraciones elevadas (500 UFP/tubo).

Se realizaron ensayos *Bluephage* con diferentes volúmenes de muestra para demostrar la adaptabilidad del método. Para la adaptación a volúmenes superiores se analizaron 50 ml de muestras conteniendo entre 10 – 500 UFP/l, obteniéndose resultados positivos en tiempos de hasta 1:30 h de incubación. En los ensayos de adaptación a volúmenes inferiores se emplearon microplacas con muestras de concentraciones entre 100, 10 y 1 UFP/pocillo, observándose los cambios colorimétricos entre las 1:30 - 3:30 h de incubación.

Discusión

Los métodos de detección cualitativos y cuantitativos recogidos en las normativas ISO y U.S. EPA para colifagos somáticos proporcionan resultados robustos. No obstante, requieren de al menos 6 horas de incubación para obtener resultados (siendo recomendadas 18 horas) y 2 horas de crecimiento previo de la bacteria huésped. Para resolver este problema, se han desarrollado nuevos protocolos buscando reducir este tiempo de ensayo. Un ejemplo es el protocolo descrito por Ijzerman et al., 1993, basado en la detección de la β -galactosidasa extracelular. Este método se basa en la detección enzimática consecuencia de la lisis celular, pero produce muchos falsos positivos y requiere largos tiempos de incubación cuando la cantidad de fagos es baja. Otro ejemplo es el método descrito por Guzmán et al., 2009 basado en la detección bioluminiscente del ATP. Es eficiente, pero requiere de equipamiento de laboratorio que no siempre está disponible en laboratorios de análisis. El método *Bluephage* supone una alternativa efectiva y económica que soluciona multitud de los problemas que presentan los métodos anteriores.

El método *Bluephage* se aprovecha de la sobreexpresión de una enzima que no es liberada al medio hasta la lisis celular y la incapacidad de importación del sustrato por parte de la cepa. Estos hechos garantizan que el contacto entre la enzima, acumulada intracelularmente, y su sustrato, de origen extracelular, no se producirá en ausencia de lisis de la bacteria huésped. Esta separación entre ambos supone una gran ayuda para evitar problemas como los falsos positivos. La tendencia general es que las concentraciones más elevadas de colifagos producen un cambio de color más rápido que las concentraciones más bajas, pero se han observado excepciones durante los ensayos realizados con muestras ambientales especialmente para muestras de concentraciones más bajas. Se han planteado dos posibles causas para esta variabilidad en el tiempo de viraje: La variabilidad generada por la posibilidad estocástica de inocular un único

fago entre los diferentes tubos, sobre todo cuando se tratan muestras con bajas concentraciones de fagos, y a la heterogeneidad del grupo de los colifagos somáticos presentes en diferentes muestras, al estar este grupo formado por diferentes familias de bacteriófagos con diferentes tiempos de replicación y tamaños de explosión, que hace que sus comportamientos podrían ser potencialmente diferentes.

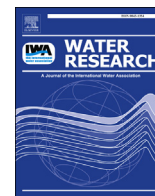
Considerando que el tiempo de incubación inicial para el crecimiento de la cepa huésped hasta la fase exponencial es 2 h y que el tiempo del ensayo para la detección de 1 colifago somático es aproximadamente 3,5 h, el tiempo de duración total del ensayo alcanzaría las 5,5 h. Esto se encuentra dentro de los límites de una jornada laboral y proporciona los resultados con mayor rapidez que otros métodos. Además, el método *Bluephage* tiene un porcentaje muy bajo de falsos positivos y requiere de un equipamiento mínimo de laboratorio para su realización. No obstante, la aparición de falsos positivos con este método podría suceder en presencia de otros agentes líticos, altas concentraciones de la enzima en la muestra u otras bacterias productoras de dicha enzima en muestras altamente contaminadas. Es por ello por lo que antes de la aplicación del método se recomienda realizar una filtración previa de las muestras por membranas de 0,22 µm de baja adsorción proteica, recomendada en las normativas ISO. Dicho paso de filtración no es obligatorio para el método, pero garantiza una mayor fiabilidad.

El método *Bluephage* es aplicable a diferentes grupos de muestras y en diferentes volúmenes de muestra y tiene una sensibilidad equivalente a del método estandarizado recogido en las normativas ISO, ya que *Bluephage* emplea una cepa (CB10) con una capacidad de detección similar a la cepa huésped empleada en las ISO (WG5). Por su rapidez, es una alternativa ventajosa frente a los métodos tradicionales en situaciones donde se requieran resultados en el mismo día de muestreo. Algunos ejemplos son: la provisión de agua de consumo segura, el seguimiento de brotes de origen acuático, la evaluación de la calidad de aguas recreacionales o la monitorización de la calidad del agua en plantas de tratamiento, desinfección o de producción alimentaria. El método *Bluephage* es una alternativa robusta y simple a las metodologías estandarizadas actuales, pero existen aún posibles campos de estudio para la mejora del método como el cambio a una detección fluorogénica, la liofilización de las cepas huéspedes o la adaptación de la metodología a sistemas online para una automatización del proceso.

Conclusiones

- La inclusión progresiva de los colifagos como indicadores de contaminación fecal en nuevas normativas requerirá de la introducción de métodos rápidos para su detección. *Bluephage* es una alternativa rápida, eficiente y robusta.
- El método *Bluephage* detecta hasta 1 colifago somático en 3,5 h de incubación.
- El método *Bluephage* es aplicable a nivel cualitativo, cuantitativo, en diversos volúmenes y diferentes tipos de muestras.
- Actualmente es el método más rápido para la detección de contaminación fecal mediante la detección de microorganismos de contaminación fecal cultivables.

(Nota: Los medios, tampones, protocolos, plásmidos y cebadores empleados en este artículo se encuentran descritos en los Anexos 2-5.)



Bluephage: A rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water



M. Muniesa^{*}, E. Ballesté, L. Imamovic, M. Pascual-Benito, D. Toribio-Avedillo, F. Lucena, A.R. Blanch, J. Jofre

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Microbiology Section, Faculty of Biology, University of Barcelona, Diagonal 643, E-08028, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2017
Received in revised form
9 October 2017
Accepted 14 October 2017
Available online 16 October 2017

Keywords:

Indicator
Fecal pollution
Coliphages
Virus
New tools

ABSTRACT

The use of somatic coliphages as indicators of fecal and viral pollution in water and food has great potential due to the reliability, reproducibility, speed and cost effectiveness of methods for their detection. Indeed, several countries already use this approach in their water management policies. Although standardized protocols for somatic coliphage detection are available, user-friendly commercial kits would facilitate their routine implementation in laboratories. The new method presented here allows detection of up to 1 somatic coliphage in under 3.5 h, well within one working day. The method is based on a modified *Escherichia coli* strain with knocked-out *uidB* and *uidC* genes, which encode the transport of glucuronic acid inside cells, and overexpressing *uidA*, which encodes the enzyme β -glucuronidase. The enzyme accumulated in the bacterial cells only has contact with its substrate after cell lysis, such as that caused by phages, since the strain cannot internalize the substrate. When the enzyme is released into the medium, which contains a chromogen analogous to glucuronic acid, it produces a change of color from yellow to dark blue. This microbiological method for the determination of fecal pollution via the detection of culturable microorganisms can be applied to diverse sample types and volumes for qualitative (presence/absence) and quantitative analysis and is the fastest reported to date.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fecal water pollution is an important cause of pathogen transmission and is associated with several thousand human mortalities per day around the world (LeChevallier and Kwok-Keung, 2004). The indicators most commonly used to determine fecal pollution levels in different water sources are bacterial, but fecal-contaminated water also contains viral and protozoan pathogens. This has raised doubts within the water microbiology community concerning the capacity of bacterial indicators to measure water quality and predict waterborne viral disease hazards (Borchardt et al., 2004; Gerba et al., 1979; Grabow, 2001; Keswick et al., 1984; Payment et al., 1997). Therefore, additional indicators are advisable to predict the presence and behavior of viruses in water.

Several groups of bacteriophages have been proposed as indicator microorganisms to assess fecal and viral contamination of

water. The potential value of different groups of phages that infect enteric bacteria as quality indicators in water, biosolids and food has been studied in depth and reviewed (Armon and Kott, 1996; Bosch et al., 2001; Goyal, 2006; Grabow, 2001; Hsu et al., 2002; IAWPRC Study group on health related water microbiology, 1991; Jofre, 2007). One of these bacteriophage groups are somatic coliphages, which replicate in *Escherichia coli* after infection through the cell wall (IAWPRC Study group on health related water microbiology, 1991). Somatic coliphages are abundant in fecally contaminated samples, and there are standardized methods for their detection and quantification (Anonymous, 2000; U.S. EPA, 2001a; 2001b). The standardized ISO and U.S. EPA methods are faster than the tests to identify bacterial indicators, easy to perform, cost effective and reasonably robust (Mooijman et al., 2005; U.S. EPA, 2003a; 2003b). However, current methods are still multi-step processes that require several media and operations and more than 8 h (that is, more than one ordinary working day) to yield results.

Although the use of somatic coliphages as fecal indicators was proposed years ago (IAWPRC Study group on health related water

^{*} Corresponding author.

E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

microbiology, 1991), they have only recently been included in water and sludge quality guidelines: for example, those affecting water reclamation (North Carolina Administration, 2011; Queensland Government, 2005), groundwater (NHMRC and NRMCC, 2011; U.S. EPA, 2006), biosolids applied in agriculture (Republica de Colombia, 2014; Western Australian Government, 2012) and aquaculture practices (Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015). Additionally, the U.S. regulatory authorities (U.S. EPA, 2016; U.S. EPA, 2015) are currently studying the application of coliphages in the quality control of bathing and recreational surface water. As the use of somatic coliphages expands, simpler and faster detection methods will be required. The availability of straightforward ready-to-use tests would facilitate routine implementation of the methods in laboratories and encourage their adoption in guidelines for water, biosolids and food quality management. Unfortunately, the use of molecular techniques such as PCR, which would provide a rapid detection, is not possible, because somatic coliphages are a heterogeneous group belonging to different phage families (Muniesa et al., 1999) that do not share common DNA sequences.

Among various approaches to devise such a method, some are based on the measurement of the phage-mediated release of intracellular molecules, such as the intracellular enzyme β -galactosidase (Ijzerman et al., 1994, 1993; Salter and Durbin, 2012) or adenylate kinase (Guzmán-Luna et al., 2009). However, this approach has certain drawbacks that still need to be resolved, including long incubation times when the phage density is low or frequent false positive results. The present study reports further progress in this field with a method based on an engineered host bacterium.

Herein we describe a somatic coliphage detection method based on a modified *E. coli* host strain. The modification is located in a genetic operon specific for *E. coli*: the β -glucuronidase system. An assay based on β -glucuronidase has already been applied to detect *E. coli* in agar plates (e.g., Chromocult[®] Merck Laboratories, Darmstadt, Germany) or liquid media (Colilert[®], IDEXX Laboratories, Inc. Maine, US), and has been approved by some food management agencies for drinking water and processed food samples (Anonymous, 2001). The media contain the substrate X-glucuronide, which is cleaved by β -D-glucuronidase, a characteristic enzyme of *E. coli*. *E. coli* grown in this media develop a dark blue coloration or fluorescence (Frampton et al., 1988; Kilian and Bülow, 1976).

The β -glucuronidase system in *E. coli* is composed of several genes (Liang et al., 2005). For our purpose, we focused on the *uidA*, *uidB* and *uidC* genes that encode the UidA, B and C proteins. UidA is the active subunit: an intracellular acid glucuronoside glucuronosohydrolase with broad substrate specificity (Novel and Novel, 1976). UidB, which is located in the inner membrane, is a proton-dependent transporter specifically for importing α - and β -glucuronides into the cell, making it essential for glucuronide transport. UidC, which is associated with the outer membrane, does not confer transport activity, but it improves the efficiency of transport by UidB through an unknown mechanism (Liang et al., 2005). β -glucuronide molecules are imported by the activity of UidC and UidB and once inside the cell are cleaved by UidA (Novel and Novel, 1976).

The objective of this work was to develop a method that allows the rapid detection of somatic coliphages at low densities while minimizing false negative results. The method, named *Bluephage*, incorporates a tailored *E. coli* strain with two features that improve its sensitivity for phage detection. On the one hand, it over-expresses the *uidA* gene, causing an accumulation of the β -glucuronidase enzyme in the cytoplasm. On the other, it lacks the genes (*uidB* and *uidC*) involved in introducing the substrate into the cell.

The culture medium used in this test incorporates the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid, which turns blue after its cleavage by β -glucuronidase. Consequently, only after the host strain cells are lysed, as occurs after phage infection, will the enzyme degrade the substrate, which in turn causes the medium to change color, thereby providing fast phage detection in a given sample.

2. Materials and methods

2.1. Medium and growth conditions

The media and conditions used here are those included in the ISO protocol for the culture of *E. coli* WG5 strain (Anonymous, 2000). The method employs a modified version of Modified Scholten's Broth (MSB) (Anonymous, 2000). The modified MSB medium is supplemented with 0.05% (w/v) arabinose, 0.5% (v/v) glycerol, 15 μ l CaCl₂ 1 M and 0.1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid. When necessary for the selection of colonies transformed with the pBAD vector, ampicillin (ap) (100 μ g/ml) was added to the liquid medium.

The modified bacterial strain and bacteriophages were inoculated into MSB media and incubated at 37 °C for variable periods (from 1 to 18 h), unless specified otherwise.

2.2. Plasmids

Plasmid pKD46 (GenBank AY048746), expressing the Red recombinase system, was used to insert DNA fragments into the *E. coli* chromosome (Datsenko and Wanner, 2000). The tetracycline resistance gene (*tet*) was amplified from plasmid pACYC184 (Genbank X06403) (Rose, 1988). The pBAD-TOPO vector (Invitrogen) was used to clone and overexpress the *uidA* gene. All the vectors were purified using Qiagen Plasmid Midi purification kits (Qiagen Inc., Valencia, USA).

2.3. Bacteriophages

The bacteriophages in this study were used from laboratory stocks of known concentration (10⁹ PFU/ml) containing a pure culture of one bacteriophage, or naturally occurring somatic coliphages. Coliphages were purified from 1 ml of raw urban sewage from the influent of a wastewater treatment plant that serves approximately 500,000 inhabitants (containing ca 10^{4–5} PFU/ml), or 50 ml of Llobregat river water (ca 10³ PFU/ml). Both sampling points are located in the Barcelona area, Spain. Phage Φ X174 (ATCC 13706-B1) was used as a reference phage for somatic coliphages, in accordance with the ISO protocol (Anonymous, 2000). To prepare a phage mixture, two phages (SOM3 and SOM23) (Muniesa et al., 2003), which belong to *Myoviridae* and *Siphoviridae* morphological types, respectively, were used together with phage Φ X174 (Anonymous, 2000).

The environmental samples used were filtered through 0.22 μ m pore size, low-protein-binding (PES) membranes (Millipore, USA) to remove bacteria and other particulate material.

2.4. PCR techniques

PCRs were performed with a GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain.). The oligonucleotides used in this study are shown in Table 1 and were designed from the sequence available for *E. coli* K-12 (GenBank Accession number NC_000913).

Table 1
- Oligonucleotides used in this study.

| Name | Oligonucleotides | Target gene | ref |
|-----------|---|------------------------------------|-----------------------------|
| uidA-For2 | CTTAATGAGGAGTCCCTT | <i>uidA</i> | This study |
| uidA-Rev2 | CCAGGAGAGTGTGATT | <i>uidA</i> | This study |
| uidB-up | CTGGACTGGCATGAACCTC | <i>uidB</i> | This study |
| uidC-lp | ACTTCAGCATAAAGTCATACT | <i>uidC</i> | This study |
| uidB-Tc5 | <u>CTTATATCGTATGGGGCTG</u> CACTGTCCACCACTCGTCCG | <i>uidB</i> overlapping <i>tet</i> | This study |
| uidC-Tc3 | <u>CTAACGGATTCA</u> CACTCCAACGCTGACATTTGCACCGAT | <i>uidC</i> overlapping <i>tet</i> | This study |
| Tc5 | TCAGCCCCATACGATATAAG | <i>tet</i> | (Serra-Moreno et al., 2006) |
| Tc3 | TGGAGTGGTGAATCCGTTAG | <i>tet</i> | (Serra-Moreno et al., 2006) |
| pBADf | ATGCCATAGCATTTTATCC | pBAD Plasmid construct | Invitrogen |
| pBADr | GATTTAATCTGTATCAGG | pBAD Plasmid construct | Invitrogen |
| RR46-lp | GAGCTCTAAGGAGTTAT | pKD46 | (Serra-Moreno et al., 2006) |
| RR46-up | GTGCACTACTATTCGTT | pKD46 | (Serra-Moreno et al., 2006) |

2.5. Electroporation

Electrocompetent cells were prepared from 50 ml of culture in super optimal broth (SOB) medium (Hanahan, 1983) with 0.05% L-arabinose as previously described (Sambrook and Russell, 2001), mixed with the corresponding amount of DNA (plasmid or PCR-amplified, 0.5 µg) and transferred to a 0.2 cm electroporation cuvette (Bio-Rad, Inc.). The cells were electroporated at 2.5 kV, 25 F and 200 Ω. Cells containing the construct were recovered on MSB agar with the corresponding antibiotic.

2.6. Generation of a tailored CB10 strain

The *E. coli* strain WG5 (the wild-type strain: wt) recommended in the ISO standard method for the detection of somatic coliphages (Anonymous, 2000) was genetically modified in several steps.

2.6.1. *uidA* overexpression

A fragment containing the gene encoding the β-glucuronidase enzyme (*uidA*, 1847 bp) was amplified by PCR with primers UidA-For2/UidA-Rev2 (Table 1) from wt *E. coli* and cloned using a pBAD-TOPO® TA Expression Kit. The latter contains a pBAD-TOPO vector that allows gene insertion under the control of an *araBAD* promoter (Invitrogen Corporation, Barcelona, Spain). The *uidA* gene was inserted into the plasmid following the manufacturer's instructions. The construct was separately transformed in electrocompetent cells prepared with wt *E. coli*. In the resulting construct, pBAD:*uidA*, the gene was positioned in the correct orientation immediately downstream of the *P_{ara}* inducible promoter, as confirmed by PCR using primers pBADf/pBADr (Table 1) and sequencing.

The expression of *uidA* in the pBAD vector was optimized by adding arabinose to the medium at different final concentrations (ranging from 0 to 0.02%) as described by the manufacturer (Invitrogen Corporation, Barcelona, Spain). Finally, arabinose was added to a final concentration of 0.05% in the media. Both vectors contain an ampicillin marker, therefore the strains containing the plasmid construct were grown in the presence of ampicillin in an initial stage.

2.6.2. Construction of the *uidB-tet-uidC* fragment

The amplimer containing the *tet* gene was constructed, replacing the whole fragment comprising *uidB* and *uidC* genes. The primer pair Tc5-Tc3 (Table 1) was used for the amplification of the *tet* gene (1343 bp). The primer pair uidB-up/uidB-Tc5 amplified a 5' region of the *uidB* initial codon including a 20 bp tail homologous with the 5' region of *tet* (279 bp). Primers uidC-Tc3/uidC-lp amplified the 3' region of the *uidC* subunit (261 bp) (Fig. 1) including a 20 bp fragment homologue of the 3' region of *tet*. The

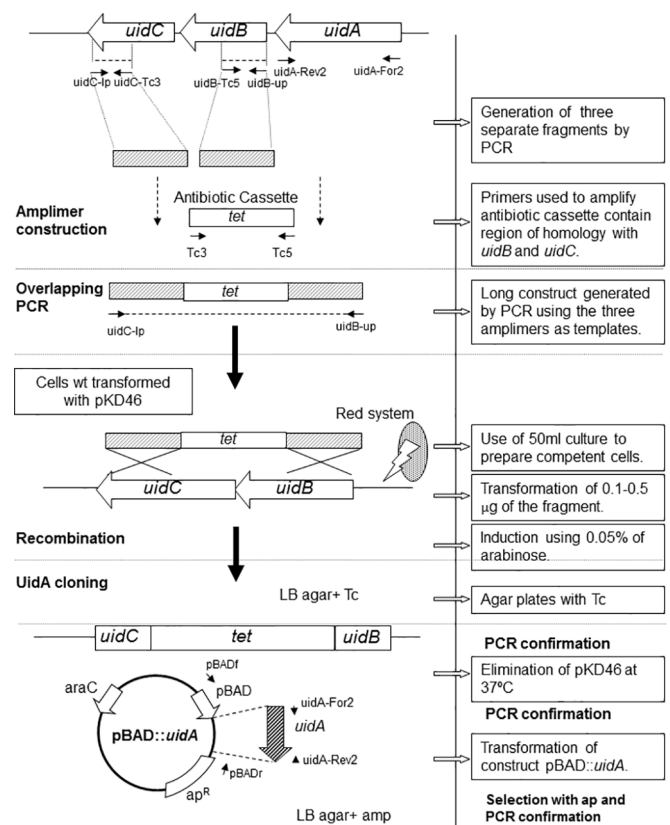


Fig. 1. Scheme showing the construction of strain CB10.

conditions used for all primer combinations were an annealing temperature of 50 °C and an elongation time of 60 s.

Fragments *uidB* and *tet* were annealed at their overlapping region (underlined letters in Table 1). They were then amplified by PCR as a single fragment with the external primers uidB-up and Tc3 (generating a fragment of 1602 bp) with an annealing temperature of 55 °C and an elongation time of 2 min. Fragments UidC and *tet* were annealed at their overlapping region with the external primers uidC-lp/Tc5 (underlined letters in Table 1) generating a fragment of 1584 bp. Finally, the two fragments, of 1602 and 1584 bp, were annealed at their overlapping region (the *tet* gene) and were amplified by PCR as a single fragment with the external primers uidB-up/uidC-lp, generating the final fragment (1843 bp), in which the sequence between genes *uidB* and *uidC* was replaced by the *tet* gene. The uidB-tet-uidC fragment was excised from the gel and purified using the Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc.,

Valencia, USA). The final product was used for the electrotransformation in the wt strain.

2.6.3. Transformation of pKD46

Plasmid pKD46 (GenBank AY048746) was transformed by electroporation in electrocompetent wt *E. coli* cells prepared as described above. Transformed colonies were selected by resistance to ampicillin and the presence of pKD46 was confirmed by PCR, using the primer pair RR46-up/RR46-lp and sequencing.

2.6.4. Recombination of *uidB-tet-uidC*

The transformation of 30 μ l of the fragment 6 (UidB-tet-UidC) PCR amplicon (corresponding to 0.1–0.5 μ g of amplified DNA) was performed in electrocompetent wt cells containing vector pKD46. These cells were prepared from 50 ml cultures (approximately 5×10^{10} CFU/ml) grown at 30 °C in SOB medium with ampicillin and 0.05% L-arabinose to an OD₆₀₀ of 0.6. The transformed cells were recovered in the presence of Tc (10 μ g/ml). Colonies in which *uidB* and *uidC* were replaced by fragment 6 were confirmed by PCR, using the *uidB-UidC* primers, and by sequencing.

The strain was forced to lose the plasmid pKD46 by several growing steps at 37 °C (pKD46 cannot replicate over 30 °C) without ampicillin. The loss of the pKD46 plasmid was confirmed by PCR.

2.6.5. Construction of CB10

The mutant lacking the *uidB* and *uidC* genes was transformed with plasmid pBAD:*uidA* generating strain CB10, $\Delta uidBuidC$:*tet* (pBAD::*uidA*). The presence of plasmid pBAD was confirmed.

The performance of strain CB10 in detecting somatic coliphages was compared with that of the wt strain using a suspension of phages SOM3, SOM23 and Φ X174 propagated in the laboratory and with phages occurring in environmental samples.

2.7. Assays of the Bluephage method

Strain CB10 was inoculated in standard MSB with ampicillin, and incubated overnight at 37 °C. One ml of the overnight culture was 1/100 diluted in fresh MSB with ampicillin and grown to the exponential growth phase, monitored by an optical density (OD) at 600 nm of 0.3. At this stage, 0.5 ml of this culture was added to 2.5 ml of the MSB medium containing 0.05% arabinose, 0.5% glycerol, 15 μ l CaCl 1 M and 0.1 mg/ml of X-glucuronide (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid cyclohexylammonium salt; C₂₀H₂₆BrClN₂O₇) as the substrate. As indicated in each experiment, aliquots of dilutions of the corresponding phage suspension were added to each tube and one tube without phages was kept as a control. The tubes were statically incubated at 37 °C and periodically evaluated for color change from light yellow to blue. The experiment lasted until the phage-free control tube turned blue (a minimum of 7 h). The method was also adapted for quantification using the most probable number (MPN) method.

2.8. Spot test confirmation of phages detected by Bluephage

From each tube inoculated using the *Bluephage* method, after the reported incubation period, 15 μ l aliquots were taken and spiked onto an agar monolayer containing strain CB10 according with the ISO method (Anonymous, 2000). The plates were side-up incubated at 37 °C. Plaques appearing in the spot area were considered positive for the presence of phages in a given sample. Positive results for this spot test were compared with positive results in the *Bluephage* tube to evaluate the sensitivity of the new method.

For a quantitative comparison, the MPN method was applied to the positive spot tests and the positive tubes obtained with the

Bluephage method, and compared with the number of phages detected by the conventional ISO method (Anonymous, 2000).

2.9. Sensitivity of the Bluephage method

To evaluate the sensitivity of the method and the minimum incubation time needed for the analysis, somatic coliphages were enumerated in natural water samples using the ISO method (Anonymous, 2000). The samples were filtered through 0.22 μ m low-binding membranes (PES, Millipore) and diluted to reach estimated lower densities of phages. Each dilution was evaluated in triplicate using the *Bluephage* method. The minimum time to obtain results was reported.

The performance of the test was assayed at 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C and 44 °C.

Wastewater and river water samples filter-sterilized through high-protein binding membranes of 0.22 μ m (Millex-MF Millipore) to remove phages were used as additional controls.

2.10. Assay protocol in solid samples: sludge and mussels

To evaluate the performance of the method in matrices other than water, sludge samples from the digester of a wastewater treatment plant in the Barcelona metropolitan area, which serves approximately 500,000 people, and mussels obtained from local supermarkets were processed. The method for phage extraction from sludge corresponds to the methods used in established policies, as described previously by Lasobras et al. (1999), with minor modifications. Briefly, the samples were mixed in a 1:10 (w/v) ratio with PBS (pH = 7.4) and homogenized by magnetic stirring for 30 min at room temperature. The suspension was then centrifuged at 10,000 \times g for 30 min at 4 °C. The supernatant was subsequently filtered through low-protein-binding 0.22 μ m pore size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA). The suspension was diluted and used to enumerate phages using the standard ISO method and analyzed in triplicate using *Bluephage*.

For the study of phages in mussels, samples were spiked with somatic coliphages from raw sewage to reach a final estimated concentration of 10^2 – 10^3 PFU/g of mussel. Phages were incubated with the samples for 2 h at 23 °C. There is no established guideline for phage extraction from mussels, so previously reported methods were used (Lucena et al., 1994). Briefly, mussel meat from a minimum of 10 mussels per sample was homogenized in a blender for 5 min. Elution of phage particles was performed on 100 ml of the homogenate by magnetic stirring for 15 min in 400 ml of borate buffer (0.01 M) containing 3% beef extract (pH 9.5). After neutralization to pH 7.2, the treated homogenate was clarified by centrifugation at 2500 \times g for 15 min at 4 °C. Phages present in the supernatant were enumerated by the ISO standard procedure and detected by the *Bluephage* method.

2.11. Scaling up and down of the Bluephage method

To evaluate the performance of the method in different sample volumes, 100 ml bottles were used with 50 ml of river water samples diluted to contain phage densities of 10 PFU/ml. Similarly, small volumes of 1.5 ml containing densities from 10^4 to 0.1 phages were used. Both assays were performed keeping the same proportion of nutrients, substrate and strain CB10 as in the tubes.

2.12. Statistical analysis

Computation of data and statistical tests were performed using the Statistical Package for Social Science software (SPSS). The ANOVA test was used to evaluate the differences between MPN,

spot test and *Bluephage* results; evaluations were based on 5% of significance levels.

3. - Results

3.1. - Method rationale and strain performance

The genetically modified *E. coli* strain (referred to henceforth as strain CB10) described in this study was grown in the presence of the substrate without its consumption, since the substrate cannot be incorporated inside the cell in the absence of transporter genes. Only when phage infection caused cell lysis was β -glucuronidase, which is overexpressed in the presence of arabinose and accumulated in the cell cytoplasm, released into the medium where it encountered the substrate. Even as few as 1 to 5 somatic coliphages were able to lyse a number of cells exceeding 10^8 in less than 3 h, thus liberating a large amount of enzyme into the medium. The enzyme in the medium cleaves the D-glucuronide in the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid molecules, releasing the blue substrate that turns the broth (originally light yellow) dark blue. The time necessary for this color change varied depending on the number of bacteria lysed and hence on the concentration of phages added to the cell culture and the time elapsed after infection.

The performance of CB10 in the presence of the substrate was evaluated before using it for phage detection. To do this, the *E. coli* WG5 (wt) strain containing pBAD:*uidA* and CB10 (with and without phages) were compared when inoculated into the broth for the *Bluephage* method. We observed a slight but visible color change with the wt *E. coli* (Fig. 2). Meanwhile, strain CB10 had no effect on the color in the absence of phages, because of its incapacity to incorporate the substrate caused by replacement of the *uidBuidC* complex. The highest expression of the enzyme was observed in the

wt strain containing pBAD:*uidA* in the presence of 0.02% arabinose, which produced a darker blue than the wt strain. Finally, on adding phages from wastewater (we used a high quantity of 10^3 PFU to test the method under optimal conditions), CB10 caused a change of color after only 1.5 h of incubation (Fig. 2).

3.2. - The CB10 strain and the standard method detected the same number of phages

To confirm that the modification of the wt strain did not cause a decrease in the number of phages detected, its performance was compared with the wt strain, according to the ISO method (Anonymous, 2000). The phage counts obtained with both strains showed no significant differences ($P > 0.05$) (Table 2).

3.3. Performance of the *Bluephage* method with environmental samples

Filtered wastewater and river water samples were 10-fold diluted and added to the *Bluephage* tubes containing strain CB10, at descending phage densities. In Fig. 3, the tubes correspond to estimated 500, 50, 5 and ≤ 1 PFU/tube (calculation based on the dilution of the sample), and one control tube that contained only CB10 and no phages. The cultures were incubated at 37 °C and the color change was monitored over time (Fig. 3). The first positive results were observed at 1:30 h for concentrations of 50 and 500 phages. Cultures containing 5 phages turned blue after 2:15 h. Nevertheless, the tubes were incubated until the control culture turned blue, which required a minimal incubation time of 7 h. Samples were considered negative for the presence of phages if blue coloration did not occur before the time needed for the control sample to change color (Fig. 3).

Potentially polluted wastewater and river samples were 10-fold diluted and the number of somatic coliphages was evaluated using the ISO method (Table 3). The color change was monitored after 2:30 h, 3:30 h and 4:30 h, times that were selected to generate results within one working day. The resulting number of positive tubes out of the total number of tubes assayed at the different times for each phage density are presented in Table 3. Notably, at higher phage densities, detection occurred after 2:30 h. Some samples with high phage densities turned blue even earlier, at 1:30 h (data not shown). In general, tubes with high phage densities changed color earlier than those with low densities (Table 3), although a clear correspondence between the number of phages and the time required for the color change was not always observed, as discussed below.

The minimal time to observe color change in tubes with <5 PFU was 2:30 h, as for example in tubes with densities of 0.7 PFU/tube in wastewater or 3.4 PFU/tube in river water (Table 3). Nevertheless, at 4:30 h, all the tubes containing >10 PFU/tube were positive and 46% of the tubes containing 1–10 PFU/tube had also turned blue. This time is well within the time frame in which the phage-free negative control remained without changing color. In parallel, no changes were observed in the filter-sterilized diluted wastewater and river water control samples from which the phages had been removed.

3.4. Results using the *Bluephage* method at different temperatures

The above mentioned results were obtained when incubating at 37 °C, with the same results obtained at 44 °C. In contrast, at 20 °C and 25 °C, longer incubation times (5 h) were required before the color change was detected in the tubes containing 500 PFU. Accordingly, the phage-free control tube also remained unaltered for longer, and no change of color was observed before 12 h of

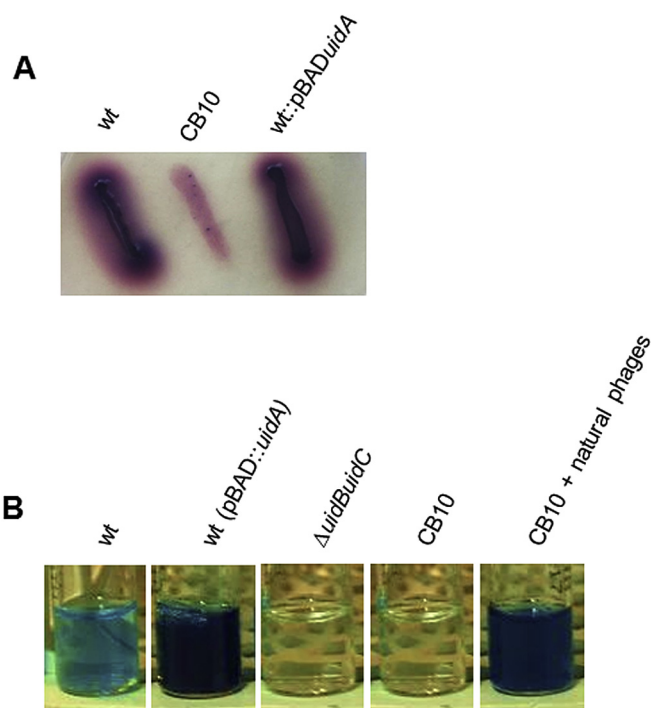


Fig. 2. - Confirmation of the incapacity of the strain CB10 to incorporate the substrate in the absence of phages and of the overexpression of the *uidA* gene under the control of the arabinose promoter. A: Growth on a Chromocult® agar plate containing X-glucuronide. B: Growth in *Bluephage* liquid medium. The tube containing natural occurring phages was inoculated with 10^3 phages.

Table 2

- Enumeration of phages by the ISO method comparing the wt and the mutant CB10 as host strains in wastewater (WW), river water (RW) and using laboratory phages as controls.

| Sample Ref. | Source | Wt (PFU/ml) | CB10 (PFU/ml) | Log ₁₀ difference |
|--------------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
| WW1 | Wastewater | 4.95×10^4 | 3.80×10^4 | 0.11 |
| WW2 | Wastewater | 7.27×10^3 | 8.56×10^3 | -0.07 |
| WW3 | Wastewater | 1.95×10^4 | 2.06×10^4 | -0.02 |
| WW4 | Wastewater | 7.91×10^3 | 3.34×10^3 | 0.37 |
| WW5 | Wastewater | 7.26×10^3 | 5.12×10^3 | 0.15 |
| RW1 | River Water | 4.77×10^4 | 3.36×10^4 | 0.15 |
| ΦX174 | Laboratory | 5.70×10^{10} | 3.20×10^{10} | 0.25 |
| Mixture of phages ^a | Laboratory | $2.54 \cdot 10^6$ | $2.14 \cdot 10^6$ | 0.07 |

^a Mixture is composed by phage ΦX174 (Anonymous, 2000), and environmental *Myoviridae* (SOM3) and *Siphoviridae* (SOM23) phages.

incubation.

3.5. Sensitivity and specificity of the Bluephage method

To confirm that the color change in inoculated tubes was due to the presence of phages, the supernatant of each tube (including the negative tubes) underwent a spot test on strain CB10. Positive results of both *Bluephage* and the spot test were used to enumerate the phages using the MPN method. The results recorded after 3.5 h of incubation by the *Bluephage* method and by the spot test were used to determine the phage densities using MPN calculations (Fig. 4). In all cases, the values obtained with *Bluephage* were the same as or slightly lower than the spot test values. However, the results showed no statistically significant ($P > 0.05$) differences between them.

As indicated above, only results obtained within an acceptable time frame for the method, during which the control did not change color, were considered and used for the calculations.

3.6. The *Bluephage* method is applicable to phages extracted from solid samples

To evaluate any limitation of the method when using somatic coliphages extracted from matrices other than water, two types of solid samples related with water pollution, sludge and mussels, were evaluated. The presence of phages in wastewater sludge and mussels was detected by the *Bluephage* method after 2:30 h of incubation, when no change was observed in the control (Table 4) or before 7 h of incubation. As in the water samples, most samples with densities of up to 10 PFU/tube, and some with even lower densities (Table 4), were already positive at 1:30 h (data not shown). All the samples with fewer than 3 phages/tube were negative, since no change of color was observed before the control turned blue.

3.7. The *Bluephage* method is applicable at different scales

When using larger volumes, phages were detected by the *Bluephage* method whenever the proportions of nutrients, substrate and the host strain CB10 were maintained. Volumes of 50 ml of samples containing low phage densities (10 PFU/l of sample, which corresponds to 500 PFU in each bottle) produced positive results visible after 1:30 h of incubation (Fig. 5A).

Similarly, the method was successfully down-scaled, which is useful for quantification based on the MPN technique. As in the tubes, the *Bluephage* method allowed detection of somatic coliphages in sample dilutions containing 100 PFU/well or over at 1:30 h and 10 PFU/well or over at 3:30 h (Fig. 5B). Even a well containing just 1 PFU started to turn blue after 3:30 h (Fig. 5B, 3:30 h, 2nd row).

4. Discussion

The standardized ISO and U.S. EPA protocols for the detection and enumeration of somatic coliphages consist of a multiple-step procedure involving coliphage replication in exponential-growth-phase host cells. ISO-10705-2 (Anonymous, 2000) includes both a double-agar-layer (DAL) plaque assay for the quantification of PFU and the presence/absence test that can also be adapted to the MPN format. U.S. EPA Method 1601 (U.S. EPA, 2001a) is a presence/absence method and U.S. EPA Method 1602 (U.S. EPA, 2003b) a single-agar-layer (SAL) plaque assay. Plaque assays provide results more rapidly, and in both methods, plaques can be obtained after 6 h. However, up to two additional hours are needed for pre-growth of the host strain, and the overall recommended assay length is 18 h.

Alternative protocols based on the detection of a molecule released by host cell lysis have also been reported (Guzmán-Luna et al., 2009; Ijzerman et al., 1993). These methods provide insight into the number of infectious bacteriophages in a given sample. They are also relatively fast because of the short time needed for the initial and subsequent replication cycles, which allows a high number of lysed cells to be obtained in 2–3 h. Thus, Ijzerman et al. (1993) report a method based on rapid extracellular release and detection of a β-galactosidase enzyme during the coliphage-induced lysis; the drawbacks are false positives and long incubation times required when the phage number is low. Later, Guzmán Luna et al (Guzmán-Luna et al., 2009) described a method based on the detection of somatic coliphages via a bioluminescence assay measuring the phage-mediated release of adenylate kinase and subsequent adenosine 5'-triphosphate detection. These methods have been improved and adapted to multiple tube serial dilutions based on the U.S. EPA and ISO presence/absence standards (Salter and Durbin, 2012; Salter et al., 2010), with results available within one working day. Additionally, the test is facilitated by the incorporation of lyophilized *E. coli* tablets.

The *Bluephage* method presented here takes advantage of the overexpressed β-glucuronidase enzyme, which is not secreted into the medium until the cells are lysed. Therefore, in the absence of bacteriolysis, contact between the intracellular enzyme and its specific substrate is precluded. As the substrate remains uncleaved, false positive results are avoided during the time needed to complete the screening. In the presence of bacteriophages, the bacterial cells are lysed, releasing the enzyme into the medium where it finds and cleaves the substrate, inducing a change of color when enough cells are lysed. The general trend observed was that higher phage densities caused a faster change of color than lower densities, although with some exceptions. The variability observed at low phage densities has two explanations. First, the possibility of inoculating a single phage can vary from tube to tube when the densities are low. Second, the somatic coliphages are heterogeneous, as they belong to different families with a variety of burst

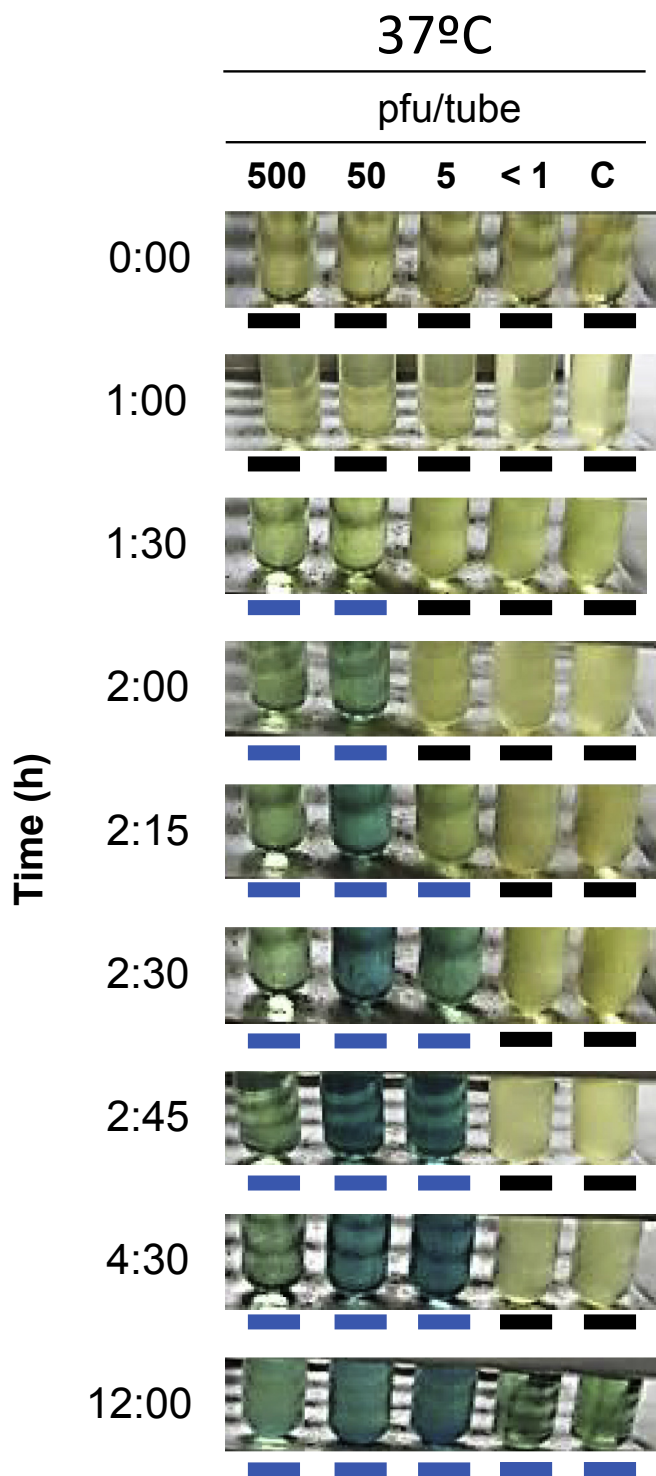


Fig. 3. - Example of color change of the *Bluephage* tubes in the presence of decreasing phage densities at different times. Blue indicates a positive result while yellow indicates negative results.

sizes and times required for replication (Muniesa et al., 1999).

Considering that 1.5–2 h are required to prepare strain CB10 at an OD_{600} of 0.3 for inoculation into the tubes, and that the method allows detection of one phage per tube in 3.5 h, the maximum test duration is of 5.5 h: well within one habitual working day. It should also be considered that the host strain can be grown to an OD_{600} of

Table 3

Comparison between the number of phages enumerated by the ISO method or by using *Bluephage* dilutions of river water, urban raw wastewater and a mixture of phages.

| Sample | ISO PFU/tube ^a | <i>Bluephage</i> | | |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------|--------|
| | | Positive tubes/total tubes | | |
| | | 2:30 h | 3:30 h | 4:30 h |
| River 1 | 33.6 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 16.8 | 2/3 | 2/3 | 3/3 |
| | 3.4 | 1/3 | 1/3 | 2/3 |
| | 1.7 | 0/3 | 0/3 | 2/3 |
| | 0.3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| River 2 | 43 | 1/3 | 2/3 | 3/3 |
| | 21.5 | 1/3 | 2/3 | 3/3 |
| | 4.3 | 0/3 | 1/3 | 1/3 |
| | 2.1 | 0/3 | 0/3 | 1/3 |
| | 0.4 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| Wastewater 1 | 85.6 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 17.1 | 1/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 8.6 | 1/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 1.7 | 0/3 | 2/3 | 2/3 |
| | 0.9 | 0/3 | 0/3 | 1/3 |
| Wastewater 2 | 0.2 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| | 33.4 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 6.7 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 3.3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 |
| | 0.7 | 1/3 | 2/3 | 2/3 |
| Phages mixture ^b | 0.1 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| | 49.9 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
| | 16.6 | 1/2 | 1/2 | 2/2 |
| | 8.3 | 1/2 | 1/2 | 2/2 |
| | 5.0 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |
| | 1.7 | 0/2 | 0/2 | 1/2 |
| | 0.5 | 0/2 | 0/2 | 0/2 |

^a Measured in the water samples by ISO method, numbers correspond to the estimated calculation based on the dilution of the sample.

^b Mixture composed by phage Φ X174, one *Siphoviridae* phage and one *Myoviridae* phage.

0.3 before the sample arrives at the laboratory (Anonymous, 2000). Compared to the aforementioned methods based on the detection of a molecule or molecules released by host cell lysis, the method reported herein is faster, and gives a much lower percentage of false positive results; furthermore, it needs minimal laboratory equipment.

The change of color observed in the phage-free controls after 7 h was attributed to spontaneous cell lysis after a certain incubation period, but this is sufficient time to ensure phage detection in the sample. It cannot be excluded that the presence of bacteriolytic agents other than phages can lead to false positive results, which could also be caused by the presence of high concentrations of the glucuronidase enzyme or glucuronidase-positive bacterial strains in the samples. This can occur with highly polluted undiluted wastewater, and the high density of phages occurring found in such samples produces a color change before glucuronidase can have the same effect. In any case, the *Bluephage* method requires the previous filtration of the sample to reduce the possibility of other bacteriolytic agents and particularly for the removal of other bacterial strains possessing glucuronidase activity. Filtration of natural samples through 0.22 μ m low-protein binding membranes is already used in the standard methods for somatic coliphage detection (Anonymous, 2000), although it is not mandatory.

Importantly, the *Bluephage* method shows the same sensitivity as the standard ISO method. The CB10 strain does not lose its capacity to detect somatic coliphages after its modification, and it was confirmed that all positive enzymatic activity results were due to the presence of phages in the sample. Moreover, *Bluephage* is useful for the analysis of water and solid matrices such as biosolids and

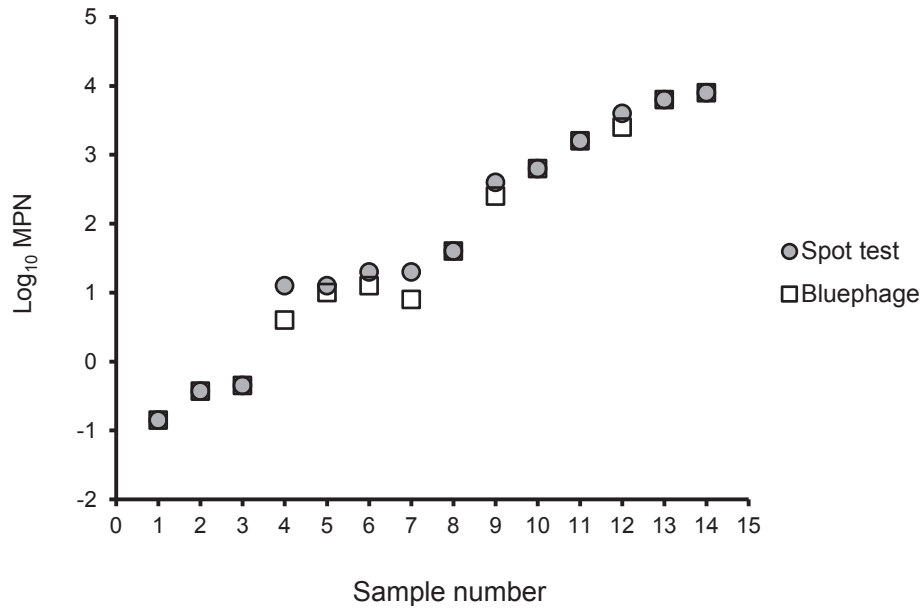


Fig. 4. Mean MPN for the *Bluephage* method ($n = 14$) and the spot test ($n = 14$) compared across samples containing different concentrations of somatic coliphages. Mean MPN were not significantly different ($p > 0.05$) according to ANOVA test.

Table 4

Performance of the method in 2:30 h for phages in solid matrices.

| Sample | wt strain (PFU/ml or g) | Dilution | Theoretical PFU/ml | Positive tubes at 2:30 h | Control performance (2:30 h) |
|-----------|-------------------------|----------|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| Sludge 1 | $1.89 \cdot 10^3$ | D | 945 | 3/3 | No change |
| | | -1 | 94.5 | 3/3 | |
| | | -2 | 9.45 | 3/3 | |
| Sludge 2 | $1.03 \cdot 10^3$ | D | 515 | 3/3 | No change |
| | | -1 | 51.5 | 3/3 | |
| | | -2 | 5.15 | 2/3 | |
| Sludge 3 | $8.91 \cdot 10^2$ | D | 445 | 3/3 | No change |
| | | -1 | 44.5 | 3/3 | |
| | | -2 | 4.45 | 1/3 | |
| | | -3 | 0.45 | 0/3 | |
| Mussels 1 | $1.55 \cdot 10^2$ | D | 155 | 3/3 | No change |
| | | -1 | 15 | 3/3 | |
| | | -2 | 1.5 | 0/3 | |
| Mussels 2 | $4.09 \cdot 10^3$ | D | 1600 | 3/3 | No change |
| | | -1 | 33.5 | 3/3 | |
| | | -2 | 3 | 1/3 | |
| | | -3 | <0.25 | 0/3 | |

shellfish. The method can also be scaled up for large volumes and adapted to small volumes for MPN quantification, mimicking kits available for the detection of bacterial indicators. In the current work, our main intention was to establish the suitability of the method for use in different conditions and matrices, but a more exhaustive analysis should be done in the future to evaluate the significance of low PFU in these formats.

The rapid performance of the method, providing results within the same day of sampling, would be an advantage when a fast, immediate or continuous response to the quality of a water body is required: for instance, to provide safe drinking water, trace the origin of a water-borne outbreak, evaluate the quality of recreational surface waters in the morning before the users arrive, monitor a treatment plant or a disinfection device, or evaluate the water used in food production.

The method could be improved still further without involving substantial changes by using fluorogenic instead of colorimetric detection and lyophilized strains that are easier to store, although in this case, the time frame necessary to generate visible results

should be validated. An adaptation of *Bluephage* to detect β -glucuronidase activity using already available online platforms (Hesari et al., 2015; Togo et al., 2007) seems feasible and would provide an automated method.

5. Conclusions

- The widespread incorporation of somatic coliphage detection in water management policies requires user-friendly methods. *Bluephage* can facilitate routine implementation of somatic coliphage determination in laboratories with minimal requirements.
- *Bluephage* allows the detection of up to 1 somatic coliphage in under 3.5 h, well within a working day. This improves the sensitivity reported for other available methods
- The method has been successfully applied to diverse sample types and volumes, using presence/absence and quantitative analysis, which confirms its suitability for use with a variety of food and water samples

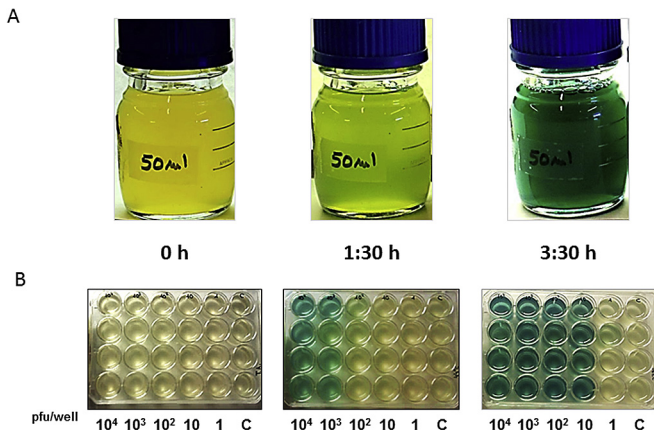


Fig. 5. - A: Bluephage method for volumes of sample of 50 ml containing phages at a concentration of 10 PFU/ml after different times. B: Scale-down of Bluephage method using replicates inoculated with phages from wastewater samples at different concentrations and times.

- This microbiological method for the determination of fecal pollution via detection of culturable microorganisms is the fastest reported to date, and can provide results where rapid information of fecal pollution is essential.

Acknowledgements

Authors are members of the consolidated group of the Generalitat de Catalunya (2014SGR7), the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) and the Institut de Recerca de l'Aigua/University of Barcelona. This work has been partially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2016-75536). Authors declare no conflict of interest.

References

Anonymous, 2001. Loi sur la qualité de l'environnement: règlement sur la qualité de l'eau potable c. Q-2, r.18.1.1. Quebec, Canada.

Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages -part 2: Enumeration of Somatic Coliphages.

Armon, R., Kott, Y., 1996. Bacteriophages as indicators of pollution. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 26, 299–335. <https://doi.org/10.1080/10643389609388494>.

Borchardt, M.A., Haas, N.L., Hunt, R.J., 2004. Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5937–5946. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5937-5946.2004>.

Bosch, A., Lucena, F., diez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M., Jofre, J., 2001. Waterborne viruses associated with an hepatitis outbreak. *J. Am. Water Work. Assoc.* 75, 10290–10299.

Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.

Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015. National Sanitation Program. Guide for the Control of Molluscan Shellfish. Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Frampton, E.W., Restaino, L., Blaszkowski, N., 1988. Evaluation of the β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) in a 24-hour direct plating method for *Escherichia coli*. *J. food Prot.* 51 (5), 402–404.

Gerba, C.P., Goyal, S.M., LaBelle, R.L., Cech, I., Bodgan, G.F., 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Am. J. Public Health* 69, 1116–1119.

Goyal, S.M. (Ed.), 2006. Viruses in Foods, Food Microbiology and Food Safety. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/0-387-29251-9>.

Grabow, W., 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27, 251–268. <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i2.4999>.

Guzmán-Luna, C., Costán-Longares, A., Lucena, F., Jofre, J., 2009. Detection of somatic coliphages through a bioluminescence assay measuring phage mediated release of adenylate kinase and adenosine 5'-triphosphate. *J. Virol. Methods* 161, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.05.021>.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.

Hesari, N., Alum, A., Elzein, M., Abbaszadegan, M., 2015. A biosensor platform for

rapid detection of *E. coli* in drinking water. *Enzyme Microb. Technol.* 83, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.11.007>.

Hsu, F.C., Shieh, Y.S.C., Sobsey, M.D., 2002. Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *J. Food Prot.* 65, 93–99.

IAWPRC Study group on health related water microbiology, 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25, 529–545. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-B](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-B).

Ijzerman, M.M., Falkinham, J.O., Hagedorn, C., 1993. A liquid, colorimetric presence-absence coliphage detection method. *J. Virol. Methods* 45, 229–233.

Ijzerman, M.M., Falkinham, J.O., Reneau, R.B., Hagedorn, C., 1994. Field evaluation of two colorimetric coliphage detection methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 826–830.

Jofre, J., 2007. Indicators of waterborne enteric viruses. In: Bosch, A. (Ed.), *Human Viruses in Water, Perspectives in Medical Virology*. Elsevier, pp. 227–249. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17011-7](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17011-7).

Keswick, B.H., Gerba, C.P., DuPont, H.L., Rose, J.B., 1984. Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1290–1294.

Kilian, M., Bülow, P., 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol.* 88, 245–251.

Lasobras, J., Dellunde, J., Jofre, J., 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.

LeChevallier, M., Kwok-Keung, A., 2004. WHO | Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water. WHO Drinking Water Quality. World Health Organization, London, UK.

Liang, W.-J., Wilson, K.J., Xie, H., Knol, J., Suzuki, S., Rutherford, N.G., Henderson, P.J.F., Jefferson, R.A., 2005. The gusBC genes of *Escherichia coli* encode a glucuronide transport system. *J. Bacteriol.* 187, 2377–2385. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2377-2385.2005>.

Lucena, F., Lasobras, J., McIntosh, D., Forcadell, M., 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, 2272–2277.

Mooijman, K.A., Ghameshlou, Z., Bahar, M., Jofre, J., Havelaar, A.H., 2005. Enumeration of bacteriophages in water by different laboratories of the European Union in two interlaboratory comparison studies. *J. Virol. Methods* 127, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.013>.

Muniesa, M., Lucena, F., 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, 402–409.

Muniesa, M., Moccé-Llivina, L., Katayama, H., Jofre, J., 2003. Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Ant. Van Leeuwenhoek* 83, 305–315.

NHMRC, NRMCC, 2011. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. Canberra.

North Carolina Administration, 2011. North Carolina Administrative Code 15A NCAC 2U. Raleigh, USA.

Novel, M., Novel, G., 1976. Regulation of beta-glucuronidase synthesis in *Escherichia coli* K-12: constitutive mutants specifically derepressed for uidA expression. *J. Bacteriol.* 127, 406–417.

Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E., Prevost, M., 1997. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *Int. J. Environ. Health Res.* 7, 5–31. <https://doi.org/10.1080/09603129773977>.

Queensland Government, 2005. Queensland Water Recycling Guidelines. Brisbane, Australia.

Republica de Colombia, 2014. Decreto no 1287. Criterios para el uso de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales. Bogotá.

Rose, R.E., 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* 16, 355.

Salter, R.S., Durbin, G.W., 2012. Modified USEPA method 1601 to indicate viral contamination of groundwater. *J. Am. Water Works Assoc.* 104, E480–E488. <https://doi.org/10.5942/jawwa.2012.104.0115>.

Salter, R.S., Durbin, G.W., Conklin, E., Rosen, J., Clancy, J., 2010. Proposed modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol valida. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7803–7810. <https://doi.org/10.1128/AEM.01235-10>.

Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb. Lab. Press, Cold Spring Harb. NY 999.

Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J.P., Jofre, J., Muniesa, M., 2006. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol. Biol.* 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-31>.

Togo, C.A., Wutor, V.C., Limson, J.L., Pletschke, B.I., 2007. Novel detection of *Escherichia coli* beta-D-glucuronidase activity using a microbially-modified glassy carbon electrode and its potential for faecal pollution monitoring. *Bio-technol. Lett.* 29, 531–537. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9282-5>.

U.S. EPA, 2015. Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality. EPA 820-R-15-098. Washington D.C.

U.S. EPA, 2006. National Primary Drinking Water Regulations: Groundwater Rule. Final Rule; 40 CFR Parts 9, 141 and 142, vol. 71. Federal register, Washington D.C.

U.S. EPA, 2003a. Results of the Interlaboratory Validation of EPA Method 1601 for Presence/Absence of Male Specific (F+) and Somatic Coliphages in Water by Two-step Enrichment. EPA 821-R-03-015. Washington D.C.

U.S. EPA, 2003b. Results of the Interlaboratory Validation of EPA Method 1602 for Enumeration of Male Specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single

- Agar Layer (SAL). EPA 821-R-03–016. Washington D.C.
- U.S. EPA, 2001a. Method 1601: Detection of Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure. EPA 821-R-01–030. Washington D.C.
- U.S. EPA, 2001b. Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. EPA 821-R-01–029. Washington D.C.
- U.S. EPA, 2016. In: 2016 Coliphage Experts Workshop: Discussion Topics and Findings. Office of Water. EPA 823-F-16F001.
- Western Australian Government, 2012. Western Australia Guidelines for Biosolids Management. Perth. Australia.

4.2 Artículo 2:

***Bluephage*, un método para la detección eficiente de colifagos somáticos en muestras de agua de cien mililitros**

Javier Méndez, **Daniel Toribio-Avedillo**, Raquel Mangas-Casas and Judit Martínez-González
Scientific Reports 10, 2977 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-60071-w

Introducción

Los colifagos son bacteriófagos capaces de infectar a *Escherichia coli* y otras bacterias coliformes. Existen diferentes métodos estandarizados equivalentes para su detección recogidos por las entidades reguladoras de la ISO y la U.S. EPA (Grabow et al., 1998; Guzmán et al., 2008; Schaper and Jofre, 2000). Actualmente, los colifagos están siendo incluidos como microorganismos indicadores en diversas normativas de calidad de agua alrededor del mundo debido a su potencial como indicadores virales de contaminación fecal (BIS 2012; NHMRC; NRMCC 2011; Republica de Colombia 2014). Entre ellas, están las nuevas normativas de agua de consumo de la Unión Europea y la OMS que recomiendan la ausencia de colifagos somáticos en muestras de agua de 100 ml (World Health Organisation 2017; The European Parliament and the Council of the European Union 2020a).

En la actualidad existen las siguientes alternativas para realizar los análisis de ausencia de colifagos en muestras de 100 ml: 1) La prueba de presencia/ausencia descrita en ambos protocolos ISO/U.S. EPA, 2) el método DAL (*Double Agar Layer*) para el recuento de colifagos descrito en la normativa ISO con un paso previo de concentración de la muestra y 3) el método SAL (*Single Agar Layer*) descrito en la normativa U.S. EPA que utiliza 10 réplicas de 10 ml para alcanzar el volumen total necesario de 100 ml. El primero, de acuerdo con los estándares de ambas entidades, requiere 2 pasos de enriquecimiento y un posterior test de la gota. Por tanto, requiere más de un día de trabajo para obtener resultados. Por otro lado, tanto el método de SAL (Grabow et al., 1998; Mooijman et al., 2001) como la concentración de las muestras (Ikner et al., 2012; Méndez et al., 2004) son procedimientos complejos y sufren de pérdidas de eficiencia en la recuperación de colifagos. Se requieren por tanto de protocolos eficientes, rápidos y sencillos para el usuario para la detección de colifagos en 100 ml de muestra. El método *Bluephage*, descrito por Muniesa et al., 2018 (Publicación 1), puede ser un candidato

con fácil implementación al no requerir mano de obra altamente cualificada y necesitar un equipo de laboratorio mínimo para su realización.

La detección de un único fago en volúmenes elevados de muestra es un reto complejo debido a que las partículas virales siguen una distribución espacial no uniforme de acuerdo con el modelo teórico de Poisson (Maul 1999). Por ello, en este estudio se utilizarán aproximaciones estadísticas que calcularán los porcentajes de muestras positivas esperados en un conjunto de muestras con concentraciones de 1 fago por 100 ml con el objetivo de determinar la precisión y límite de detección de los diferentes métodos para el recuento de colifagos.

Objetivos

Para este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- Demostrar que la susceptibilidad de la cepa CB10 a colifagos somáticos pertenecientes a diferentes familias de virus es equivalente a la susceptibilidad de la cepa WG5.
- Comparar la precisión del método *Bluephage* con la precisión de los protocolos de la ISO en las pruebas de detección de presencia/ausencia de colifagos somáticos en muestras de 100 ml.
- Establecer la especificidad y el límite de detección del método *Bluephage* y comparar estos valores con los obtenidos por el método DAL, según las normativas de la ISO.

Resultados

Con el objetivo de demostrar la equivalencia de ambas cepas (WG5 y CB10) respecto a la susceptibilidad a colifagos somáticos, se llevó a cabo un ensayo de infectividad mediante el test de la gota (*spot test*) de 18 suspensiones individuales de colifagos somáticos, caracterizados previamente como pertenecientes a las familias *Microviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae* o *Tectiviridae* y 4 suspensiones individuales de colifagos F-específicos de las familias de los *Inoviridae* o *Leviviridae*. También se realizaron ensayos de infección cruzada utilizando suspensiones de fagos obtenidas de 30 calvas aisladas de muestras de aguas residuales parcialmente purificadas y visualmente diferentes, obtenidas tras la infección de cada una de las cepas, y usadas para su posterior reinfección en la cepa opuesta. Con los resultados de los test de la gota se concluyó que la susceptibilidad de ambas cepas era idéntica, ya que son

infectadas por el mismo número de colifagos somáticos, tanto de referencia como ambientales, y por ninguno de los colifagos F-específicos.

La valoración de la precisión del método en volúmenes elevados se calculó utilizando stocks liofilizados de la cepa CB10 en ensayos de presencia/ausencia mediante la metodología *Bluephage* en volúmenes de 100 ml. Los cambios colorimétricos de los ensayos de *Bluephage* fueron monitorizados durante 4 horas de incubación a 37 °C. En paralelo, se realizaron ensayos de presencia/ausencia por el método DAL descrito en las normativas de la ISO para la comparación con los resultados del método *Bluephage*. Las muestras empleadas fueron diferentes alícuotas de suspensiones de referencia de colifagos somáticos, preparados a partir de colifagos aislados de muestras ambientales, conteniendo entre 50-100 UFP/ml y que fueron añadidos a 100 ml de agua mineral que no contenía de colifagos somáticos. En la Tabla 1 de la publicación están recogidos los resultados a ambos análisis, indicando el porcentaje de positivos, estimaciones de NMP, de media y de intervalos de confianza para cada volumen. La comparación de los resultados obtenidos de los métodos de la ISO con los obtenidos mediante *Bluephage* demuestra que no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

Con el fin de confirmar la especificidad de la cepa *E. coli* CB10 usada en el método *Bluephage*, se realizaron 80 controles negativos del ensayo *Bluephage* empleando muestras de agua mineral no contaminadas. Ninguno de estos controles negativos sufrió un cambio de color en los ensayos de *Bluephage* en tiempos inferiores a 4 horas, demostrando una alta especificidad.

Buscando la distribución estadística apropiada para nuestros datos, se observó que las concentraciones de bacteriófagos obtenidas en los ensayos se ajustan a una distribución de Poisson mejor que a otras clases de distribuciones estadísticas (Tabla 2). Para esta comparación de distribuciones se aplicaron los criterios de información de Akaike (AIC) como criterios de selección y la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) para verificar que los recuentos reales y las funciones de distribución de probabilidad calculadas no eran estadísticamente diferentes. La prueba de Wilcoxon fue utilizada para establecer que no había diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las predicciones teóricas de números positivos estimadas por la distribución de probabilidad de Poisson y los valores experimentales obtenidos mediante ambos métodos, DAL y *Bluephage* (Tabla 3).

Las distribuciones de Poisson derivadas del porcentaje de muestras positivas de las alícuotas de menor volumen fueron utilizadas para llevar a cabo una simulación de remuestreo aleatorio (*bootstrapping*). Dicha simulación del método de *Bluephage* con 10.000 ensayos *in silico* fue

realizada para obtener estimaciones de la precisión y especificidad del método. Los valores medios simulados de porcentajes de muestras positivas se compararon con los valores experimentales del método DAL para determinar la precisión y especificidad del método. Tras la simulación y comparación, se obtuvo una precisión media de 96,67 % y una especificidad media de 97,78% para el método *Bluephage*. Por lo tanto, el método *Bluephage* es tan preciso y específico como el método DAL descrito en los protocolos de la ISO para la detección de colifagos somáticos en muestras de 100 ml.

El límite de detección fue calculado desde las alícuotas de menor volumen comparando el porcentaje de muestras cuya concentración era de 1 fago en 100 ml mediante el método DAL frente a la proporción de las muestras positivas obtenidas por el método *Bluephage*. Los porcentajes obtenidos de muestras positivas para estos volúmenes fueron de 35,71% y 38,01 % para los métodos DAL y *Bluephage* respectivamente. De acuerdo con la distribución de Poisson, la función de probabilidad para un número n de eventos que ocurren en un intervalo con una tasa media λ cuando $n=0$ puede ser descrita como $e^{-\lambda}$. En base a esto se determinaron los valores de λ de 0,4418 y 0,4796 para el método DAL y *Bluephage* respectivamente. Para buscar diferencias significativas entre ambos valores se aplicó un análisis de remuestreo aleatorio para determinar un intervalo de λ donde no existen diferencias significativas aplicando la prueba de KS. Se determinó que dicho intervalo se extendía desde 0,4032 hasta 0,4826, incluyendo los valores de λ determinados anteriormente. De este modo, se concluye que no existen diferencias significativas respecto al rendimiento de ambos métodos en muestras con concentraciones bajas de bacteriófagos.

Discusión

Los resultados de los ensayos de susceptibilidad nos permiten concluir que la cepa *E. coli* CB10 tiene una capacidad de detección de colifagos equivalente a la cepa empleada en los métodos estandarizados *E. coli* WG5. Se demostró que el método *Bluephage* tiene también una especificidad muy buena, ya que no presentó ningún falso positivo en 80 muestras negativas en ausencia de colifagos somáticos. Con estos datos, de acuerdo con la distribución de probabilidad de Poisson, el método *Bluephage* proporcionaría falsos positivos en los posibles ensayos realizados en porcentajes inferiores al 1,25%. En conjunto, tanto el método *Bluephage* como su cepa huésped CB10 son específicos para los mismos tipos de colifagos somáticos detectados por las cepas WG5 en los métodos de detección de colifagos somáticos descritos en los protocolos de la ISO.

Los resultados obtenidos de los ensayos se ajustaron a una distribución de probabilidad de Poisson. Esto permitió realizar simulaciones de remuestreo aleatorio *in silico* de los métodos por las que se comprobó que la precisión y especificidad en ensayos de detección de colifagos somáticos en volúmenes de 100 ml es similar para ambos métodos. Mediante una simulación de remuestreo aleatorio empleando muestras de concentración de 1 colifago en 100 ml se comprobó que el rendimiento de ambos métodos en muestras con bajas concentraciones de bacteriófagos no variaba, manteniendo por consiguiente límites de detección similares.

Conclusiones

- *Bluephage* es un método específico y preciso para realizar ensayos rápidos de presencia /ausencia para la detección de colifagos somáticos.
- La sensibilidad de *Bluephage* no difiere de la sensibilidad mostrada por el método ISO
- El límite de detección del método *Bluephage* es de 1 UFP por 100 ml.
- El método *Bluephage* es aplicable en el análisis de muestras de 100 ml requerido por las normativas de aguas de la UE y la OMS.

(Nota: Los medios, tampones, protocolos, plásmidos y cebadores empleados en este artículo se encuentran descritos en los Anexos 2-5.)

OPEN

Bluephage, a method for efficient detection of somatic coliphages in one hundred milliliter water samples

Javier Méndez*, Daniel Toribio-Avedillo, Raquel Mangas-Casas & Judit Martínez-González

Emerging water quality guidelines and regulations require the absence of somatic coliphages in 100 mL of water, yet the efficiency of standardized methods to test this volume of sample is questionable. A recently described procedure, Bluephage, using a modified *E. coli* host strain, overcomes some of the methodological limitations of standardized methods. In a maximum of 6.5 hours (2.5 hours for pre-growing the host strain and 4 hours for the presence/absence test), Bluephage allows the direct detection of one plaque-forming unit (PFU) in a 100 mL water sample. The test shows high levels of specificity for somatic coliphages and comparable accuracy with standardized methods.

Coliphages, viruses infecting *Escherichia coli*, have been included or are being considered for inclusion in water quality regulations and guidelines around the world^{1–6}. Some of these regulations, such as those for different types of drinking water^{5,6}, prescribe or recommend the absence of somatic coliphages in 100 mL water samples.

Widely accepted standardized methods for determining somatic coliphages are available^{7–9}. The host strains and media endorsed in the ISO (International Organization for Standardization) standard 10705-2:2000⁷ and the USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) 1601 and 1602 methods^{8,9} provide similar results^{10–12}. To determine coliphage absence in 100 mL water samples, which requires analysis of the full 100 mL volume, the following standardized procedures are currently used: (1) the presence/absence test according to ISO or USEPA; (2) the double agar layer (DAL) assay as indicated in ISO⁷, which requires the concentration of phages in 100 mL of water sample followed by phage enumeration in the full concentrate, and (3) the USEPA's single agar layer (SAL) assay⁸, which is applied to 10 replicas of 10 mL. According to ISO and USEPA standards, the presence/absence test requires 2 steps (enrichment and spot test) and needs more than one working day to obtain results. On the other hand, both the concentration^{13,14} and SAL procedures are complex and suffer from loss of efficiency in coliphage recovery^{10,15}. Feasible, efficient, fast and user-friendly methods to determine the presence of coliphages in 100 mL water samples are therefore required. Recent progress in this field^{16–18} includes the development of Bluephage method¹⁸, whose application can facilitate the routine implementation of somatic coliphage determination in laboratories with minimal equipment and expertise requirements.

To detect phage concentrations as low as one in a given volume is challenging, as viral particles have an uneven spatial distribution in watery suspensions, theoretically following the Poisson model¹⁹. Accordingly, to assess the accuracy and detection limit of different phage determination methods, a statistical approach was used to calculate the distribution in aliquots of suspension and consequently the expected percentage of positive samples in a set of recipients prepared to contain about one phage per 100 mL.

The aim of this study was to compare the accuracy of the Bluephage method in testing for the presence/absence of somatic coliphages in 100 mL volumes of water, as well as to assess its specificity and detection limit compared to the reference method ISO-DAL.

Materials and Methods

Bacteriophage enumeration. The ISO DAL standardized method⁷ was used to count somatic coliphages.

Susceptibility of host strains GW5 and CB10 to different coliphages. The sensitivity of both host strains to coliphage isolates was tested with pure cultures of phages of our lab library, some of them coming from

Department of Genetics, Microbiology and Statistics. Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028, Barcelona, Spain. *email: jmendez@ub.edu

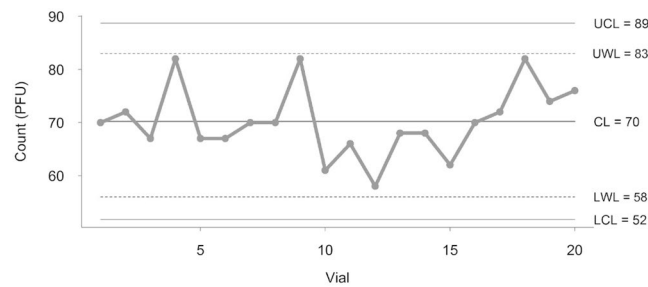


Figure 1. Control chart of the reference material used for the comparison test. UCL, UWL, CL, LWL and LCL, refer to, respectively, the upper control limit (+3 sigma), the upper warning limit (+2 sigma); the central line (mean value), the lower warning limit (-2 sigma) and LCL lower control limit (-3 sigma).

culture collections and others isolated by us and characterized by electron microscopy²⁰. The spot test performed according to ISO⁷ was carried out with bacteriophages belonging to different families of somatic bacteriophages: *Microviridae* (Phi X174 and M4), *Myoviridae* (SOM 1, SOM 3, SOM 5, SOM 8, SOM 15, SCH2, SCH10 and STER 5), *Podoviridae* (933 W), *Siphoviridae* (SOM 4, SOM7, SOM 28, SSAU 9, MAR 1 and SCH4) and *Tectiviridae* (PDR1). Moreover, F-specific bacteriophages were tested: *Inoviridae* (F1) and *Leviviridae* (MS2, GA and Q3).

As well, the cross-reaction with phages partially purified from well-isolated and visually different plaques on the two strain by was tested. Plaques were obtained applying the ISO DAL method to a variety of fecally polluted water samples. Thus, 30 plaques obtained on WG5 and 30 on CB10, were purified and their capability to infect was tested by the spot test in both WG5 and CB10 strains.

Reference coliphage suspensions. Reference suspensions of naturally occurring somatic coliphages were prepared according to Méndez *et al.*²¹. Briefly, influent raw sewage from a wastewater treatment plant was centrifuged for 10 min at $2000 \times g$, and the supernatant was filtered through $0.22 \mu\text{m}$ low protein-binding polyethersulfone membrane filters. The naturally occurring somatic coliphages in the resulting suspensions were quantified and after dilution concentrations ranging from 50 to 100 PFU per mL were obtained. Glycerol was added to give a final concentration of 5 or 10% (v/v). The suspensions were distributed into vials of 1.5 or 2.5 mL and stored at $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$.

Quality control of the reference suspension. The quality and stability of the reference phage suspension was monitored by a control chart prepared in accordance with van Dommelen²². For this purpose, 20 vials of each batch were enumerated on different days. Based on the results, the mean (\bar{x}) and sigma (s) were calculated and then the warning limits ($\bar{x} \pm 2s$) and control limits ($\bar{x} \pm 3s$). In each successive experiment, one vial of the batch was analyzed, and the result was included in the chart. Results were considered out of control in the case of a single violation of the control limit ($\bar{x} \pm 3s$) and if two out of three observations in a row exceeded the same warning limit ($\bar{x} \pm 2s$). Figure 1 shows the control chart of the phage suspension used.

Presence/absence in 100 ml of water by Bluephage. Briefly, an aliquot of a freeze-dried culture of *E. coli* strain CB10¹⁸, containing about 10^9 cells, was suspended in 10 mL of Modified Scholtens' Broth (MSB)⁷. The mixture was incubated at $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ for 2.5 hours with gentle shaking. When ready, 10 mL of the culture was added to a 100 mL volume of water for testing. The culture was previously obtained using a dry culture medium (fast kit BPF-SPA, Bluephage S. L., Barcelona) containing the necessary compounds to obtain the exact broth composition as described by Muniesa *et al.*¹⁸. The water sample receiving the CB10 culture was swirled gently until thoroughly mixed and incubated at $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$. The test results were read after 3.5 hours and the incubation was never extended more than 4 hours from the beginning.

Detection performance. Detection was performed over a period of several weeks and by two different operators, who each carried out a similar number of tests. The control chart of the reference suspension was used throughout this period, in accordance with the quality control schemes followed, and there were no deviations in the counts. Aliquoted volumes of $10 \mu\text{L}$, $25 \mu\text{L}$, $75 \mu\text{L}$ and $100 \mu\text{L}$ of the reference suspension were titrated by the ISO DAL assay⁷ and equal quantities of the reference suspension were added to containers containing 100 mL of commercial mineral water, and submitted to a presence-absence test with Bluephage, as described above.

As negative control for Bluephage method, 80 commercial mineral water samples were analyzed.

Statistical analysis. The Kolmogorov-Smirnov test (KS), the Akaike information criteria (AIC), the test of equal or given proportions and Wilcoxon test were carried out under R, version 3.5.3²³. Distribution fitting was done using the library *fitdistrplus*, version 1.0-14²⁴. Statistical bootstrapping was completed using the library *boot*, version 1.3-20^{25,26}. In addition, the most probable number (MPN) of coliphage concentrations in the bacteriophage suspensions without 100% positive detection frequency was calculated using the library *MPN*, version 0.3.0²⁷, calculating the confidence intervals using the Jarvis approach²⁸.

Results and Discussion

Both the host strains and the method are specific for those somatic coliphages that are also detected by the strain WG5 and the ISO DAL method.

| Method | | | | | | | |
|---------------|----|--|----------------------------------|---------------------------------|--------|-----------|---------------------------------|
| Control Chart | | | ISO-DAL | | | Bluephage | |
| Vol. tested | n | Central line (control limits) ^a | Mean and (95% C.I.) ^b | MPN and (95% C.I.) ^c | % pos. | % pos. | MPN and (95% C.I.) ^c |
| Method | | | | | | | |
| 0 µl | 80 | 0 | 0 | 0 (0–0.037) | 0 | 0 | 0 (0–0.037) |
| 10 µl | 42 | 0.70 (0.52–0.89) | 0.45 (0.26–0.62) | 0.51 (0.32–0.84) | 40.4 | 38.1 | 0.48 (0.29–0.79) |
| 25 µl | 18 | 1.80 (1.30–2.23) | 1.78 (0.94–2.50) | 1.28 (0.72–2.29) | 72.2 | 72.2 | 1.28 (0.72–2.29) |
| 75 µl | 10 | 5.3 (3.90–6.69) | 5.60 (4.30–6.90) | Non computable | 100 | 100 | Non computable |
| 100 µl | 10 | 7.00 (5.20–8.92) | 10.10 (7.50–12.10) | Non computable | 100 | 100 | Non computable |

Table 1. Results after enumeration using the ISO DAL method and presence/absence with the % of positive enrichments using the Bluephage method. ^aTheoretical values of the reference material according to the inoculated volume, theoretical mean and control limits; ^bmean and confidence intervals obtained by statistical bootstrapping; ^cMPN and confidence interval calculated according to Jarvis²⁶.

| Vol. tested | AIC | | | Distribution | p-value* | λ | C.I. of λ | |
|-------------|---------|---------------|--------|--------------|----------|-------|-----------|-------|
| | Poisson | Neg. Binomial | Normal | | | | 2.5% | 97.5% |
| 10 µl | 72.92 | 74.92 | 78.25 | Poisson | 0.261 | 0.452 | 0.286 | 0.643 |
| 25 µl | 67.18 | 67.49 | 72.40 | Poisson | 0.427 | 1.778 | 1.056 | 2.611 |
| 75 µl | 46.10 | 48.10 | 48.15 | Poisson | 0.155 | 5.600 | 4.100 | 7.000 |

Table 2. Summary of the parameters of the preferred probability distribution functions for each volume of the reference materials titrated by the ISO DAL assay. *Chi-squared p-value.

| Vol. tested | n | Positive samples (%) | | | Wil. test [§] |
|-------------|----|----------------------|--------|-----------|------------------------|
| | | Theoretical | ISO | Bluephage | p-value |
| 10 µl | 42 | 36.59 | 40.40 | 38.10 | >0.05 |
| 25 µl | 18 | 83.20 | 72.22 | 72.22 | >0.05 |
| 75 µl | 10 | 99.65% | 100.00 | 100.00 | * |

Table 3. Comparison between the number of positive samples assuming the Poisson probability distribution functions. [§]Wilcoxon test results (both comparisons); * non-computable.

Strain CB10 was, as it is strain WG5, susceptible of being infected by 18 bacteriophages belonging to five families of somatic coliphages, four of them being the most frequently observed in faecally contaminated waters²⁹. As well, both strains were sensitive to 60 recent bacteriophage isolates, and thus strain CB10 follows being susceptible to phages infecting WG5 and all phages isolated in CB10 infect strain WG5. In contrast, neither strain WG5 nor strain CB10 were susceptible to the F-specific bacteriophages tested. Consequently, it can be deduced that there is not change in phage susceptibility of strain CB10 with respect to strain W5.

None of the 80 negative controls changed to blue in 4 hours, indicating an absence of phages. The Bluephage method therefore showed a very good specificity, showing no false positive results in 80 samples, or according with the Poisson distribution, with lesser than 1.25% of false positives.

Thus, it can be concluded that both the host strains and the method are specific for those somatic coliphages that are also detected by the strain WG5 and the ISO DAL method.

The phage concentration values obtained by the different methods are displayed in Table 1. The bacteriophages counted by the ISO DAL assay in 10, 25 and 75 µL volumes of the reference suspension as well as the theoretical numbers calculated from the control chart of the reference suspension both fitted a Poisson distribution better than a binomial or a normal distribution (Table 2). The AIC were applied as selection criteria, and the KS test was carried out to verify that the real counts and calculated probability distribution functions did not differ statistically. Accordingly, the Poisson distribution of the theoretical values in 10 µL, 25 µL and 75 µL of the reference suspension allowed the prediction of the number of positive detections in these three volumes, which was compared with the number of positive detections obtained with the ISO DAL and Bluephage methods (Table 3).

The rate of positive detections using Bluephage method was identical ($p > 0.05$, test of equal or given proportions) to that of the theoretical test and the ISO DAL assay.

The content of all containers receiving 75 µL and 100 µL of the reference phage suspension turned blue after 4 hours, indicating the presence of phages, and the ISO DAL assay gave always-positive counts. Therefore, the

results corresponding to tests where 100 μL of the reference suspension was added to 100 mL were not included in the determination of accuracy and detection limit.

The containers receiving 10 μL and 25 μL of the reference suspension showed different percentages of positive/negative detections as it is shown in Table 1. In addition, zero-values were detected in a number of tests by the ISO DAL assay carried out in parallel. From the results of the Bluephage method (positive/negative) for each inoculated volume, it was possible to determine the mean value expressed as MPN of bacteriophages in 100 mL of the inoculated samples (Table 2). These values fit with the theoretical numbers added to each container according to the phage concentration of the reference suspension and the counts obtained using the ISO DAL assay.

Moreover, using the Poisson distributions derived from the percentage of positive samples (Table 3) inoculated with 10 μL and 25 μL a bootstrapping simulation for the Bluephage method was carried out to calculate the accuracy and specificity of this method. Briefly, the first step for it was determining the λ -parameters, which were estimated assuming the percentage of negative samples as the probability of 0-counts. Then, 10,000 runs were simulated for the 42 counts inoculating 10 μL and for the 18 counts inoculating 25 μL . Counts containing ≥ 1 phage were considered positive. The simulated mean values of positive and negative samples were compared to the real values obtained with ISO-DAL in order to calculate the accuracy and the specificity of the method. After the simulation the mean accuracy value was 96.67% with a confidence interval of 92.67 to 99.33%; as well, the mean specificity value was 97.78% with a confidence interval ranging from 94.3 to 100%, which fits with the showed results with the sensitivity test performed.

According to these results, the Bluephage method was as accurate as the ISO DAL assay for somatic coliphage detection in 100 mL water samples.

The limit of detection was calculated from the proportions of 10 μL -inoculated samples, titrated following the ISO DAL procedure, that contained 1 bacteriophage, versus the proportion of positive samples (≥ 1 bacteriophage) detected using Bluephage method. The percentage of positive samples for the ISO DAL and Bluephage methods were 35.71% and 38.01%, respectively (Table 3). As the Poisson distribution describes the probability of n number of events occurring in an interval given an average rate (λ), when $n = 0$, the probability function can be described as $e^{-\lambda}$. In this particular case, the estimated λ -values for samples titrated according to the ISO DAL method and tested by Bluephage method were 0.4418 and 0.4796, respectively. To check for any statistical difference between both values, a bootstrapping analysis was carried out to determine the interval of λ -values, which did not statistically differ from the λ -value of ISO DAL when the KS test was applied. The interval of λ -values ranged from 0.4032 to 0.4826, indicating that the performance of Bluephage method applied to samples containing low bacteriophage concentrations did not differ from the ISO DAL titration.

Summarizing, it can be concluded that the Bluephage method is a specific, accurate and a rapid presence/absence feasible method to detect somatic coliphages, with a detection limit of 1 PFU per 100 mL, applicable to 100 mL water samples.

Received: 1 November 2019; Accepted: 7 February 2020;

Published online: 19 February 2020

References

- HMRC, NRMCC. 2011. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra. ISBN Online: 1864965118, <https://www.nhmrc.gov.au/sites/default/files/documents/NHMRC%20ADWG%206%20-%20Version%203.5%20-%20Proof%203.pdf> (2011).
- U.S. EPA. National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule. Final Rule; 40 CFR Parts 9, 141 and 142. Federal register, vol. 71 FR 65573, <https://www.federalregister.gov/documents/2006/11/08/06-8763/national-primary-drinking-water-regulations-ground-water-rule> (2006).
- Bureau of Indian Standards. 2012. Indian Standard 10500: 2012. Drinking water – specification (Second Revision). ICS 13.060.20. New Delhi, <http://cgwb.gov.in/Documents/WQ-standards.pdf> (2012).
- República de Colombia. Decreto no 1287. Criterios para el uso de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales. Gobierno de Colombia. Ministerio de Vivienda Ciudad y Territorio. Bogotá, <http://www.minvivienda.gov.co/Decretos%20Vivienda/1287%20-%202014.pdf> (2014).
- European commission. Document 52017PC0753. Proposal for a DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the quality of water intended for human consumption (recast). COM/2017/0753 final - 2017/0332 (COD). Brussels, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=COM%3A2017%3A753%3AFIN> (2017).
- World Health Organization. Potable reuse: Guidance for producing safe drinking-water. Geneva. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, <http://www.who.int/iris/handle/10665/258715> (2017).
- International Organization for Standardization. ISO 10705-2: Water Quality — Detection and Enumeration of Bacteriophages. — Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages, Geneva, Switzerland (2000).
- U.S. EPA. Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. EPA 821-R-01-029. Office of Water, Engineering and Analysis Division, Washington, DC. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method_1602_2001.pdf (2001).
- U.S. EPA. Method 1601: Detection of Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-Step Enrichment Procedure. EPA 821-R-01-030 Office of Water, Engineering and Analysis Division, Washington, DC, https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method_1601_2001.pdf (2001).
- Grabow, W. O. K., Very, A., Uys, M. & de Villiers, J. C. Evaluation of the Application of Bacteriophages as Indicators of Water Quality; WRC Report No. 540/1/98. *Water Research Commission; Pretoria, South Africa*, ISBN 1868453421, 9781868453429 (1998).
- Schaper, M. & Jofre, J. Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *Journal of Virological Methods* **89**, 1–10, [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00171-3) (2000).
- Guzmán, C., Mocé-Llivina, L., Lucena, F. & Jofre, J. Evaluation of the Escherichia coli host strain (CB390) for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 531–534, <https://doi.org/10.1128/AEM.01710-07> (2008).
- Ikner, L. A., Gerba, C. P. & Bright, K. R. Literature Review. Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. *Food Environ Virol.* **4**(2), 41–67, <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2> (2012).

14. Méndez, J. *et al.* Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water. *J. Virol. Methods* **117**, 19–25, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.013> (2004).
15. Mooijman, K. A., Bahar, M., Contreras, N. & Havelaar, A. H. Optimisation of the ISO-method on enumeration of somatic coliphages (draft ISO 10705-2). *Water Sci. Technol.* **43**(12), 205–208, <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0739> (2001).
16. Salter, R. S., Durbin, G. W., Conklin, E., Rosen, J. & Clancy, J. Proposed modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol validation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**(23), 7803–7810, <https://doi.org/10.1128/AEM.01235-10> (2010).
17. Salter, R. S. & Durbin, G. W. Modified USEPA method 1601 to indicate viral contamination of groundwater. *J. Am. Water Works Assoc.* **104**, 480–488, <https://doi.org/10.5942/jawwa.2012.104.0115> (2012).
18. Muniesa, M. *et al.* Bluephage: A rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water. *Water Res.* **128**, 10–19, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.030> (2018).
19. Maul, A. Echantillonnage et inférence statistique (pag. 36–61), Louis Schwartzbrod (ed), Virologie des milieux hydriques. Tec & Doc/Lavoisier, Paris. ISBN-10: 2852067536; ISBN-13: 978-2852067530 (1999).
20. Muniesa, M., Mocé-Llivina, L., Katayama, H. & Jofre, J. Bacterial host strains that support replication of somatic coliphages. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**(4), 305–315, <https://doi.org/10.1023/A:1023384714481> (2003).
21. Méndez, J. *et al.* Conservation of phage reference materials and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. *J. Virol. Methods* **106**, 215–224, [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00163-5) (2002).
22. van Dommelen, J. A. Statistics for the use of microbiological (Certified) Reference Materials. Report 281008008. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands (1995).
23. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/> (2019).
24. Delignette-Muller, M. L. & Dutang, C. fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions. *J. Stat. Softw.* **64**(4), 1–34, <http://www.jstatsoft.org/v64/i04/> (2015).
25. Canty, A. & Ripley, B. boot: Bootstrap R (S-Plus) Functions. *R package version 1*, 3–20 (2019).
26. Davison, A. C. & Hinkley D. V. Bootstrap Methods and Their Applications. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN: 0-521-57391-2 (1997).
27. Ferguson, M. & Ihrie, J. MPN: Most Probable Number and Other Microbial Enumeration Techniques. R package version 0.3.0. <https://CRAN.R-project.org/package=MPN> (2019).
28. Jarvis, B., Wilrich, C. & Wilrich, P. T. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1660–1667, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x> (2010).
29. Muniesa, M., Lucena, F. & Jofre, J. Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 402–409, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00833.x> (1999).

Acknowledgements

This work has been partially supported by the Aquaphage project (2016 PROD 00030, AGAUR, Catalan Government) by the Regional Development Fund (FEDER) of the European Union (FEDER 2014–2020 Operational Program). The authors thank Prof. Maite Muniesa for the transfer of a library of bacteriophages used in this work.

Author contributions

All authors contributed to all features of the paper. D.T.-A. contributed to the susceptibility of host test. R.M.-C. and J. M.-G. contributed in the making of reference materials and both took part in the bacteriophage titration. J.M. performed the statistical analysis. All authors read and contributed to the preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

4.3 Artículo 3:

Evaluación de nuevos componentes en el medio Modificado de Scholten para la detección de colifagos somáticos

Daniel Toribio-Avedillo, Javier Méndez, Maite Muniesa, Anicet R. Blanch

Food Environ Virol. 2020 Jun; 12 (2):148-157. DOI: 10.1007/s12560-020-09419-z.

Introducción

La evaluación de la calidad microbiológica del agua se ha basado tradicionalmente en la utilización de indicadores bacterianos. A lo largo de las décadas se han realizado mejoras perfeccionando su uso (Ashbolt et al., 2001; Feachem et al., 1983). No obstante, tienen ciertas limitaciones, ya que no son siempre representativos del comportamiento de otras clases de microorganismos como los virus, hongos o protozoos. Como consecuencia, especies patógenas de dichos grupos podrían resultar problemáticas a la hora de identificar o trazar su origen basándose exclusivamente en información de indicadores bacterianos. Es por ello que diversas especies y grupos de microorganismos han sido propuestos como indicadores alternativos para estos grupos no bacterianos, complementarios a los indicadores bacterianos. Los bacteriófagos entéricos se han propuesto como indicadores fecales víricos para ser aplicados en agua, alimentos y biosólidos (Havelaar et al., 1986; Hsu et al., 2002; Jofre, 2007; Kott et al., 1974).

Los bacteriófagos entéricos son parásitos intracelulares obligados que abundan en el intestino de los animales. Infechan a bacterias entéricas de forma específica y generalmente no se replican en el ambiente (Brion et al., 2002; Muniesa and Jofre, 2004). En función de la localización de infección o las cepas a las que infectan se han propuesto los siguientes grupos: colifagos somáticos, colifagos F-específicos y bacteriófagos que infectan a *Bacteroides* spp. Existen métodos estandarizados (ISO) validados para la detección de cada uno de estos grupos de bacteriófagos. Debido a su gran utilidad, hay normativas que ya los incluyen como indicadores fecales víricos en aguas (North Carolina Administration 2011; Republica de Colombia 2014; Western Australian Government 2012) incluidas directivas en la UE (The European Parliament and the Council of the European Union 2020b, 2020a).

Los colifagos somáticos son buenos indicadores de contaminación fecal gracias a que están generalmente presentes en mayores concentraciones que los colifagos F-específicos en

muestras ambientales contaminadas fecalmente. En la UE se usa para su detección el método de la doble capa (DAL) descrito en las normativas ISO 10705-2 (somáticos) e ISO 10705-1 (F-específicos). En el método ISO 10705-2 se emplea el medio Modified Scholten (MS) tanto para el crecimiento de la bacteria huésped como durante los ensayos de detección de colifagos. Al estar presente durante todos los pasos del ensayo, las mejoras en la eficiencia del medio podrían contribuir a mejoras en el rendimiento del método. Este medio está formulado con una concentración de nutrientes muy elevada que le permite ser muy eficiente para el crecimiento bacteriano y para la detección de colifagos somáticos. La concentración es tan elevada que podría ser incluso excesiva, de manera que la reducción de la concentración de dichos componentes podría ayudar a ahorrar en los costes de los análisis. Por otro lado, la adición de nuevos componentes podría optimizar el crecimiento de las cepas huésped y/o la infección de los colifagos. Estos fueron los dos campos de estudio que se plantearon para la búsqueda de mejoras en el medio de cultivo.

Objetivos

Para este estudio se han planteado los siguientes objetivos en relación con el medio MS:

- Estudiar la influencia de la incorporación de nuevos componentes presentes en otros medios de crecimiento de *E. coli* al medio MS en el crecimiento de la cepa huésped *E. coli* WG5, la detección de colifagos somáticos y el coste de los análisis.
- Valorar la influencia de la reducción de los componentes del medio MS en el crecimiento de la cepa huésped *E. coli* WG5, la detección de colifagos somáticos y el coste de los análisis.
- Comprobar la existencia de posibles sinergias entre las diferentes vías de mejora estudiadas y determinar las mejores combinaciones posibles.

Resultados

En primer lugar, se estudiaron las posibles mejoras en el crecimiento de la cepa huésped debido a la inclusión de nuevos componentes en el medio MS. En base a los componentes de otros medios selectivos de *E. coli*, se seleccionaron 8 posibles componentes cuya presencia podría beneficiar el crecimiento de la cepa y/o detección de colifagos somáticos mediante el método DAL. Los componentes seleccionados y sus concentraciones están recogidos en la Tabla 1. Se llevó a cabo un diseño de experimento 2^k de Plackett-Burman (Plackett and Burman, 1946)

doblado con un tamaño de $N=24$ para 8 factores con 2 niveles con estos 8 componentes para determinar cuáles influyen significativamente en el crecimiento. Dicho experimento se realizó como un primer cribado, minimizando el número de ensayos necesario en comparación con un diseño factorial completo. Utilizando las combinaciones establecidas por este diseño, se realizó el análisis del crecimiento bacteriano mediante la técnica de Miles-Misra-Irwin (Miles et al., 1938). Los resultados de este cribado inicial determinaron 3 componentes cuya presencia influenciaba significativamente el crecimiento bacteriano: laurilsulfato de sodio, deoxicolato de sodio e hidrogenofosfato de sodio.

Con los 3 componentes más importantes ya definidos, se realizó un diseño factorial completo (Christen and Raimbault 1991; K. W. Davies 1993) de 3^3 con 3 diferentes posibles concentraciones para cada uno de los componentes. El objetivo del ensayo era determinar las concentraciones óptimas de cada uno de los componentes y posibles sinergias entre ellos. De entre todas las combinaciones ensayadas, las siguientes fueron las más destacadas: L0_D0_H0.5; L0_D0_H1 y L0_D1_H1, cuyas composiciones están descritas en la Tabla 2.

Tras la selección de estas combinaciones, se realizó de manera independiente un análisis con un posible componente inhibitorio: el propionato de sodio. Este compuesto es empleado en industrias alimentarias para eliminar el crecimiento de microbiota acompañante. En los análisis realizados se observó que el medio P4 (con 4 g/L de propionato de sodio añadido) presentaba resultados significativamente mejores respecto al crecimiento de la cepa bacteriana en el medio original mediante el método de Miles-Misra-Irwin.

El siguiente objetivo fue determinar la influencia de la dilución del medio MS original en el crecimiento de la cepa huésped *E. coli* WG5. En la Figura 3 se pueden observar las diluciones realizadas y los resultados obtenidos de los ensayos de crecimiento bacteriano y velocidad de crecimiento. De entre dichas diluciones, las diluciones de 1/2, 1/3 y 1/4 no resultaron significativamente perjudiciales para el crecimiento de la cepa ($p>0,05$), aunque se observaron diferencias en cuanto a la velocidad de este crecimiento. En las curvas de crecimiento se observó que la única dilución que no afectaba significativamente de manera negativa a la velocidad de crecimiento era aquella cuya concentración del medio original estaba diluida a la mitad ($p>0,05$).

Con los datos obtenidos en los análisis previos, se planteó un estudio de la velocidad de crecimiento de las combinaciones de componentes favorables seleccionadas en combinación con una posible dilución del medio. Los resultados de las curvas de crecimiento observadas se

presentan en la Figura 4. Aunque alguna de estas combinaciones permitió un crecimiento más rápido que el medio original, ninguna de ellas obtuvo un resultado significativo. En cambio, se observó un perjuicio significativo en la velocidad de crecimiento en el medio P4 tanto en presencia como ausencia de la dilución del medio original ($p < 0,05$).

La influencia en la detección de colifagos somáticos mediante el método DAL de las combinaciones de componentes más favorables tanto en el medio MS original como la dilución 1/2 del mismo está representada en la Figura 5. Los recuentos de colifagos de este análisis concluyeron que ni la adición de estos nuevos componentes ni la dilución del medio original afectaban de manera significativa a la detección de colifagos somáticos mediante la metodología DAL ($p > 0,05$).

Se realizó una estimación del coste por muestra de cada uno de los medios propuestos en comparativa con el coste del medio original. Los costes fueron calculados teniendo en cuenta la necesidad de 10 placas para el ensayo y los precios comerciales de cada componente (Tabla 3). Se determinó que la adición de componentes nuevos al medio podría suponer hasta un 5% de aumento en el coste como máximo, que es el caso del propionato de sodio. En cambio, la dilución del medio original ayuda a paliar estos posibles incrementos causados por la adición de componentes en gran medida, ya que resulta en todos los casos en reducciones de entre el 27 % y el 33 % de los costes analíticos en función de componentes adicionales.

Discusión

Cuatro de los nueve componentes ensayados tuvieron un efecto significativamente positivo en el crecimiento bacteriano: el laurilsulfato de sodio, el deoxicolato de sodio, el hidrogenofosfato de sodio y el propionato de sodio. Sin embargo, ninguno de ellos favoreció significativamente la detección de colifagos mediante el método DAL ni la velocidad de crecimiento de la bacteria huésped. Pese a ello, se observó que existe una posible sinergia entre el deoxicolato de sodio y el hidrogenofosfato de sodio observada en relación con el crecimiento de la cepa huésped y posiblemente su tasa de crecimiento. Estudios más exhaustivos respecto a estos componentes y sus posibles efectos sinérgicos podrían acarrear una reducción en tiempos de análisis de enumeración de colifagos. No obstante, con los datos actuales se requerirían más análisis confirmatorios evaluando las posibles variaciones en las concentraciones de los componentes y como afectan a la sinergia observada.

Por otra parte, se observó que la dilución a la mitad de la concentración original del medio MS no conlleva ningún efecto perjudicial en ninguno de los parámetros contemplados en este estudio. Esto confirma la hipótesis inicial de que la concentración de nutrientes en el medio MS es innecesariamente elevada y se puede reducir. La reducción permitiría ahorrar costes y facilitar el uso del medio MS en análisis de muestras con un elevado volumen. Un ejemplo son los cultivos de enriquecimiento para el ensayo de presencia/ausencia de las metodologías de la ISO para la detección de colifagos. Este método usa una versión 2 veces concentrada del medio MS para evitar la posible dilución del mismo causada al añadir el mismo volumen de la muestra. Teniendo en cuenta la posibilidad de dilución del medio original, se podría utilizar el MS original ya que su dilución a la mitad no conlleva efectos perjudiciales ni en el crecimiento ni en la detección de colifagos. Esto supondría un ahorro considerable en el coste del ensayo como se comprobó al realizar los análisis de costes. Esta reducción también favorece el desarrollo de kits o pruebas optimizadas para la detección de bacteriófagos, ya que los posibles aumentos en el coste debidos a la inclusión de nuevos componentes pueden verse compensados por la reducción de costes gracias a la dilución.

Conclusiones

- La adición de nuevos componentes al medio MS puede favorecer el crecimiento de la cepa huésped WG5. Además, algunas combinaciones de componentes podrían mejorar la tasa de crecimiento sin alterar la enumeración de bacteriófagos.
- La reducción de la concentración del medio MS es beneficiosa y viable económicamente. Es posible reducir hasta un cuarto la concentración original sin alterar el crecimiento de la bacteria y hasta un medio sin alterar la velocidad de crecimiento bacteriano.
- La dilución del medio original a la mitad se estima que podría ahorrar costes de aproximadamente un 33% respecto al coste original. Este ahorro podría compensar el aumento de coste generado por la introducción de componentes adicionales en el medio.

(Nota: Los medios, tampones, protocolos, plásmidos y cebadores empleados en este artículo se encuentran descritos en los Anexos 2-5.)



Evaluation of New Components in Modified Scholten's Medium for the Detection of Somatic Coliphages

Daniel Toribio-Avedillo¹ · Javier Méndez¹ · Maite Muniesa¹ · Anicet R. Blanch¹

Received: 24 October 2019 / Accepted: 24 January 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Enteric bacteriophages (somatic coliphages, F-specific coliphages or both together) are now recognized as useful viral indicators in water, shellfish, and biosolids and are being progressively included in national and international sanitary regulations. Among them, somatic coliphages have an advantage in that they usually outnumber F-RNA coliphages in water environments. Their enumeration using Modified Scholten's (MS) media, following the ISO 10705-2 standard for the growth of *Escherichia coli* host strain WG5, is highly efficient and a common practice worldwide. These media contain a high concentration of nutrients, which may be modified to save costs without loss of bacterial growth host efficiency. This study explored reducing the concentration of nutrients in the current formulation and/or incorporating new components to improve the host bacterial growth and/or the enumeration of somatic coliphages at an affordable analytical cost. A twofold dilution of the original MS media was found not to affect the bacterial growth rate. The addition of combinations of assayed compounds to twofold diluted MS media slightly enhanced its analytical performance without altering bacterial growth. By generating savings in both cost and time while maintaining optimal results, media dilution could be applied to design new simple applications for coliphage enumeration.

Keywords Somatic coliphages · Bacteriophage · Viral indicators · Water quality · Culture medium

Introduction

For more than a century, the evaluation of the microbiological quality of water has been based mainly on bacterial indicators (Feachem et al. 1983; Ashbolt et al. 2001). After progressive improvements in specific and practical applications and analytical techniques such as membrane filtration methods, defined substrate methods, or microbial source tracking (Ashbolt et al. 2001; Farnleitner and Blanch 2017), bacterial indicators are a key contributor to the control of waterborne infectious diseases. However, bacteria have certain limitations, for example, they are not always representative when used as indicators of pathogenic viruses in certain situations and water treatments in both developed and developing countries (Borchardt et al. 2004; Gerba et al. 1979; Grabow 2001; Keswick et al. 1984; Payment et al.

1997). As an alternative, in the last decades, enteric bacteriophages have been proposed as viral indicators in water as well as food and biosolids (Havelaar et al. 1986; Hsu et al. 2002; Jofre 2007; Kott et al. 1974; WHO 2017a, b).

Enteric bacteriophages are obligate intracellular microorganisms (Adams 1959) that are abundant in the guts of animals, infect specific enteric bacteria, and generally do not replicate in the environment (Brion et al. 2002; Muniesa and Jofre 2004). Three main groups of bacteriophages have been proposed as improved indicators for viral fecal pollution: somatic coliphages (infecting *Escherichia coli* through the cell wall), F-specific phages (infecting *E. coli* and other enterobacteria through the sex pili encoded by the F-plasmid), and phages of *Bacteroides* spp. (infecting host strains through the cell wall). Standardized methods for the detection of all the bacteriophage groups (ISO 10705-1, ISO 10705-2, US-EPA 1601, US-EPA 1602) (Anonymous 1995, 2000; Anonymous 2003a, b, c) and procedures for validating methods for the concentration of bacteriophages from water (ISO 10705-3) (Anonymous 2003a, b, c) have been developed.

✉ Anicet R. Blanch
ablanch@ub.edu

¹ Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028 Barcelona, Spain

The utility of somatic coliphages, F-specific coliphages, or both together (total coliphages) has been increasingly acknowledged and they are now included as viral indicators for water, shellfish, and biosolids in national and international sanitary regulations (NHMRC and NRMCM 2011; North Carolina Administration 2011; Queensland Government 2005; Republica de Colombia 2014; Republique Française 2014; U.S. EPA. 2016; U.S. EPA 2015; Western Australian Government 2012; Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission 2015). The European Commission recently included coliphages among microbial parameters in a new EU drinking water directive (https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/initiatives/com-2017-753_en) and for the validation of treatment processes in water reuse (https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/initiatives/com-2018-337_en). Scientific reviews, meta-analysis studies, and guidelines also support their use as viral indicators in water monitoring and management practices for different types of water use (U.S. EPA 2015; WHO 2017a; Nappier et al. 2019).

Somatic coliphages usually outnumber F-RNA phages in water environments (Jofre et al. 2016; Mooijman et al. 2005; WHO 2017b; Nappier et al. 2019). They have also been previously reported as good indicators for viral fecal pollution (Armon and Kott 1996; IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991; Jofre 2007). Their enumeration using Modified Scholten's (MS) media (MSB: Modified Scholten's Broth; ssMSA: semi-solid Modified Scholten's Agar; MSA: Modified Scholten's Agar) according to the ISO 10705-2 standard (Anonymous 2000) is commonly performed in conventional laboratories worldwide. These MS media are formulated with a high concentration of nutrients and have proved highly efficient for bacterial host growth and subsequent enumeration of somatic coliphages. Nevertheless, the incorporation of new components used in other culture media for the growth of *E. coli* strains, and/or a reduction of the nutrients in the MS media may improve (i) the growth of the host strain *E. coli* WG5 (ISO 10705-2), providing an optimal layer of bacterial growth, (ii) the recovery of somatic coliphages for their enumeration, and (iii) the costs of the media used for coliphage determination.

In this study, the currently used MS media were modified by incorporating several compounds found in other culture media formulations for *E. coli* and by removing certain components, and the performance of the new medium was assessed.

Material and Methods

Bacteriophages and Bacterial Strains

A pure culture of the somatic coliphage Φ X174 (ATCC 13,706-B1) in laboratory stocks of known concentration (10^9

plaque-forming units/mL) was used as a reference bacteriophage in accordance with the ISO 10705-2 standard. *E. coli* strain WG5 (ATCC 700078) was used as a host strain for somatic coliphages as described in the ISO 10705-2 standard (Anonymous 2000) in assays of growth kinetics and medium optimization by enumeration of colony-forming units (CFU) and plaque-forming units (PFU), respectively.

Medium and Growth Conditions

All the studied media formulations (solid, semi-solid or broth) were used following the established conditions in the ISO 10705-2 standard for the culture of *E. coli* WG5 strain (Anonymous 2000). MSB, MSA, and MSA were used to set up the base values for bacterial growth and later for the enumeration of somatic bacteriophages applying the double agar layer (DAL) method as indicated in the ISO procedure. According to ISO 10705-2, the MSB components are: 10 g/L of peptone, 3 g/L of yeast extract, 12 g/L of meat extract, and 3 g/L of NaCl. For the preparation of MSA, 15 g/L of agar is added to the composition, and for MSA, only 7.5 g/L of agar is added. Additionally, 5 mL of Na_2CO_3 (150 g/L) and 0.3 mL of MgCl_2 (4.14 M) per liter were always added before sterilization. After the sterilization process, the pH was adjusted to 7.0–7.5. Incubation of all media formulations was always performed at 37 °C for 18 h to quantify bacterial growth (by CFU) and somatic coliphages (by PFU).

Colony-Forming Unit Enumeration in the Experimental Media

The growth of *E. coli* strain WG5 in the media containing new compounds was initially assessed by enumerating the CFU using the Miles–Misra–Irwin method (Miles et al. 1938). This consists of making tenfold serial dilutions of a fresh bacterial culture and plating one drop of 10 μL of each dilution in an agar plate of the assayed medium. For every designed medium, six dilutions (from 10^{-2} to 10^{-7}) were inoculated on each plate, each with five replicates (See Fig. 1). MSB was used to prepare the fresh culture of *E. coli* strain WG5. A positive control of MSA was used as the base level reference for statistical analysis of significances for the new media in each assay. For every experiment performed with the new media, a negative control using sterile MSB was also plated.

Bacterial Growth Kinetics of the Assayed Media

The kinetics of bacterial growth were measured by spectrophotometry, observing the increase of optical density at 600 nm (OD_{600}). Growth curves were monitored every 30 min until the culture reached the cell density of $> 10^8$ CFU/mL, when exponential growth stopped.

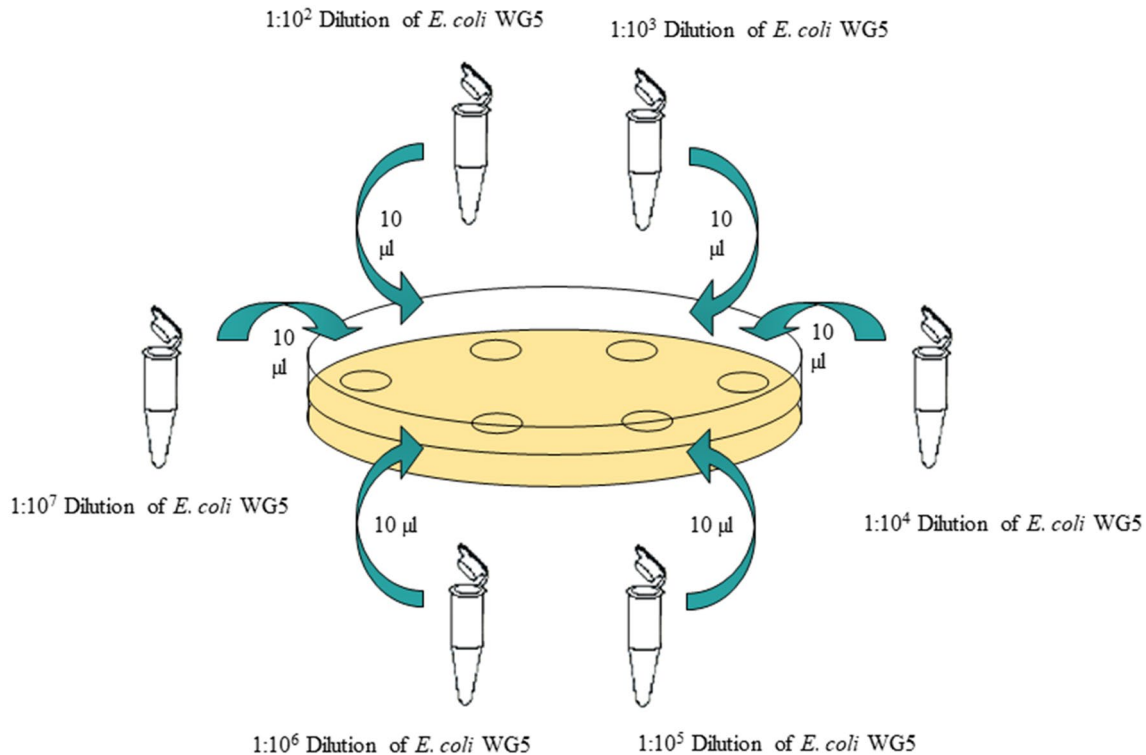


Fig. 1 Schematic representation of Miles–Misra–Irwin method applied for CFU/mL enumeration

According to ISO 10705-2, an exponential phase culture of the bacterial host is needed for bacteriophage enumeration, the main aim of this study.

Plaque-Forming Unit Enumeration in the Experimental Media

PFU of somatic coliphages were counted by the DAL technique and using a host strain *E. coli* WG5 as described in the ISO 10705-2 standard (Anonymous 2000). The DAL technique consists of several steps in which a sample containing bacteriophages, a host strain, and semi-solid agar medium are mixed and plated on MSA plates forming an overlay. Enumeration of PFU was performed after 18–24 h of incubation at 37 °C. In this instance, MS media and ½ MS media were used for the DAL as described in the ISO 10705-2 standard for the detection of a calibrated suspension of the somatic coliphage ΦX174.

New Compounds and Concentrations

Different compounds were added to the MS media to evaluate if they could improve the bacterial growth and/or the enumeration of somatic coliphages. Their selection was based on the composition of other selective media for *E. coli* such as Chromocult, Difco MI, DifcoMTEC, Colilert,

and HardychromEsBL (Atlas 2010). Eight compounds were chosen, each used at two concentrations (Table 1) according to the usual concentrations in other enterobacteria growth media: casamino acids (CAS 91079-40-2), sodium pyruvate (CAS 113-24-6), tryptophan (CAS 73-22-3), thiamine (CAS 67-03-8), sodium lauryl sulfate (CAS 151-21-3), sodium deoxycholate (CAS 302-95-4), disodium hydrogen phosphate dodecahydrate (CAS 10039-32-4), and sodium dihydrogen phosphate (CAS 7558-80-7).

The significance of the effects of the selected eight compounds at two concentrations was determined using the

Table 1 Selected components in the initial design and their concentrations

| Component | Low concentration (L) (g/L) | High concentration (H) (g/L) |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Casamino acids | 1.600 | 8.000 |
| Sodium pyruvate | 0.005 | 1.000 |
| Tryptophan | 0.005 | 1.000 |
| Thiamine | – | 0.026 |
| Sodium lauryl sulphate | – | 0.200 |
| Sodium deoxycholate | – | 0.100 |
| Disodium phosphate | – | 2.700 |
| Sodium dihydrogen phosphate | – | 2.200 |

statistical model 2^k (Christen and Raimbault 1991; Davies 1993), which analyzes the importance of k factors (compounds) in a determinate event (medium definition). Consequently, eight factors ($k=8$) were used for the evaluation, each at two concentrations. These parameters allowed the definition of 2^8 media. In order to minimize the analyses, a folded-over Plackett–Burman design was performed (Plackett and Burman 1946), with a run size of $N=24$ of up to 8 factors. A Plackett–Burman design is a type of screening design that facilitates finding out which factors in an experiment are important, allowing the analysis of a great number of factors without performing a complete factorial design. Therefore, it is a great tool for an initial screening for which factors to concentrate on in the following experiments. Thus, the number of potential media was reduced from 2^8 (factorial design) to 24 combinations with five replicates of each in the Plackett–Burman design. The bacterial strain *E. coli* WG5 was used to evaluate all these media by the enumeration of total CFU. A McFarland no. 3 cell suspension (McFarland 1907) in $0.25\times$ PBS solution was prepared after growing the strain on MSA for 48 h. This suspension used as a reference to adjust the turbidity of bacterial suspensions has a turbidity equal to 9×10^8 CFU/mL of bacterial growth. Tenfold dilutions were made from these suspensions in $0.25\times$ PBS solution. Five replicates of plating for each experimental medium were performed following the Miles–Misra–Irwin method (Miles et al. 1938) which is described in Sect. 2.3 of this article.

From the Plackett–Burman design three compounds were observed to improve significantly bacterial growth in Miles–Misra–Irwin assays. These components were selected for a full factorial design using three different concentrations of each, giving 3^3 possible combinations, in order to determine the optimal concentrations and possible synergies between them. The selected compounds were sodium lauryl sulfate (CAS 151-21-3) [L0=0 g/L of sodium lauryl sulfate; L0.5=0.1 g/L of sodium lauryl sulfate; L1=0.2 g/L of sodium lauryl sulfate], sodium deoxycholate (CAS 302-95-4) [D0=0 g/L of sodium deoxycholate; D0.5=0.05 g/L of sodium deoxycholate; D1=0.1 g/L of sodium deoxycholate] and disodium hydrogen phosphate dodecahydrate (CAS 10039-32-4) [H0=0 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate; H0.5=1.35 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate; H1=2.7 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate]. Once again, bacterial growth was measured using the Miles–Misra–Irwin method as previously described. Combinations of the selected compounds which yielded better CFU/mL results were subjected to further analysis.

After analyzing the initially chosen eight compounds, an additional compound, sodium propionate, was independently assayed at three concentrations with the same methodology. Used in the food industry for inhibiting bacterial growth,

sodium propionate was tested to see if it would facilitate CFU enumeration besides inhibiting the growth of other microorganisms. This would be of interest, as it could contribute to saving time by avoiding the filtration step in ISO guidelines for eliminating accompanying microbiota (Anonymous 2000). Concentrations were the following: sodium propionate (CAS 137-40-6) [P1=1 g/L of sodium propionate; P2=2 g/L of sodium propionate; P4=4 g/L of sodium propionate].

Subsequently, twofold, threefold, fourfold, eightfold, 16-fold, and 32-fold diluted MS media were tested using the Miles–Misra–Irwin method (Miles et al. 1938) for CFU/mL determination, the measurement of OD_{600nm} for growth rate comparison, and the DAL method according to ISO 10705-2 (Anonymous 2000) for PFU/mL enumeration of somatic coliphages. This approach would allow us to determine the feasibility of reducing the concentrations of nutritional components of the established MS media without negatively affecting bacterial growth or bacteriophage detection. The original MS media composition was used as a control in all analyses.

The most favorable combinations of new components and dilutions of the existing ones providing similar results to the original media were assayed for growth rate (OD_{600nm} measurement) and bacteriophage detection (PFU/mL enumeration by the DAL method) to determine the most optimal combinations.

Statistical Analysis

Experimental design, computation of data, and statistical tests were performed using Statgraphics software (Statgraphics Centurion XVI v.16.0.07) (Statpoint Technologies, Inc.). ANOVA analysis with 95% confidence intervals was performed to corroborate the significance of differences observed in the obtained data. *E. coli* and somatic coliphage concentrations were log₁₀ transformed to normalize the data prior to statistical analysis.

Results

Colony-Forming Unit Enumeration in the Experimental Media

The quantification of bacterial growth using the Miles–Misra–Irwin method (Miles et al. 1938) based on the initial factorial design showed differences in growth among the studied compounds. Standardized effects of each component added to the medium are represented in Fig. 2. This Pareto chart shows the absolute values of the standardized effects from the largest to the smallest. The standardized effects are t-statistics that test the null

hypothesis (zero effect). The chart also plots a reference line to indicate which effects are statistically significant considering a significance level of $\alpha = 0.05$, for determining significance in the Pareto chart with 95% confidence intervals. The factors with bar extending beyond the vertical line on the Pareto chart shows significant influence at 95% confidence level. Three of the eight assayed components (sodium deoxycholate (p -value = 0.0039), sodium lauryl sulfate (p -value = 0.0093), and disodium hydrogen phosphate dodecahydrate (p -value = 0.0119)) surpassed this threshold (Fig. 2), thus having a positive influence on bacterial growth. The other 5 components had either a negative effect on growth or a small positive effect that did not reach the significance threshold.

The subsequent experimental design testing these three potentially favorable components yielded better results in bacterial growth in the following combinations (Table 2): L0_D0_H0.5; L0_D0_H1 and L0_D1_H1 (L0 = 0 g/L of sodium lauryl sulfate, D0 = 0 g/L of sodium deoxycholate, D1 = 0.1 g/L of sodium deoxycholate, H0.5 = 1.35 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate; H1 = 2.7 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate).

A similar analysis with the potentially inhibitory component (sodium propionate) was performed independently. Of the concentrations assayed, P4 (4 g/L of sodium propionate added) was the only one that performed significantly better than the original medium (p -value = 0.023).

Altogether, among the designed media, those that yielded a better bacterial growth were MSA supplemented with the following compounds and concentrations: L0_D0_H0.5; L0_D0_H1; L0_D1_H1, and P4 (Table 2). These four higher

performing combinations were selected for further analyses of bacteriophage enumeration and bacterial growth curve assays.

Concentration of the Original MS Medium

The bacterial growth measurements were assayed in MS and several diluted MS media. Results of *E. coli* WG5 growth showed that the original formulation of this medium contains an excessively high concentration of nutrients (Fig. 3a). Thus, the original MS medium can be diluted up to fourfold without causing any significant effect on bacterial growth (1/2 p -value = 0.828, 1/3 p -value = 0.571, 1/4 p -value = 0.236). Higher dilutions of the MS media were significantly detrimental for bacterial growth. (1/8 p -value = 3.63E-04, 1/16 p -value = 1.07E-04, 1/32 p -value = 5.29938E-05).

The comparison in Fig. 3b of different growth curves shows that there were no significant differences in growth for up to twofold dilutions (p -value = 0.949). However, threefold and fourfold dilutions, which were previously considered harmless for bacterial growth in our Miles–Misra–Irwin experiments, reduced the growth rate of *E. coli* cultures and were thus not considered for the following assays.

Growth Curve Analysis of Experimental Media

A global comparison of the growth curves of the remaining media was performed using MSB and twofold diluted MSB (MSB 1/2) as the base media. Concentrations and components added to media are the same as previously

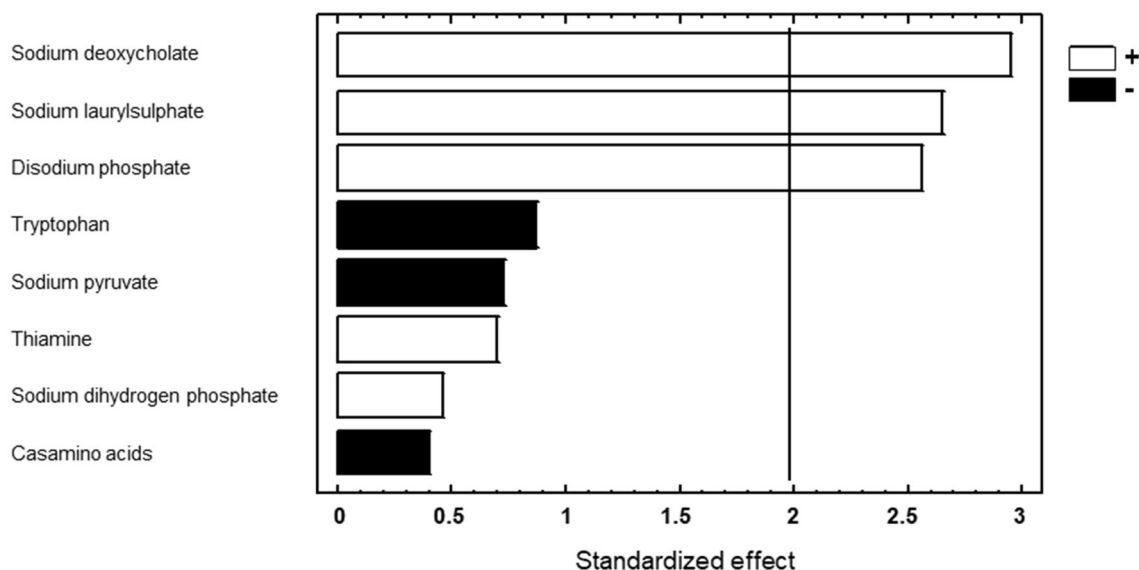


Fig. 2 Standardized effect Pareto chart for bacterial growth measurements (CFU/mL) obtained in Miles–Misra–Irwin assays for the eight studied compounds, marked with (+) if their presence had a positive

effect overall and (–) for negative effects. Vertical line represents a confidence interval of 95%

Table 2 Selected media CFU/mL counts and component concentrations (g/L) in each of them

| Medium | MSB concentration (g/L) | Sodium deoxycholate concentration (g/L) | Disodium phosphate concentration (g/L) | Sodium propionate concentration (g/L) | CFU/mL | SD | <i>p</i> -value |
|--------------------|-------------------------|---|--|---------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| MSB | 28 | – | – | – | 6.09×10^8 | 2.82×10^7 | – |
| MSB L0_D0_H0.5 | 28 | – | 1.350 | – | 6.31×10^8 | 3.21×10^7 | 0.190 |
| MSB L0_D0_H1 | 28 | – | 2.700 | – | 6.43×10^8 | 3.34×10^7 | 0.279 |
| MSB L0_D1_H1 | 28 | 0.100 | 2.700 | – | 6.40×10^8 | 1.14×10^7 | 0.197 |
| MSB P4 | 28 | – | – | 4.000 | 6.57×10^8 | 2.37×10^7 | 0.089 |
| MSB 1/2 | 14 | – | – | – | 6.01×10^8 | 2.71×10^7 | 0.828 |
| MSB 1/2 L0_D0_H0.5 | 14 | – | 1.350 | – | 6.07×10^8 | 3.09×10^7 | 0.632 |
| MSB 1/2 L0_D0_H1 | 14 | – | 2.700 | – | 6.19×10^8 | 3.21×10^7 | 0.873 |
| MSB 1/2 L0_D1_H1 | 14 | 0.100 | 2.700 | – | 6.16×10^8 | 1.10×10^7 | 0.429 |
| MSB ½ P4 | 14 | – | – | 4.000 | 6.45×10^8 | 2.32×10^7 | 0.254 |

L sodium lauryl sulfate, *D* sodium deoxycholate, *H* disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, *P* sodium propionate

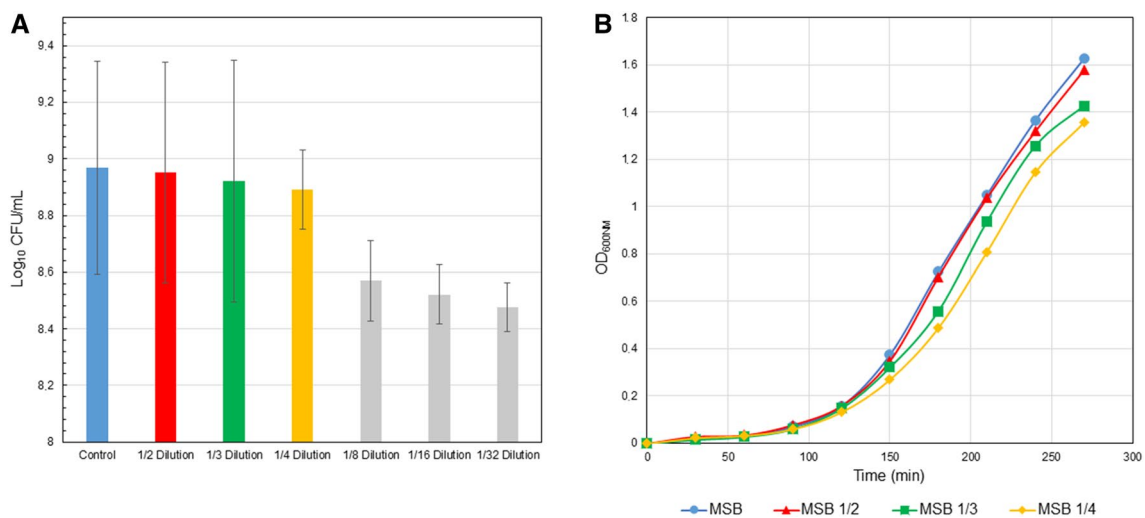


Fig. 3 **a** Bacterial growth (CFU/mL) determined using Miles–Misra–Irwin method for evaluating several dilutions of the original formulation of MSB and MSA medium, which were utilized as controls for these experiments. **b** Growth curves of *E. coli* WG5 (OD₆₀₀) in

several diluted MSB medium concentrations measured until reaching stationary phase. MSB medium was used as control for the experiment

described in Table 2. Media L0_D0_H0.5 and L0_D1_H1 (Table 2) allowed a faster growth than the other media when combined with the original MSB (Fig. 4), however, not a significantly faster growth (*p* values = 0.838 and 0.862, respectively). As a consequence, the addition of sodium deoxycholate and disodium hydrogen phosphate dodecahydrate at the previously specified concentrations favored bacterial growth, reducing the time in which the culture reaches a cell density of $> 10^9$ CFU/mL ($OD_{600} > 0.5$). The significantly worst performances were clearly from both MSB and MSB ½ combined with P4 (*p* values = 0.031 and 0.012, respectively), resulting in a more than twofold slower growth rate compared to the controls. As shown in Fig. 4, there were no differences between the

other potential media and the control used for both MSB and MSB ½.

Plaque-Forming Unit Enumeration in the Experimental Media

PFU/mL was determined by DAL assays for all the experimental media based on MS media and MS ½ media, according to the results obtained in both the bacterial CFU/mL enumeration and growth curve measurement experiments. The extra components added to these media were identical to those added in the previous experiments (Table 2). No significant differences were observed in enumeration efficiency in terms of the components added to medium (Fig. 5)

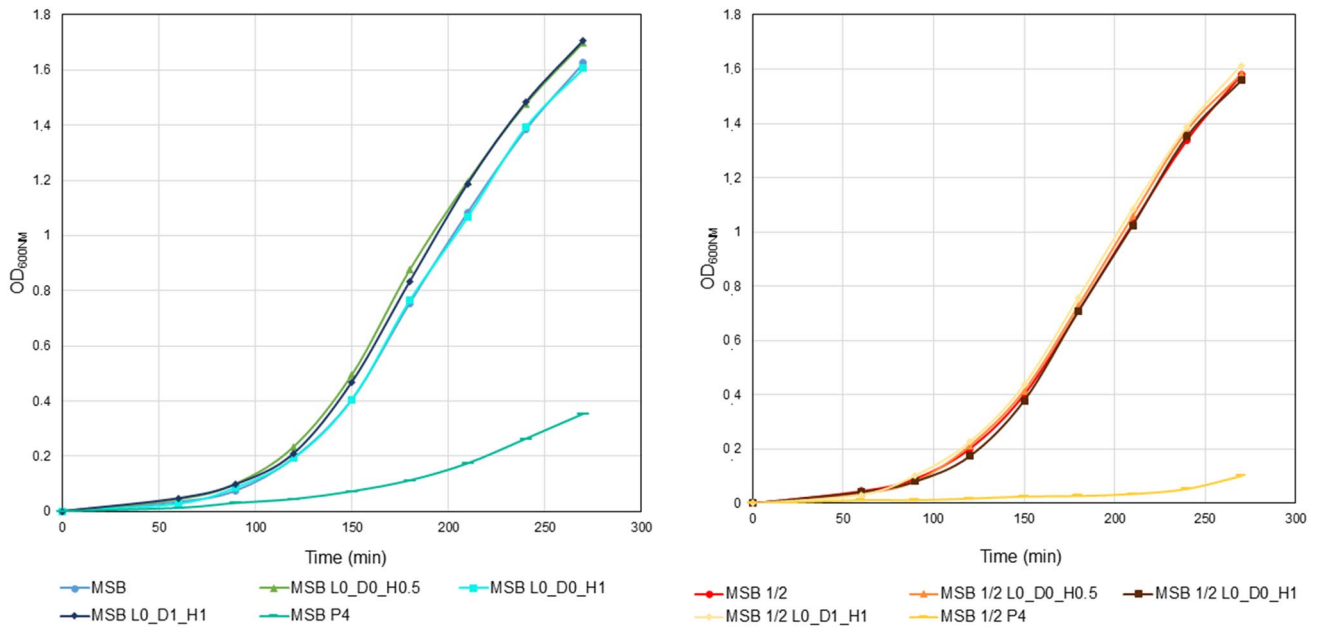


Fig. 4 Representative growth curves of media with added components at determined optimal concentrations using MSB and MSB $\frac{1}{2}$ as core media. (L0=0 g/L of sodium lauryl sulfate; D0=0 g/L of sodium deoxycholate; D1=0.1 g/L of sodium deoxycholate;

H0.5=1.35 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate; H1=2.7 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate; P4=4.0 g/L of sodium propionate)

(p -value=0,179). In relation to media reduction, twofold dilution yielded no significant changes in PFU/mL enumeration either (p -value=0.714).

Cost Estimation

Using the ten newly designed media, a simple estimated cost analysis per sample was also performed, using the original MS media as a reference (MSB, MSA, or ssMSA). Estimations were made assuming the necessity of at least 10 plates of each media per sample, and the cost of each reagent was based on the commercial prices of the components used in our experiments. Results of this analysis are summarized in Table 3. The addition of new components in the medium could cause a maximum cost increase of 5%, in the case of sodium propionate. However, these slight increases might be mitigated by dilutions of the base media, which could result in a 27–33% reduction of analytical costs, depending on the additional components.

Discussion

Out of the nine components tested, four had a significantly positive effect on bacterial growth as measured by CFU/mL enumeration: sodium lauryl sulfate, sodium deoxycholate, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, and sodium propionate. Although none of them had a

significantly positive influence on bacteriophage detection by PFU/mL enumeration, the growth rate of the host strain was improved.

A possible positive synergy between sodium deoxycholate and disodium hydrogen phosphate dodecahydrate was found at 0.1 g/L and 2.7 g/L, respectively. Synergy was observed in both CFU/mL and OD measurements, while bacteriophage enumeration remained similar to the MSB control. A similar effect was observed with the addition of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate at 1.35 g/L. The improvement in the bacterial growth rate induced by these combinations could indirectly benefit bacteriophage enumeration by decreasing the time of analysis.

The fourfold dilution of MSA did not improve the overall bacterial growth rate or therefore the enumeration of bacteriophages (PFU). However, the growth rate of the original MSB was maintained with twofold dilutions, thus confirming our initial hypothesis that the MS media contain an excessive amount of nutrients and could be diluted to save costs. Furthermore, this modification could also be applied for the analysis of larger sample volumes in enrichment cultures intended for absence/presence tests (Anonymous 2000), which currently use twofold concentrated media to analyze equal volumes of sample. As diluting the media would not significantly affect the measurements, $1\times$ MSB could be used directly without reducing the growth of the host strain or the propagation of bacteriophages.

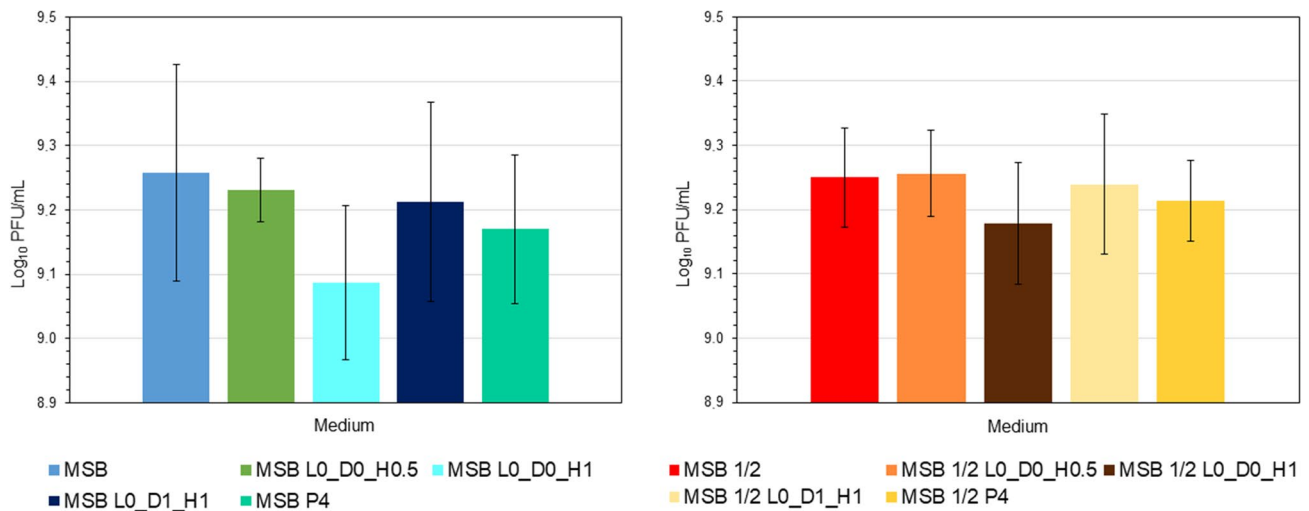


Fig. 5 Enumeration of somatic bacteriophages of the different studied combinations using the MSB, MSA, and MSAss media complete or 1/2 diluted with or without supplementation of the selected components. Selected components: L0=0 g/L of sodium lauryl sulfate; D0=0 g/L of sodium deoxycholate; D1=0.1 g/L of sodium deoxy-

cholate; H0.5=1.35 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate; H1=2.7 g/L of disodium hydrogen phosphate dodecahydrate; P4=4.0 g/L of sodium propionate; MSB=No potential components were added to the media

Table 3 Cost estimates per sample and fluctuation in comparison to original medium of the selected media

| Medium | Cost of media per analyzed sample (€) | % of cost increase/decrease |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| MS | 3.54 | 0.00 |
| MS L0_D0_H0.5 | 3.57 | 0.78 |
| MS L0_D0_H1 | 3.60 | 1.56 |
| MS L0_D1_H1 | 3.62 | 2.21 |
| MS P4* | 3.74 | 5.80 |
| MS 1/2 | 2.36 | -33.38 |
| MS 1/2 L0_D0_H0.5 | 2.39 | -32.60 |
| MS 1/2 L0_D0_H1 | 2.41 | -31.82 |
| MS 1/2 L0_D1_H1 | 2.42 | -31.66 |
| MS 1/2 P4 | 2.56 | -27.57 |

*Best performing in terms of CFU/mL

In conclusion, whereas the supplementation of MS media with new compounds rarely slowed bacterial growth, some combinations of compounds slightly improved the growth rate without altering bacteriophage enumeration. More studies are required to analyze the effects of these compounds and further optimize the quantity to be added to the media. In particular, the feasibility of their supplementation on a larger scale should be assessed from an economical point of view. Possible extra costs could nevertheless be offset by the dilution of the media, which can be done up to fourfold without significantly altering bacterial growth and up to twofold

without altering either growth rate or bacteriophage enumeration. According to the estimates performed in this study, a 33% saving in costs could be achieved by reducing the MS media concentration by half. After the addition of different components, the savings were slightly lower, with a minimum of 27%. These results create new possibilities for designing improved tests or kits for bacteriophage detection, as any added costs per sample arising from the new components would be more than offset by the savings from media dilution.

Acknowledgements Authors thank Prof. J. Jofre for useful comments about the manuscript. This work has been partially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2016-75536) and the Aquaphage project (2016 PROD 00030, AGAUR, Catalan Government) by the Regional Development Fund (FEDER) of the European Union (FEDER 2014–2020 Operational Program).

Author Contributions All authors contributed to the study conception and design. ARB, JM and DTA designed the study, DTA performed the experiments, MM and ARB supervised the work, DTA wrote the manuscript and ARB and MM revised and approved the final version of the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare the submitted work was not carried out in the presence of any personal, professional or financial relationships that could potentially be construed as a conflict of interest.

Research Involving Human Participants and or Animals This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. New York: Interscience Publishers.
- Anonymous, (1995). *ISO 10705-1. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages—Part 1: Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Anonymous, (2000). *ISO 10705-2. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages—Part 2: Enumeration of somatic coliphages*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Anonymous, (2003a). *ISO 10705-3. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages—Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water*. Geneva: International Organization for Standardization.
- Anonymous, (2003b). *U.S. EPA: Results of the interlaboratory validation of EPA method 1601 for presence/absence of male specific (F+) and somatic coliphages in water by two-step enrichment. EPA 821-R-03-015*. Washington D.C.: Environmental Protection Agency.
- Anonymous, (2003c). *U.S. EPA: Results of the interlaboratory validation of EPA method 1602 for enumeration of male specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL). EPA 821-R-03-016*. Washington D.C.: Environmental Protection Agency.
- Armon, R., & Kott, Y. (1996). Bacteriophages as indicators of pollution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26, 299–335.
- Ashbolt, N. J., Grabow, O. K., & Snozii, M. (2001). Indicators of microbial water quality. In L. Fewtrell & J. Bartram (Eds.), *Water quality: Guidelines Standards and Health* (pp. 289–316). London: IWA Publishing.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Borchardt, M. A., Haas, N. L., & Hunt, R. J. (2004). Vulnerability of drinking-water wells in la crosse, wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5937–5946.
- Brion, G. M., Meschke, J. S., & Sobsey, M. D. (2002). F-specific RNA coliphages: Occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Research*, 36(9), 2419–2425.
- Christen, P., & Raimbault, M. (1991). Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. *Biotechnology Letters*, 13, 521–526.
- Davies, K. D. (1993). Design of experiments for predictive microbial modelling. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 12, 295–300.
- Epa, U. S. (2016). *Coliphage experts workshop: Discussion topics and findings. Office of water. EPA 823-F-16F001*. Washington D.C.: Environmental Protection Agency.
- Farnleitner, A., & Blanch, A. (2017). Microbial Indicators—"Workhorses" in the Field of Health-related Water Quality Testing. In J. B. Rose & B. Jiménez-Cisneros (Eds.), *Global Water Pathogen Project*. <https://www.waterpathogens.org> (Farnleitner, A., & Blanch A. (Eds.) Part 2 Indicators and Microbial Source Tracking Markers). Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://www.waterpathogens.org/book/editorial>
- Feachem, R. G., Bradley, D. J., Garelick, H., & Mara, D. D. (1983). *Sanitation and disease: Health aspects of excreta and wastewater management*. Chichester, UK: Wiley.
- Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission. (2015). *National sanitation program Guide for the Control of Molluscan Shellfish*. College Park, MD: Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Francaise, R. (2014). *Arrêté du 25 juin 2014 modifiant l'arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts*. Paris: Gouvernement Français.
- Gerba, C. P., Goyal, S. M., LaBelle, R. L., Cech, I., & Bodgan, G. F. (1979). Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *American Journal of Public Health*, 69(11), 1116–1119.
- Grabow, W. (2001). Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA*, 27(2), 251–268.
- Havelaar, A. H., Furuse, K., & Hogeboom, W. M. (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, 60(3), 255–262.
- Hsu, F. C., Shieh, Y. S. C., & Sobsey, M. D. (2002). Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *Journal of Food Protection*, 65(1), 93–99.
- IAWPRC Study group on health related water microbiology. (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research*, 25, 529–545.
- Jofre, J. (2007). Indicators of waterborne enteric viruses. In A. Bosch (Ed.), *Human viruses in water* (pp. 227–249). Amsterdam: Elsevier Science.
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A. R., & Muniesa, M. (2016). Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water*, 8(5), 199.
- Keswick, B. H., Gerba, C. P., DuPont, H. L., & Rose, J. B. (1984). Detection of enteric viruses in treated drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1290–1294.
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S., & Betzer, N. (1974). Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research*, 8(3), 165–171.
- McFarland, J. (1907). Nephelometer: An instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14, 1176–1178.
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38(6), 732–749.
- Mooijman, K. A., Ghameshlou, Z., Bahar, M., Jofre, J., & Havelaar, A. H. (2005). Enumeration of bacteriophages in water by different laboratories of the European Union in two interlaboratory comparison studies. *Journal of Virological Methods*, 127(1), 60–68.
- Muniesa, M., & Jofre, J. (2004). Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 65–76.
- Nappier, S. P., Hong, T., Ichida, A., Goldstone, A., & Eftim, S. E. (2019). Occurrence of coliphage in raw wastewater and in ambient water: A meta-analysis. *Water Research*, 153, 263–273.
- NHMRC & NRMCC. (2011). *Australian drinking water guidelines paper 6 national water quality management strategy*. Canberra: National Health and Medical Research Council, Australian Government.
- North Carolina Administration. (2011). *North carolina administrative code 15A NCAC 2U*. Raleigh: North Carolina Administration.
- Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E., & Prevost, M. (1997). A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(1), 5–31.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305–325.
- Queensland Government. (2005). *Queensland water recycling guidelines*. Brisbane: Queensland Government.
- República de Colombia. (2014). *Decreto no 1287. Criterios para el uso de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales*. Bogota: Republica de Colombia.

- U.S. EPA. (2015). *Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality*. EPA Office of Water 820-R-15-098. Washington D.C.: Environmental Protection Agency.
- Western Australian Government. (2012). *Western Australia guidelines for biosolids management*. Perth: Western Australian Government.
- WHO. (2017). *Potable reuse. Guidance for producing safe drinking-water*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2017). *Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first addendum*. Geneva: World Health Organization.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4.4 Artículo 4:

Nueva aproximación para la detección simultánea de colifagos somáticos y F-específicos como indicadores de contaminación fecal

Daniel Toribio-Avedillo, Julia Martín Díaz, Juan Jofre, Anicet R. Blanch, Maite Muniesa

Sci. Total Environ. 655, 263–272. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.198

Introducción

Durante décadas los indicadores bacterianos han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal en agua y alimentos. Sin embargo, debido a su incapacidad para representar de manera adecuada a grupos microbiológicos como los virus o protozoos, se continúa buscando en la actualidad indicadores alternativos de la contaminación fecal en agua y alimentos (IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991; World Health Organisation 2017).

Para representar a los virus, se han propuesto como indicadores alternativos dos grupos de bacteriófagos que infectan a *E. coli*: los colifagos somáticos y los colifagos F-específicos. Los colifagos somáticos se encuentran en concentraciones más altas en el ambiente, pero son un grupo de virus muy heterogéneo. Por otro lado, los colifagos F-específicos son un grupo más homogéneo y predominan en algunos tipos de muestras como el agua regenerada, los sedimentos arcillosos o las aguas subterráneas. Sin embargo, generalmente se encuentran a concentraciones inferiores a los colifagos somáticos (Jofre et al. 2016; IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991). Desde el punto de vista de las normativas, no existe un consenso establecido que defina el uso de uno de estos grupos de manera predominante frente al otro. Como consecuencia se han desarrollado cepas con capacidad para detectar ambos grupos con el objetivo de reducir la duplicidad de los análisis y los costes que conllevarían estudiar ambos grupos por separado (Guzmán et al. 2008).

Los métodos de detección estandarizados para ambos tipos de colifagos son sencillos y económicos, pero requieren múltiples pasos, medios y tiempos superiores a las 8 horas para la obtención de resultados. A fin de resolver estos problemas, se han planteado alternativas como la metodología *Bluephage* (Muniesa et al., 2018) que emplea una cepa modificada genéticamente para la sobreexpresión de la enzima β -glucuronidasa y eliminación de los

transportadores que introducen su sustrato al interior celular. De este modo, se garantiza que el contacto entre la enzima y su sustrato solo sucederá cuando se produce la lisis celular, como sucede durante el proceso de infección viral de los colifagos.

Objetivos

Teniendo en cuenta ambas mejoras en la detección de colifagos se plantearon los siguientes objetivos:

- Desarrollar una nueva cepa capaz de detectar colifagos totales (somáticos + F-específicos) mediante la metodología *Bluephage* cuya eficiencia, sensibilidad, especificidad y velocidad de detección sean similares a la cepa CB10, que detecta sólo colifagos somáticos.
- Ensayar en paralelo la nueva cepa desarrollada, la cepa anterior CB10 y las cepas parentales usadas en los métodos estandarizados para detectar fagos presentes en muestras ambientales y fagos de laboratorio, a fin de demostrar su equivalencia en la capacidad de detección mediante las metodologías DAL y *Bluephage*.
- Demostrar la aplicabilidad de la nueva cepa desarrollada en ensayos cuantitativos mediante la técnica del Número Más Probable (NMP).
- Valorar la aplicabilidad de la nueva cepa desarrollada en diferentes volúmenes.

Resultados

Empleando los medios y métodos descritos en Muniesa et al., 2018, se diseñó una nueva cepa a partir de la cepa CB10 para la detección de colifagos totales. Para ello, además de las modificaciones genéticas ya realizadas sobre la cepa CB10, se le introdujo un plásmido F, que permiten el desarrollo de pili F, cuyos receptores son usados por los fagos F-específicos para iniciar la infección. Para ello, se incorporó el plásmido en la cepa CB10 mediante un protocolo de conjugación, en el que la cepa CB10 fue conjugada con una cepa de *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pOX38Km. Este plásmido contiene genes para el desarrollo de pili F y un marcador de selección de resistencia a kanamicina. Mediante PCR convencional se comprobó la presencia de todas las modificaciones genéticas realizadas en la nueva cepa desarrollada, que fue denominada *E. coli* CB12.

La cepa CB12 fue cultivada en agar Chromocult para confirmar los efectos de la ausencia de transportadores codificados por los genes *uidB* y *uidC*, al igual que la cepa CB10 y en comparación con las cepas empleadas en los métodos estandarizados que sí los poseen. Se confirmó que las cepas CB10 y CB12 del método *Bluephage* no sufren un cambio en su color original debido a su carencia de transportadores. En contraste, las cepas empleadas en los métodos tradicionales sufren un cambio a un color azulado por la degradación del sustrato que es incorporado al interior celular. Además, se observó mediante microscopía electrónica de transmisión la presencia de pili F en la cepa CB12, en comparación con la ausencia de pili de la cepa CB10, que consecuentemente solamente es sensible a colifagos somáticos.

Para evaluar la sensibilidad de esta nueva cepa se realizaron estudios mediante el método DAL a fin de demostrar que las alteraciones realizadas no variaban la susceptibilidad de la cepa frente a ningún tipo de colifagos. Se compararon las cepas CB10 y CB12 con las cepas empleadas en metodologías tradicionales (*E. coli* WG5 y *E. coli* CB390 para la detección de colifagos somáticos y totales respectivamente) en relación con su capacidad de detección de colifagos mediante la metodología de la doble capa descrita en la ISO 10705-2. Se utilizaron como muestras diversos fagos de referencia y diferentes tipos de muestras ambientales. Los resultados obtenidos se encuentran reflejados en la Figura 2 del artículo. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las cepas que detectaban el mismo tipo de bacteriófagos (CB10 respecto a WG5 y CB12 respecto a CB390) ni entre las cepas que detectaban tipos diferentes (las cepas que detectan colifagos totales CB12 y CB390, respecto a las cepas que detectan colifagos somáticos CB10 y WG5).

En paralelo, se aplicó el método *Bluephage* en las mismas muestras con la cepa CB12, usando también la cepa CB10 a modo de referencia. En estos ensayos se monitorizó el cambio de color del medio BTM a lo largo del tiempo con las dos cepas analizando diferentes muestras de referencia y ambientales. Un ejemplo de este tipo de ensayo y los resultados de los mismos se encuentran en la Figura 3 y la Tabla 3 del artículo respectivamente. Se observó que las concentraciones elevadas de colifagos causan que el cambio de color para CB12 tenga lugar antes de las 2 horas, mientras que concentraciones inferiores de hasta 1 UFP/ml requerían tiempos superiores de hasta 4:30 h. El control negativo añadido a los ensayos no cambiaba de color hasta tiempos superiores a las 7 horas, garantizando que el cambio de color observado era debido a la lisis por fagos. No se observó correlación entre el número de fagos y el tiempo requerido para el cambio de color. En cuanto a la comparativa con CB10, no se observaron apenas diferencias, tanto en la capacidad de detección de colifagos, como en los tiempos

requeridos para observar cambio de color. Para comprobar la ausencia de falsos positivos, se utilizó el test de la gota al finalizar cada ensayo, usando los sobrenadantes de los diferentes tubos, positivos y negativos, como muestras y la cepa CB12 como huésped. No se observaron falsos positivos entre las muestras, pero sí se observó la presencia de posibles falsos negativos (muestras que contenían fagos, pero no mostraron lisis) para muestras con un contenido de fagos inferior a 10 UFP/ml. Algunas de estas muestras mostraron resultados positivos de cambio de color en un tiempo superior al empleado como referencia para el análisis (4 h).

La aplicación de la nueva cepa CB12 en ensayos cuantitativos fue valorada mediante la técnica del NMP para determinar la cantidad de fagos presentes en las muestras analizadas. El NMP derivado de los tubos positivos tras 4 horas de incubación en BTM con la cepa CB12 fue comparado con los recuentos de fagos obtenidos mediante la metodología DAL con esta misma cepa. Se observó que los resultados obtenidos mediante ambas aproximaciones no presentaban diferencias significativas ($p > 0,05$), aunque los resultados de ISO eran ligeramente superiores en las muestras con alta concentración de colifagos y los resultados de NMP eran ligeramente superiores en las muestras con baja concentración de colifagos.

La aplicación del método y cepa en diferentes volúmenes fue estudiada mediante dos aproximaciones representadas en la Figura 5: microplacas (volúmenes pequeños) y botellas de 100 ml. En ambos casos se utilizó una versión adaptada del BTM con una composición proporcional apropiada para el volumen analizado. Ambas aproximaciones funcionaron correctamente en la aplicación del método *Bluephage*, manifestando cambios para concentraciones de hasta 1 UFP/ml de muestra en menos de 4 horas.

Discusión

Los colifagos somáticos y F-específicos son los grupos de colifagos más prometedores en cuanto a su aplicación como indicadores de contaminación fecal (IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991). Ambos grupos presentan una serie de ventajas frente al otro que los hace aplicables a los diferentes tipos de normativas. Los colifagos somáticos tienen un mayor parecido a los virus entéricos de ADN mientras que los colifagos F-específicos presentan una mayor similitud con virus de ARN, como los norovirus. Los colifagos somáticos son más abundantes generalmente en las muestras contaminadas fecalmente, pero existen diferentes tipos de muestras o tratamientos en los que prevalecen los colifagos F-específicos (como por ejemplo las aguas regeneradas o muestras tratadas con UV para su desinfección)

(Brion et al., 2002; Grabow, 2001; Lee and Sobsey, 2011; Montemayor et al., 2008; Muniesa et al., 2009).

Por ello, se considera que el empleo de una única cepa capaz de detectar ambos tipos de colifagos es una buena alternativa para solucionar el problema de decisión generado a la hora de elaborar nuevas normativas que incluyan ambos indicadores junto a los indicadores bacterianos. Anteriormente, la cepa *E. coli* CB390 (Guzmán et al. 2008) fue desarrollada por nuestro grupo de investigación con este objetivo y su efectividad ya ha sido probada en múltiples ocasiones (Agulló-Barceló et al., 2016; Bailey et al., 2017). Sin embargo, el uso de esta cepa implica limitarse a los métodos estandarizados tradicionales, que requieren su implementación y un tiempo más elevado para obtener resultados. Como solución a este problema, se decidió adaptar esta aproximación de detección de colifagos totales a la nueva metodología *Bluephage*.

De este modo, el desarrollo de la nueva cepa CB12 amplía el abanico de aplicaciones de la metodología *Bluephage*, permitiendo la detección rápida de colifagos totales dentro de una jornada laboral. Su capacidad de detección de colifagos es similar a la capacidad de la cepa CB390 empleada en métodos estandarizados para detectar colifagos totales. En los ensayos de recuento de bacteriófagos mediante el método DAL tampoco se encontraron diferencias significativas en la capacidad de detección de las cepas huéspedes de colifagos totales (CB12 y CB390) respecto a las cepas que detectan exclusivamente colifagos somáticos (CB10 y WG5). Posiblemente esta similitud en los recuentos se deba a la baja presencia de fagos F-específicos en muestras naturales en comparación con las concentraciones superiores de colifagos somáticos. La cepa CB12 también ha sido aplicada exitosamente en ensayos de *Bluephage*, requiriendo tiempos similares de incubación a la cepa CB10 para detectar las mismas concentraciones de bacteriófagos en muestras ambientales y de laboratorio. Además, la detección de colifagos totales mediante el método *Bluephage* es adaptable a métodos cuantitativos y a diferentes volúmenes de muestras, requisitos que previamente habían sido demostrados en el método *Bluephage* para la detección de colifagos somáticos. Esta adaptabilidad es interesante debido a que nuevas normativas, como la directiva de aguas de consumo de la UE (The European Parliament and the Council of the European Union 2020a), buscan implementar como criterio la ausencia de colifagos en volúmenes de muestra de 100 ml. Los laboratorios de análisis requerirán obtener estos resultados con rapidez y un método como *Bluephage* podría garantizar resultados dentro de una jornada laboral para los volúmenes requeridos en las normativas.

Conclusiones

- La detección de colifagos totales supone una mejora en la detección de indicadores de contaminación fecal, ahorrando tanto en costes como en tiempo frente al análisis de ambos tipos (somáticos y F-específicos) por separado.
- Se ha desarrollado una nueva cepa que permite aprovechar las mejoras de la metodología rápida *Bluephage* y las ventajas en ahorros de coste y tiempo de la aproximación de detección de colifagos totales.
- La nueva cepa desarrollada denominada *E. coli* CB12 es capaz de detectar colifagos totales mediante el ensayo *Bluephage* en un tiempo de incubación de 4 h, dentro de los límites de una jornada laboral.
- Esta versión del método es adaptable a métodos cuantitativos basados en el NMP y a diferentes volúmenes de muestra, haciendo posible su uso en normativas que requieran dichas modificaciones para el análisis de las muestras.

(Nota: Los medios, tampones, protocolos, plásmidos y cebadores empleados en este artículo se encuentran descritos en los Anexos 2-5.)



New approach for the simultaneous detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages as indicators of fecal pollution

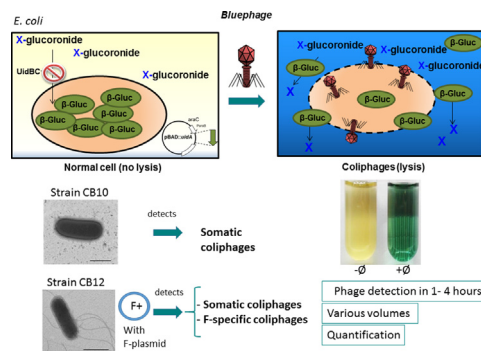
Daniel Toribio-Avedillo, Julia Martín Díaz, Juan Jofre, Anicet R. Blanch, Maite Muniesa*

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Microbiology Section, Faculty of Biology, University of Barcelona, Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- Coliphages are included as viral fecal indicators in recent water policies.
- A new *Bluephage* approach allows the detection of somatic and F-specific coliphages.
- *Bluephage* allows detection of both groups of phages in different type of samples.
- *Bluephage* is the fastest (1–4 h) and easiest method for coliphage detection.
- *Bluephage* is adaptable to different volumes and allows quantification.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2018
 Received in revised form 13 November 2018
 Accepted 13 November 2018
 Available online 14 November 2018

Editor: Ewa Korzeniewska

Keywords:

Indicator
 Fecal pollution
 Somatic coliphages
 Male-specific RNA coliphages
 Virus
 New tools

ABSTRACT

Two groups of coliphages have been recently included in different water management policies as indicators of viral fecal pollution in water and food: somatic coliphages, which infect *E. coli* through cell wall receptors, and F-specific RNA coliphages, which infect through the F-pili. Somatic coliphages are more abundant in fecally contaminated waters, except reclaimed waters, those disinfected by UV irradiation, and some groundwater samples that show a higher level of F-specific coliphages. Somatic coliphages are morphologically similar to DNA enteric viruses while F-specific coliphages are similar to RNA viruses such as norovirus and hepatitis A viruses, which are the viral pathogens of concern in sewage. The use of strains sensitive to both types of phages has been proposed for total coliphage enumeration, thereby avoiding double analysis. The standardized methods available for coliphage detection are robust and cost-effective, but the introduction of ready-to-use methods would facilitate routine implementation in laboratories. The fastest available tool for somatic coliphage enumeration is the recently developed *Bluephage*, which uses a modified β -glucuronide-overexpressing *E. coli* strain unable to take up the glucuronide substrate. The overexpressed enzyme accumulates inside the bacterial cells until released by phage-induced cell lysis, whereupon it encounters its substrate and the medium changes from yellow to blue. The present method uses *E. coli* strain CB12, sensitive to somatic coliphages and F-specific coliphages due to the expression of the F-pili. The *Bluephage* approach incorporating CB12 detects both types of coliphages in a time range of 1:30 to 4:00 h, as assayed with coliphages from raw sewage, river water, sludge and mussels. This strategy can be applied to obtain qualitative and quantitative results and is applicable to microplates as well as to large sample volumes (100 ml). Moreover it can provide monitoring of water bodies at real time, as for example for ambient recreational beach monitoring.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.
 E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

1. Introduction

Bacterial indicators are used to determine levels of fecal pollution in water and food; however their inability to surrogate other microbiological groups, such as viruses and protozoa, calls for alternative indicators for the assessment of fecal and viral contamination of water, biosolids or food (IAWPRC, 1991; WHO, 2017). Two groups of bacteriophages that infect *Escherichia coli*, somatic and F-specific coliphages, have been thoroughly studied as both fecal and viral indicators in academia for many years (Grabow, 2001; IAWPRC, 1991; Jofre et al., 2016). Somatic coliphages infect *E. coli* strains WG5 of CN13 through the cell wall and F-specific coliphages, that infect strains WG49 or F (amp) HS through the F-pili of coliform bacteria (IAWPRC, 1991; Jofre et al., 2016).

Coliphages have been progressively included in water and sludge quality guidelines (NHMRC; NRMCC, 2011; North Carolina Administration, 2011; Queensland Government, 2005; Republica de Colombia, 2014; Republique Française, 2014; U.S. EPA, 2006, 2015, 2016; Western Australian Government, 2012) and in aquaculture practices (Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015). Furthermore, coliphages are being considered in coming future water quality regulations as the USA regulation concerning ambient water quality (U.S. EPA, 2015, 2016). Recently the European Commission included somatic coliphages for a new drinking water EU directive (European commission, 2017) and for reused water (European commission, 2018).

Generally higher densities of somatic coliphages are found in the environment (Jofre, 2007). However, there are some water samples in which F-specific coliphages have been observed to predominate. These include reclaimed water, in which UV plays the main role in inactivation (Montemayor et al., 2008), clay sediments (Skraber et al., 2009), and groundwater (Lucena et al., 2006). In addition, some of the water regulations want to include both, so that the diversity of enteric viruses (and their associated properties) is captured (Salter et al., 2010; U.S. EPA, 2001a). This lack of definition can result in a certain degree of confusion and separate analysis of both groups adds complexity and costs to the analysis. Consequently, the detection for the two groups of phages using a single strain seems to be a suitable option. An Hfr strain *E. coli* C3000 (ATCC 15597) has been used for this purpose, mainly in the USA, but it detects lower numbers of somatic coliphages than strains WG5 or CN13 (Sobsey et al., 2004). More recently, strain CB390 (CECT9198), an *E. coli* WG5 transformed with an F-plasmid was constructed (Guzman et al., 2008). CB390 detected numbers of coliphages in water samples similar to the sum of somatic coliphages and F-RNA phages in Spain (Agulló-Barceló et al., 2016; Guzman et al., 2008), USA (Bailey et al., 2017) and Colombia (Campos, personal communication).

The standardized methods to detect coliphages (Anonymous, 1995, 2001; U.S. EPA, 2001a, 2001b), which are abundant in fecally contaminated samples, are simple and cost effective, but they are still multi-step processes that require several media and >8 h to yield results. We recently proposed the *Bluephage* method (US patent 9,932,645 B2) for somatic coliphage detection, based on the use of an *E. coli* strain with a modification in the operon responsible for glucuronic acid metabolism (Liang et al., 2005). The *uidB* and *uidC* genes, which encode proteins responsible for the transport of glucuronic acid inside cells, are knocked out, and *uidA*, encoding the enzyme β -D-glucuronidase, is overexpressed (Muniesa et al., 2018). This strain is consequently unable to internalize the substrate and the overexpressed enzyme accumulates in the bacterial cells. After phage-induced cell lysis, the enzyme is released into the medium and encounters its substrate in the medium, a chromogen analogous to glucuronic acid (X-glucuronide) and the medium changes from yellow to dark blue (Muniesa et al., 2018). *Bluephage* allows the detection of up to 1 somatic coliphage in under 3.5 h, by far the fastest method for the detection of infectious somatic coliphages available.

In the present study, we extend the scope of the *Bluephage* approach for the simultaneous detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages by adapting the method and generating a new strain, namely strain CB12.

2. Materials and methods

2.1. Medium and growth conditions

Media and conditions were those of the protocol for the culture of *E. coli* CB10 (Muniesa et al., 2018). The method employs a modified version of Modified Scholten's Broth (MSB) (Anonymous, 2000), hereby referred to as the *Bluephage* medium. There are few differences between the media used to grow the strain and to perform the assay. The *Bluephage* growth medium (BP-GM) used for the strain propagation was MSB supplemented with 0.05% (w/v) arabinose, ampicillin (amp) (100 μ g/ml) and/or kanamycin (km) (50 μ g/ml), depending on the strain used. The *Bluephage* test medium (BP-TM) used for the assay was MSB supplemented with 0.05% (w/v) arabinose, 0.5% (v/v) glycerol, 15 μ l CaCl₂ 1 M and 0.1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid.

For phage enumeration using strain CB12 and CB390, a combination of methods were used as previously described (Guzman et al., 2008). Briefly, strains were grown on MSB broth, but phages were enumerated by double agar layer using Tryptone yeast extract glucose agar (TYGA) soft agar and agar plates, as described in the ISO method for enumeration of somatic coliphages (Anonymous, 1995).

For the conjugation experiments, LB broth or LB agar with ampicillin (amp) (100 μ g/ml) (for pBAD selection) and/or kanamycin (km 50 μ g/ml) were used. A Chromocult® agar plate (Merck, Darmstadt) containing x-glucuronide was used to check the inability of the CB12 strain to incorporate the x-glucuronide.

2.2. Plasmids

Plasmid pKD46 (GenBank AY048746), expressing the Red recombinase system, was used to insert DNA fragments into the *E. coli* chromosome (Datsenko and Wanner, 2000). The tetracycline resistance gene (*tet*) was amplified from plasmid pACYC184 (Genbank X06403) (Rose, 1988). The pBAD-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) containing an amp resistance marker was used to clone and overexpress the *uidA* gene. The F plasmid derivative pOX38Km (Chandler and Galas, 1983), containing a km resistance marker, was obtained from strain *E. coli* DH5 α [pOX38Km], kindly provided by Prof F. de la Cruz (University of Cantabria, Spain). All the vectors were purified using Invitrogen™ PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Samples

This study used naturally occurring phages purified from different samples. Ten samples of raw urban sewage were collected on 10 different sampling days from the influent of a wastewater treatment plant serving a population of approximately 500,000 (containing ca 10^{3–4} PFU/ml). The same plant was the source of five sewage sludge samples, which were a composite mixture of raw primary sludge (about two-thirds) and secondary sludge (about one-third) that was thickened and submitted to anaerobic-mesophilic (35 °C) digestion for 20–25 days. Ten ambient water samples were also collected from the lower course of the River Llobregat (ca 10^{1–2} PFU/ml), a level of the river subjected to heavy anthropogenic pressure, mostly via the discharge of secondary effluents of municipal wastewater treatment plants (Muniesa et al., 2012). The wastewater treatment plant as well as the River Llobregat are located in the Barcelona area (Catalonia, NE Spain). Five samples comprising ten mussels were obtained from five different local supermarkets of Barcelona.

All samples were collected in sterile containers, transported to the laboratory at 5 ± 2 °C within 2 h of collection, and processed immediately for bacteriophage enumeration and further experiments.

2.4. Bacteriophages

The bacteriophages used were obtained from laboratory stocks of known concentration (10^9 PFU/ml) containing pure cultures of phage ØX174 (ATCC®13706-B1) and phage MS2 (ATCC® 15597B1™). These were used as reference phages for somatic coliphages and F-RNA specific bacteriophages, respectively, in accordance with the ISO protocols (Anonymous, 1995, 2000).

To purify bacteriophages from natural water samples (raw sewage and river water), the samples were filtered through 0.22 µm pore size, low-protein-binding (PES) membranes (Millipore, USA) to remove bacteria and other particulate material.

The method for phage extraction from sludges was that used in established policies, as described previously (Guzmán et al., 2007), with minor modifications. Briefly, the samples were mixed in a 1:10 (w/v) ratio with PBS (pH 7.4) and homogenized by magnetic stirring for 30 min at room temperature. The suspension was then centrifuged at $10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was filtered through low-protein-binding 0.22 µm pore size membrane filters (Millex-GP, Millipore, Bedford, MA). The suspension was diluted and used to enumerate phages by the standard ISO method and analyzed in triplicate using the *Bluephage* method.

For the study of phages in mussels, the samples obtained from the supermarkets were free of somatic coliphages. Therefore, each sample containing 10 mussels were spiked in the laboratory with coliphages purified from raw sewage to reach a final estimated concentration of 10^1 – 10^4 PFU/g of mussel. Phages were incubated with the samples for 2 h at 23 °C. Phages were extracted from 10 g of mussel meat from a minimum of 10 mussels per sample, which were homogenized in a blender for 5 min. Elution of phage particles was performed on 100 ml of the homogenate by magnetic stirring for 15 min in 400 ml of borate buffer (0.01 M) containing 3% beef extract (pH 9.5). After neutralization to pH 7.2, the treated homogenate was clarified by centrifugation at $2500 \times g$ for 15 min at 4 °C (Muniesa et al., 2018).

2.5. PCR techniques

PCRs were performed with a GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain.). The oligonucleotides used in this study are shown in Table 1 and they were designed from the sequence available for *E. coli* K-12 (GenBank Accession number NC_000913). The primers for the detection of the F plasmid were designed from the sequence of the pOX38Km plasmid (F. de la Cruz, personal communication).

2.6. Electroporation

Electrocompetent cells were prepared from 50 ml of culture in super optimal broth (SOB) medium (Hanahan, 1983) with 0.05% L-arabinose as previously described (Sambrook and Russell, 2001), mixed with the corresponding amount of DNA (plasmid or PCR-amplified, 0.5 µg) and transferred to a 0.2 cm electroporation cuvette (Bio-Rad, Inc.). The cells were electroporated at 2.5 kV with 25 F and 200 Ω. Cells containing the construct were recovered on Modified Scholten's agar (MSA) (Anonymous, 2000) with the corresponding antibiotic.

2.7. Generation of a tailored CB12 strain

E. coli CB12 was generated from strain CB10 (Muniesa et al., 2018), derived from the *E. coli* WG5 recommended in the ISO standard method for somatic coliphage detection (Anonymous, 2000), and also used for the construction of strain CB390 (Guzmán et al., 2008).

Strain CB10 is an *E. coli* WG5 derivative mutant lacking the *uidB* and *uidC* genes, which are necessary for the uptake of glucuronide acid inside the cell (US patent 9,932,645 B2). The genes *uidB* and *uidC* were replaced by a *tet* cassette using the red recombinase system introduced in plasmid PKD46 (Datsenko and Wanner, 2000), and prepared as described previously (Muniesa et al., 2018). Without the *uidB* and *uidC* genes, the strain was unable to incorporate the substrate. In addition, strain CB10 overexpressed the *uidA* gene (*uidA*, 1847 bp) encoding the enzyme β-glucuronidase, responsible for the cleavage of glucuronic acid. This was achieved by transforming CB10 with the plasmid pBAD-TOPO® TA Expression Kit containing *uidA* under the expression of an arabinose-inducible promoter *araBAD* (Thermo Fisher Scientific). The strain containing pBAD::*uidA* in the presence of 0.05% of arabinose in the medium accumulates high intracellular amounts of the enzyme. The protocol and primers used were described in detail previously (Muniesa et al., 2018).

To generate strain CB12, an F plasmid encoding the pili required for F-specific coliphage infection was introduced in the CB10 strain. Since strain CB10 contained the pBAD TOPO vector, which possesses an ampicillin selection marker, the F plasmid derivative pOX38Km containing kanamycin resistance as a selective marker was used.

A loop of the donor strain (*E. coli* DH5α [pOX38Km]; km^R) was inoculated horizontally on one side of an LB agar plate containing km and amp. A loop of the recipient strain (CB10; amp^R) was inoculated perpendicularly to the loop of the donor strain, crossing with the donor strain in the central part of the agar plate. Plates were incubated for 10 h. at 37 °C and transconjugant colonies were selected from the central interphase. Transconjugant colonies were subcultured and verified by conventional PCR using primers Fkm-up/Fkm-lp (Table 1).

The absence of the *uidBC* genes, and presence of the *tet* gene, pBAD containing the *uidA* gene and the F plasmid pOX38Km was confirmed after all manipulations by PCR with the primers described in Table 1.

Table 1
Oligonucleotides used in this study.

| Name | Oligo | Target gene | Ref |
|-----------|---|------------------------------------|-----------------------------|
| uidA-For2 | CTTAATGAGGAGTCCCTT | <i>uidA</i> | (Muniesa et al., 2018) |
| uidA-Rev2 | CCAGGAGAGTTGTTGATT | <i>uidA</i> | (Muniesa et al., 2018) |
| uidB-up | CTGGACTGGCATGAACCTC | <i>uidB</i> | (Muniesa et al., 2018) |
| uidC-lp | ACTTCAGCATAAAGTCATACT | <i>uidC</i> | (Muniesa et al., 2018) |
| uidB-Tc5 | CCTATATCGTATGGGGCTGACACTGTCCACCACCTCGTCCG | <i>uidB</i> overlapping <i>tet</i> | (Muniesa et al., 2018) |
| uidC-Tc3 | CTAACGGATTCCACTCCAACGCTGACATTTGCACCGAT | <i>uidC</i> overlapping <i>tet</i> | (Muniesa et al., 2018) |
| Tc5 | TCAGCCCCATACGATATAAG | <i>tet</i> | (Serra-Moreno et al., 2006) |
| Tc3 | TGGAGTGGTGAATCCGTTAG | <i>tet</i> | (Serra-Moreno et al., 2006) |
| pBADf | ATGCCATAGCATTTTTATCC | pBAD Plasmid construct | Invitrogen |
| pBADr | GATTTAATCTGTATCAGG | pBAD Plasmid construct | Invitrogen |
| Fkm-up | AACATGCGAAACGCTATGCC | F plasmid derivative pOX38Km | This study |
| Fkm-lp | AGCCGTTTTCTGTGTGTTG | F plasmid derivative pOX38Km | This study |

2.8. Bacteriophage enumeration

The coliphage detection performance of strain CB12 was compared with that of the wild type strain WG5; the *Bluephage* strain CB10 detected only somatic coliphages, and strain CB390 both somatic coliphages and F-specific RNA coliphages. All strains were used as hosts to detect phage ØX174, phage MS2, and phages from raw sewage, river water, sludge and mussels by the double agar layer method (Anonymous, 2000; Guzman et al., 2008).

2.9. Assays of strain CB12 using the *Bluephage* method

Strain CB12 was inoculated in BP-GM (with amp and km) and incubated overnight at 37 °C. One milliliter of the overnight culture was 1/100 diluted in fresh BP-GM with amp and km and grown to the exponential growth phase, monitored by an optical density (OD) at 600 nm of 0.3. At this stage, 0.5 ml of this culture was added to 2.5 ml of BP-TM. For assays with strain CB10, the same media were used but without adding km.

A known number of phages purified from each sample were added to each BP-TM tube containing strains CB10 or CB12, and one tube without phages was always kept as a control. The tubes were statically incubated at 37 °C and evaluated for color change from light yellow to blue at different times (1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30 and 4:00 h). The experiment lasted until the control tube containing no phages turned blue (a minimum of 7 h). All tubes were assayed in triplicate. A tube containing BP-TM and the strain, but no sample, was used as a control in all experiments. Additionally, 1 ml of 1/100 diluted wastewater or 1 ml of river water filtered through high-protein binding membranes of 0.22 µm (Millex-MF Millipore) to remove phages were inoculated in tubes containing BTM and the strain as additional controls in the experiments with environmental samples.

Dilutions of the samples and triplicate analysis allowed the application of the Most Probable Number (MPN) method.

2.10. Spot test confirmation of phages detected by *Bluephage*

From each tube inoculated using the *Bluephage* method, after the reported period of incubation, 15 µl aliquots were taken and dropped onto an agar monolayer containing strains CB10 or CB12 according with the ISO method (Anonymous, 2000). The plates were side-up incubated at 37 °C. Appearance of plaques in the spot area was considered positive for the presence of phages in a given sample.

2.11. Scaling the *Bluephage* method up and down

To evaluate the performance of the method in large volumes of sample, 100 ml of BP-TM 2X was mixed with 100 ml of wastewater samples diluted to contain densities of phages of 100 PFU/ml and 20 ml of strain CB12 in bottles of 250 ml. Cultures were statically incubated at 37 °C and monitored for color change.

Small volumes of 1.5 ml containing densities of phages from 10⁴ to 0.1 were used to check the viability of using the strain on a small scale. The proportion of nutrients, substrate and strain CB12 was the same as in the tubes.

2.12. Transmission electron microscopy

Cell samples were subjected to negative staining. Whole cells of CB10 and CB12 grown on LB agar plates were harvested and carefully resuspended in 2% ammonium molybdate (Sigma) with 70 µg/ml bacitracin (Sigma), as a wetting agent. 10 µl cell preparation was applied to a copper grid overlaid with a carbon-coated Formvar film. The excess sample was carefully removed, and the copper grid was dried. The samples were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL Inc. Peabody, MA USA) operating at 80 kV.

2.13. Statistical analysis

Computation of data and statistical tests were performed using the Statistical Package for Social Science software (SPSS). The ANOVA test was used to evaluate the differences between MPN, coliphage enumeration and *Bluephage* results; evaluations were based on significance levels of $\alpha = 0.05$.

3. Results

3.1. Performance of strain CB12

The inability of strain CB12 to incorporate the substrate inside the cell because of the absence of the transporter genes was confirmed on a Chromocult® agar plate and in BP-TM (Fig. 1A). CB12 showed a similar performance to CB10, neither causing a change of color of the medium in the absence of phages, in contrast with their respective wild strain counterparts (CB390 for CB12 and WG5 for CB10), which are able to take up the substrate and cause a change of color regardless of the presence of lytic phages, generating false positive results. The propagation of the cell-infecting phages and ensuing cell lysis allowed the β -glucuronidase, overexpressed and accumulated inside the cell, to be released into the medium. On encountering the substrate D-glucuronide, present in the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid molecules, the enzyme causes the medium to turn blue through its activity, thus giving a positive test only when phages are present.

This procedure (US patent 9,932,645 B2) is the same for either CB10 and CB12, with the difference that CB10 can only detect somatic coliphages (therefore it was lysed by ØX174 but not by MS2), whereas CB12 can detect somatic coliphages and F-specific coliphages, as it is lysed by both (Fig. 1B). The change of color took place in <2:00 h for CB10 and 2:30 h for CB12, for a phage stock of up to 10⁴ PFU. The F-pili required by F-specific coliphages to infect the cell was expressed in the CB12 strain containing the F-like plasmid, as confirmed by electron microscopy, but not in strain CB10 (Fig. 1C).

3.2. Sensitivity of strain CB12

To confirm that the mutation of the strain did not result in a lower detection of phages, its susceptibility to phage infection was compared with the wild type strain CB390 by enumeration of phages in natural samples using a double agar layer according to the ISO method (Anonymous, 2000). The phage counts obtained with both strains showed no significant differences ($P > 0.05$) compared with phages from natural samples (Fig. 2) or reference phages ØX174 (ATCC 13706-B1) and MS2 (15597-B1) (Table 2). CB12 and CB390 did not show statistically significant ($P > 0.05$) differences in phage numbers compared with strains WG5 and CB10 either (Table 1, Fig. 2).

3.3. Application of CB12 and the *Bluephage* method to environmental samples

Filtered raw wastewater samples were diluted ten-fold and added to the *Bluephage* tubes containing strain CB12, at descending phage densities. In Fig. 3, the tubes correspond to an estimated 10³, 10², 10¹ and ≤ 1 PFU/tube (calculation based on the dilution of the sample), and one control tube that contained only CB12 and no phages. The cultures were incubated at 37 °C and the color change was monitored over time (Fig. 3). The first positive results were observed at 1:30 h for concentrations of 10³ phages. Cultures containing 10² phages turned blue between 2:00–2:30 h. Cultures containing 10 phages turned blue after 3:00 h, and lower phage densities required 4:00 h or did not cause any change of color. Nevertheless, the tubes were incubated until the control culture turned blue, which required a minimal incubation time of 7 h. Samples were considered negative for phage presence if the color change did not occur before the control sample turned blue,

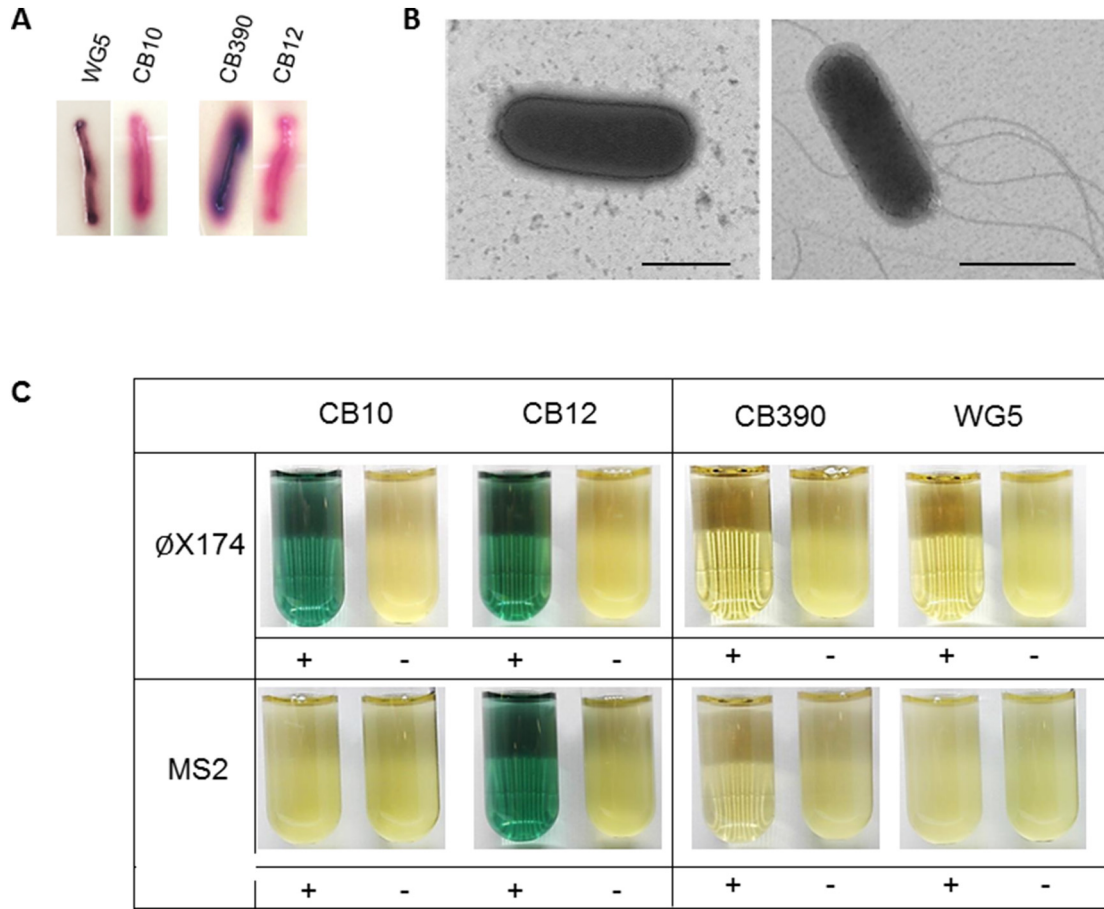


Fig. 1. Evaluation of CB12. (A) Confirmation of the CB12 inability to take up the substrate in the absence of phages by cultivation in Chromocult® agar. (B). Electron micrograph of CB10 and CB12 strains confirming the expression of F-pili in CB12. Bar 1 µm. (C) Comparison of CB10 and CB12 strains in the detection of reference phages ØX174 and MS2 inoculated at a final concentration of 10² PFU/ml. Strains CB390 and WG5 were added as controls.

plausibly by natural cell die-off that occurred over time (Fig. 3). No other conditions assayed here were observed to cause color change of the control before 7 h, although it cannot be discarded that some conditions (e.g. incubation at an incorrect high temperature) might accelerate the spontaneous lysis of the cells and the change of color.

Different wastewater and river samples were used for somatic and F-specific coliphage enumeration by the double agar layer (ISO method) and *Bluephage* methods (Table 3). The monitoring of the color change began at 30 min and continued until the control changed color (that was never observed earlier than 7:00 h after the beginning of the experiment). The resulting numbers of positive tubes out of the total number of tubes assayed for strains CB10 and

CB12, and the different times required for each phage density are presented in Table 3. Higher phage densities resulted in a color change at 2:00 h (or on a few occasions after only 1:30 h, as for samples WW9 and SL2, data not shown). Generally, tubes with high phage densities turned blue earlier (Table 3). Nevertheless, the correlation between the phage number and the time required for the color change was not always observed (see, for example, samples WW2 and WW4).

CB12 gave the same results as CB10 in highly polluted samples (wastewater and sludge, and with phage densities above 10² PFU), and only showed a few differences in four river water samples and one mussel sample with low phage counts (Table 3).

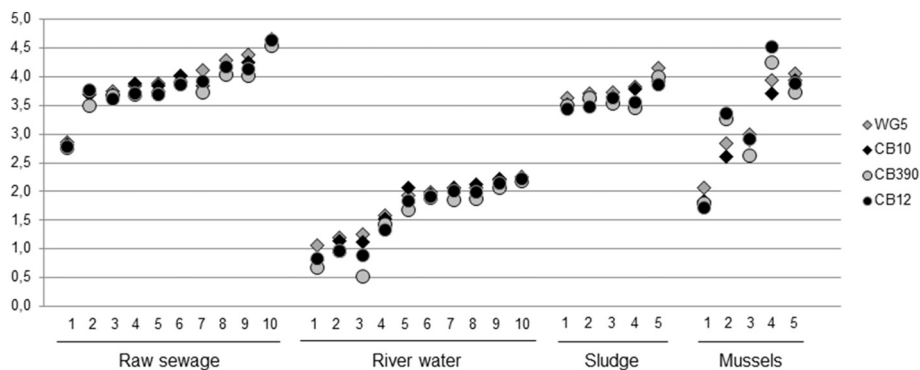


Fig. 2. Enumeration of bacteriophages from natural water samples (wastewater, river water), sludge and mussels using the double agar layer method with strains WG5 and its *Bluephage* counterpart CB10, and strain CB390 and its *Bluephage* counterpart CB12.

Table 2
Phage enumeration (PFU/ml) using laboratory reference phages for somatic coliphages (ØX174) and F-specific coliphages (MS2).

| Stock | Source | Somatic coliphages | | | Somatic coliphages + F-specific coliphages | | ΔLog_{10} |
|----------|------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--|--------------------|-------------------------|
| | | WG5 | CB10 | ΔLog_{10} | CB390 | CB12 | |
| ØX174 #1 | Laboratory | 5.47×10^8 | 5.28×10^8 | 0.02 | 4.00×10^8 | 4.66×10^8 | -0.07 |
| ØX174 #2 | Laboratory | 2.42×10^4 | 2.12×10^4 | 0.06 | 1.16×10^4 | 1.43×10^4 | -0.09 |
| ØX174 #3 | Laboratory | 2.80×10^1 | 2.07×10^1 | 0.13 | 1.28×10^1 | 1.55×10^1 | -0.08 |
| MS2 #1 | Laboratory | 0 | 0 | 0 | 2.94×10^9 | 3.24×10^9 | -0.04 |
| MS2 #2 | Laboratory | 0 | 0 | 0 | 6.80×10^4 | 6.40×10^4 | 0.03 |
| MS2 #3 | Laboratory | 0 | 0 | 0 | 7.27×10^1 | 6.45×10^1 | 0.05 |

CB12 required the same incubation time as CB10 to generate results: generally 2:30 h was enough in the most polluted samples, while more time was required (no >4:00 h) at lower phage densities. When phage densities were low and in the river samples, CB12 required more time to generate change of color, while the opposite was observed in musels. The time required to observe a color change was well within the time frame in which the phage-free control remained unaltered. Although none of the samples analyzed showed further changes after 4:00 h, the color was monitored until 7:00 h, when the control containing no sample turned blue. A false positive result (blue medium in the

absence of phages) was never observed in our experiments. Controls using diluted wastewater and river water samples, filter-sterilized to remove phages, also remained unchanged until 7:00 h.

3.4. Specificity and sensitivity of the Bluephage method using strain CB12

To confirm that the positive results of the inoculated tubes were due to the presence of coliphages that propagated using the modified host strain, the supernatant of each tube shown in Table 3 was tested after 4:00 h of incubation on the strain CB12 by a spot test. Tubes showing a change of color, tubes that did not turn blue, and control tubes were included.

All tubes that turned blue gave positive results in the spot test, confirming the presence of phages, and all negative controls tested negative for phages. The phage-containing tubes that were negative by *Bluephage* (one tube of RW3, one of RW4, two tubes of RW6, one of RW10 and one of MU3) were also negative by the spot test with one exception (RW6). These and similar experiments (data not shown) allowed us to calculate a 13.2% of false negative results (tubes negative for *Bluephage* after 4:00 h that showed a positive signal with the spot test), all of them corresponding to tubes containing <10 PFU/ml.

3.5. CB12 Bluephage method assessed by the MPN quantitative assay

A positive/negative value can be easily transformed into quantitative results by applying the Most Probable Number method (MPN). Phages in wastewater and river water samples, used directly or diluted, were enumerated by double agar layer methodologies. These values were compared with quantitative calculation by MPN of the *Bluephage* results obtained from three replicates of three decimal dilutions of each sample. The results of both methods did not differ remarkably, with slightly but not significantly ($P > 0.05$) higher values for the double agar layer method in assays with higher phage densities, and slightly but not significantly ($P > 0.05$) higher results for *Bluephage* at lower phage densities (Fig. 4).

3.6. Bluephage method is applicable on a range of scales

The method with strain CB12 is applicable to microplates using small volumes, which could be useful for MPN-based quantification. The medium used was BP-TM with 100 μl of a CB12 strain culture grown as indicated. *Bluephage* in microplates allowed the detection of coliphages in sample dilutions containing up to 10 PFU/well for wastewater and 10^{-2} PFU/well for river water in 1:30 h, and up to 10 PFU/well for wastewater and sludge and 1 PFU/well for river water in 3:30 h (Fig. 5A).

When using larger volumes (100 ml), *Bluephage* efficiency was lower with the standard BP-TM composition so this was adjusted for a better performance. Thus, BP-TM was used 2-fold concentrated to avoid the dilution caused by the sample volume; the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid was added to a final concentration of 0.07 mg/ml, 0.03% of arabinose, 0.68 ml of CaCl_2 1 M, and 8.47 ml of glycerol; and 20 ml of a culture of strain CB12 was added. Bottles containing 10^4 PFU produced positive results visible

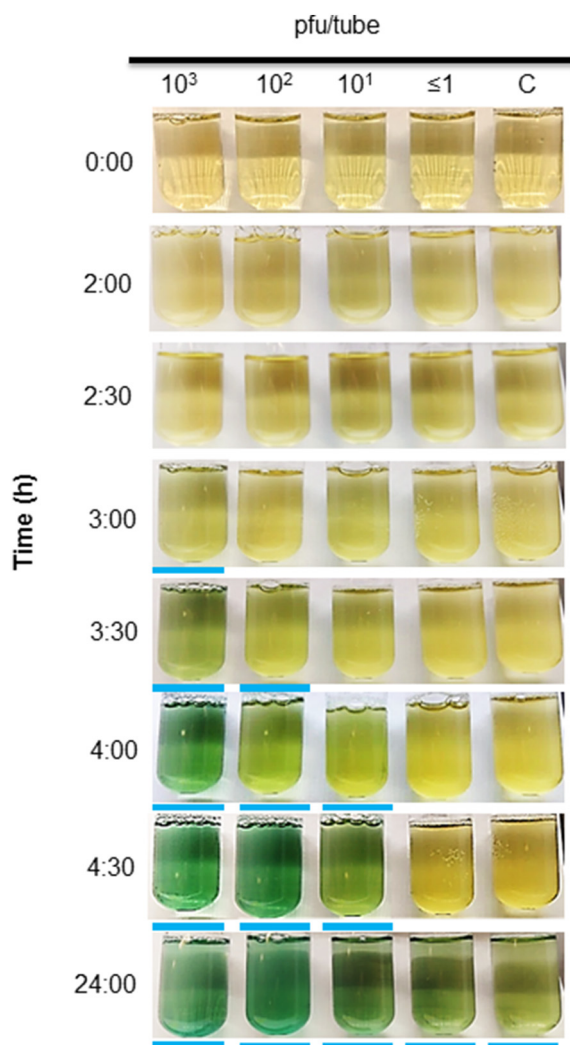


Fig. 3. *Bluephage* tube results with strain CB12 in the presence of natural phages from wastewater at decreasing densities and at different times. Blue signifies positive results and yellow negative results. The control contained CB12, BP-TM and sterilized wastewater. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 3

Comparison between the numbers of phages enumerated by the ISO method (double agar layer method, PFU/tube) or by using Bluephage in river water, urban raw wastewater, sludge and mussels. White cells show no positive tubes. Light grey, grey and dark grey cells indicate one, two or three positive tubes over 3 tubes assayed, respectively.

| Sample | CB10 PFU/tube by ISO | Bluephage | | | | | CB12 PFU/tube by ISO | Bluephage | | | | |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|------|------|------|------|----------------------------|-----------------------------|------|------|------|------|
| | | Positive tubes/ total tubes | | | | | | Positive tubes/ total tubes | | | | |
| | | 2:00 | 2:30 | 3:00 | 3:30 | 4:00 | | 2:00 | 2:30 | 3:00 | 3:30 | 4:00 |
| Wastewater | | | | | | | | | | | | |
| WW1 | 4.8 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 5.8 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW2 | 4.8 x 10 ³ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 4.1 x 10 ³ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW3 | 6.7 x 10 ² | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 6.0 x 10 ² | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW4 | 1.1 x 10 ⁴ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 7.2 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW5 | 6.9 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 4.8 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW6 | 7.6 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 5.2 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW7 | 1.8 x 10 ⁴ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1.3 x 10 ⁴ | 1/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW8 | 7.0 x 10 ³ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 8.5 x 10 ³ | 1/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW9 | 4.5 x 10 ⁴ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 4.3 x 10 ⁴ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| WW10 | 1.4 x 10 ⁴ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1.5 x 10 ⁴ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| River water | | | | | | | | | | | | |
| RW1 | 1.6 x 10 ² | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1.6 x 10 ² | 0/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| RW2 | 1.7 x 10 ² | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1.4 x 10 ² | 0/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| RW3 | 3.3 x 10 ¹ | 0/3 | 2/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 2.2 x 10 ¹ | 0/3 | 1/3 | 1/3 | 2/3 | 2/3 |
| RW4 | 1.4 x 10 ¹ | 0/3 | 0/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 9.3 x 10 ⁰ | 0/3 | 0/3 | 1/3 | 2/3 | 2/3 |
| RW5 | 1.2 x 10 ² | 0/3 | 1/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1.0 x 10 ² | 0/3 | 1/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| RW6 | 1.3 x 10 ¹ | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 7.7 x 10 ⁰ | 0/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 |
| RW7 | 1.1 x 10 ² | 0/3 | 1/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 6.9 x 10 ¹ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| RW8 | 1.3 x 10 ² | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 9.9 x 10 ¹ | 0/3 | 1/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| RW9 | 4.8 x 10 ¹ | 0/3 | 2/3 | 2/3 | 2/3 | 2/3 | 5.0 x 10 ¹ | 0/3 | 0/3 | 2/3 | 2/3 | 3/3 |
| RW10 | 6.5 x 10 ⁰ | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 2/3 | 6.7 x 10 ⁰ | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 2/3 |
| Sludge | | | | | | | | | | | | |
| SL1 | 4.4 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 4.3 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| SL2 | 8.5 x 10 ³ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 7.2 x 10 ³ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| SL3 | 6.1 x 10 ³ | 0/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3.6 x 10 ³ | 0/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| SL4 | 3.3 x 10 ³ | 0/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 2.7 x 10 ³ | 0/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| SL5 | 3.9 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 2.9 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Mussels | | | | | | | | | | | | |
| MU1 | 7.8 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 7.6 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| MU2 | 7.9 x 10 ² | 0/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 6.7 x 10 ² | 0/3 | 1/3 | 2/3 | 3/3 | 3/3 |
| MU3 | 6.0 x 10 ¹ | 0/3 | 0/3 | 1/3 | 1/3 | 1/3 | 4.7 x 10 ¹ | 0/3 | 0/3 | 1/3 | 2/3 | 2/3 |
| MU4 | 4.9 x 10 ² | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 1/3 | 3/3 | 2.2 x 10 ³ | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| MU5 | 5.3 x 10 ³ | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 2.3 x 10 ⁴ | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |

after 2:30 h of incubation (Fig. 5B), while up to 4 h of incubation were required for 10³, 10² and 10¹ PFU.

4. Discussion

Somatic coliphages and F-specific coliphages are currently the most promising groups of phages with application as fecal indicators (IAWPRC, 1991) and are reliable conservative surrogates for many

enteric viruses (U.S. EPA, 2015). Somatic coliphages are morphologically similar to DNA enteric viruses while F-specific coliphages are similar to RNA viruses such as norovirus and hepatitis A viruses, which are the viral pathogens of concern in sewage (U.S. EPA, 2015). The detection method using somatic coliphages is simple to apply; in many samples they are more abundant than F-specific coliphages and the plaques are easier to visualize. Studies indicate that somatic coliphages are excreted at higher levels than F-specific RNA coliphages and are likely to be more persistent in general than F-specific RNA coliphages (Grabow, 2001; Lee and Sobsey, 2011; Schaper et al., 2002). In contrast RNA F-specific coliphages are more abundant in reclaimed water after certain disinfection treatments such as UV irradiation (Brion et al., 2002; Montemayor et al., 2008; Muniesa et al., 2009), in some sediments (Skraber et al., 2009) and are useful for the evaluation of groundwater monitoring procedures or secondary wastewater effluents (Lucena et al., 2006; U.S. EPA, 2001a). Consequently, parallel analysis of both bacteriophage groups would cover all options, but currently implies a double workload with associated higher costs when using standardized methods. A possible solution is to use a host strain capable of detecting both groups of phages in a single analysis identical to the existing standardized methods. This approach has led to the construction of strain CB390 (Guzman et al., 2008b), that has shown its effectivity (Agulló-Barceló et al., 2016; Bailey et al., 2017). However, CB390 requires a lengthy detection procedure based on standardized protocols, involving a double-agar-layer (DAL) plaque assay for the quantification of PFU and the presence/absence test, which can also be adapted to the MPN

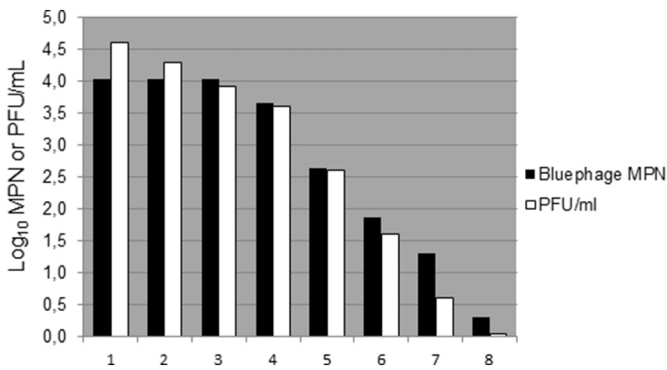


Fig. 4. Comparison of the number of phages measured by Bluephage quantitative calculation using the Most Probable Number (log₁₀ MPN) and double agar layer enumeration (log₁₀ PFU/ml) methods in eight natural water samples (wastewater and river water) diluted to achieve decreasing phage densities.

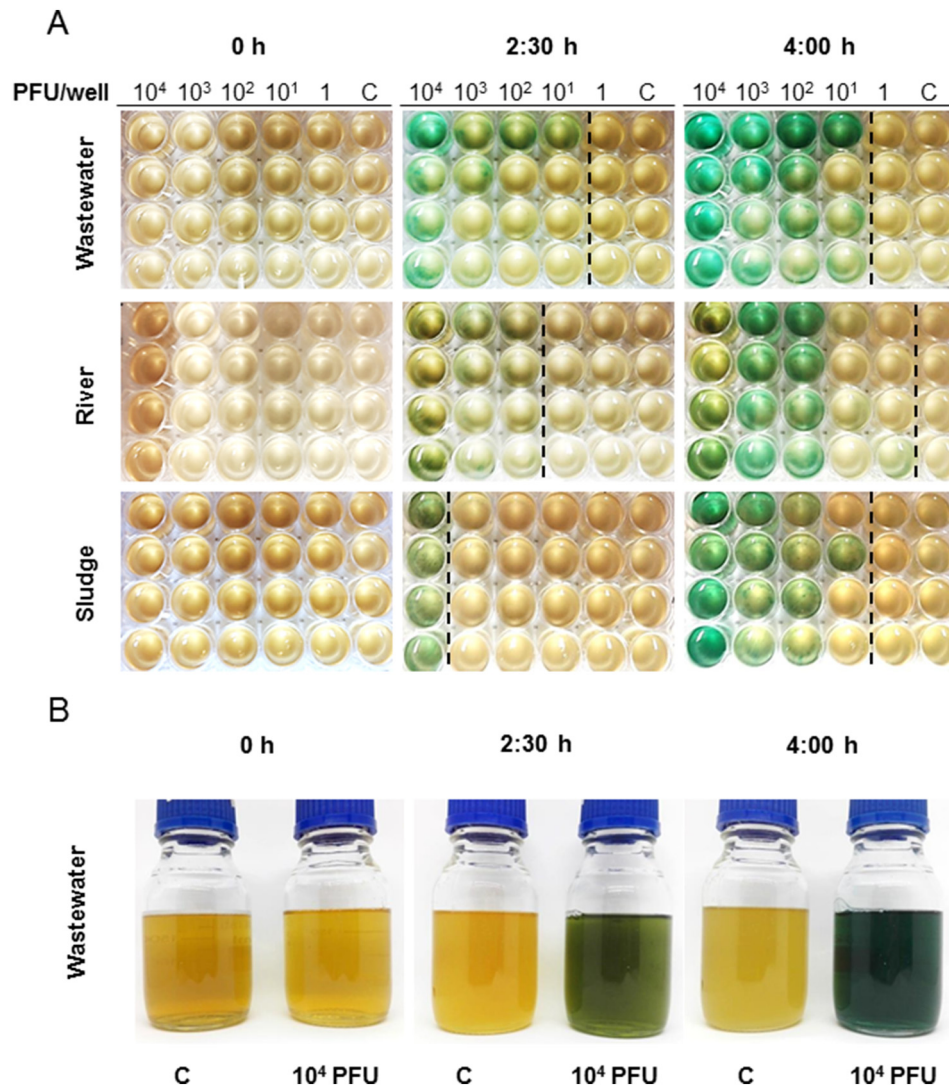


Fig. 5. A: Microplate assay of the *Bluephage* method with strain CB12 using phages from wastewater samples at different concentrations and times. Assays were conducted using the standard BP-TM and phages from wastewater, river water and sludge. **B:** *Bluephage* method with strain CB12 for 100 ml sample volumes containing phages from wastewater diluted to a concentration of 10² PFU/bottle at different times.

format (Anonymous, 1995, 2000; U.S. EPA, 2001b). The plaque assay cannot provide results in <12 h (Guzman et al., 2008).

The recently developed *Bluephage* method, applied only for somatic coliphage detection (Muniesa et al., 2018), allows detection at densities of 10 and 1 PFU per ml in 2 h and 3.5 h, respectively, and avoids false positives for at least 7–8 h. Considering that 1.5–2 h are necessary to prepare strain CB10 at an OD₆₀₀ of 0.3 for inoculation into the tubes, *Bluephage* allows the detection of one somatic coliphage per tube in a final time of 5.5 h, well within the habitual working day, being the fastest method for somatic coliphage detection reported so far.

The present study has substantially broadened the scope of *Bluephage* by generating a new strain CB12 from the original CB390, which allows the simultaneous detection of somatic and F-specific RNA coliphages. Compared with CB390, CB12 showed an improved detection of both groups of phages, whereas its detection of reference and natural phages was not significantly different. Moreover, as shown for strain CB390 (Guzman et al., 2008), the number of phages detected by CB12 was similar to CB10, and only slightly but not significantly ($P > 0.05$) below WG5. Higher numbers of F-specific RNA coliphages would not be expected in natural samples unless these had been exposed to UV light in a tertiary treatment.

Not only did the strains perform equally well, but CB12 was also successfully applied in *Bluephage* experiments, requiring the same time of incubation as CB10 to generate similar results in highly polluted samples. Only a few differences were observed in a small number of samples with lower phage counts, which could be responsible for the 15% of false negative tubes found when verifying the *Bluephage* assay results by the spot test. However, higher rates of positive spot test results have been previously obtained (Muniesa et al., 2018), and it should be taken into account that spot test sensitivity is attributed to an ulterior stage of phage propagation on the monolayer of the host strain used to detect phages in the sample supernatant. This could result in the detection of an insufficient number of phages for cell lysis in *Bluephage* cultures.

Finally, as already demonstrated for strain CB10, the method is amenable to up- and down-scaling. The use of microplates would facilitate the testing of sample dilutions, allowing *Bluephage* qualitative results to be enumerated by MPN methods, which have been shown to be equivalent to DAL enumeration. Analysis of larger volumes could contribute to an easy presence/absence test of water samples, such as the presence/absence of somatic coliphages in 100 ml of drinking water, as required by a new EU drinking water directive to be implemented in 2020 (https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/initiatives/com-2017-753_en).

5. Conclusions

The simultaneous detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages in different samples by a single host strain constitutes an improvement in pollution indicator methodology, with savings in time and cost. CB12 has been generated and validated with this purpose. The use of CB12 in the *Bluephage* approach allows the detection of somatic coliphages and F-specific RNA coliphages in under 3.5 h, well within a working day. CB12 performs very similarly to the former *Bluephage* strain CB10, and both strains improve the sensitivity reported for other available methods. Using *Bluephage*, only up to 13% of tubes did not change color, and these contained a low number of phages (below 10). The *Bluephage* method using the available strains can be adapted to microplates, allowing quantitative evaluation by MPN. Moreover, it can also be adapted to the presence/absence test for large sample volumes, making it suitable for the implementation of future EU directives on drinking water. This is the fastest microbiological method using culturable microorganisms to determine fecal pollution reported to date, and will improve results where rapid information about fecal pollution is required.

CRedit authorship contribution statement

Daniel Toribio-Avedillo: Investigation, Methodology, Writing - original draft. **Julia Martín Díaz:** Investigation, Methodology. **Juan Jofre:** Conceptualization, Supervision. **Anicet R. Blanch:** Funding acquisition, Project administration. **Maite Muniesa:** Formal analysis, Supervision, Writing - review & editing.

Acknowledgements

Authors thank Prof Fernando de la Cruz, University of Cantabria for providing plasmid pOX38Km and its complete sequence. Authors are members of the consolidated research group of the Generalitat de Catalunya (2017 SGR 170), the Xarxa de Referència en Biotecnologia (XRB) and the Institut de Recerca de l'Aigua/University of Barcelona.

Funding

This work has been partially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2016-75536) and the Aquaphage project (2016 PROD 00030, AGAUR, Catalan Government) by the Regional Development Fund (FEDER) of the European Union (FEDER 2014-2020 Operational Program). *Bluephage* is a trademark by Bluephage S.L. Authors declare no conflict of interest.

References

Agulló-Barceló, M., Galofré, B., Sala, L., García-Aljaro, C., Lucena, F., Jofre, J., 2016. Simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages in different settings by *Escherichia coli* strain CB390. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw180. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw180>.

Anonymous, 1995. ISO 10705-1. Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 1: Enumeration of F-Specific RNA Bacteriophages. Int. Stand. Organ., Geneva, Switz.

Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages.

Anonymous, 2001. Microbiology of Food Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* (Geneva, Switzerland).

Bailey, E.S., Price, M., Casanova, L.M., Sobsey, M.D., 2017. *E. coli* CB390: an alternative *E. coli* host for simultaneous detection of somatic and F+ coliphage viruses in reclaimed and other waters. *J. Virol. Methods* 250, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.016>.

Brión, G.M., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Res.* 36, 2419–2425.

Chandler, M., Galas, D.J., 1983. Cointegrate formation mediated by Tn9: II. Activity of IS1 is modulated by external DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 61–91. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80227-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80227-7).

Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.

European commission, 2017. Revision of the Drinking Water Directive (RECAST 2017) [WWW Document]. URL. https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/initiatives/com-2017-753_en.

European commission, 2018. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on Minimum Requirements for Water Reuse [WWW Document]. URL. https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/initiatives/com-2018-337_en.

Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015. National Sanitation Program. Guide for the Control of Molluscan Shellfish. Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Grabow, W., 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27, 251–268. <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i2.4999>.

Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *J. Virol. Methods* 144, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.03.017>.

Guzmán, C., Moce-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J., 2008. Evaluation of *Escherichia coli* host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 531–534. <https://doi.org/10.1128/AEM.01710-07>.

Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.

IAWPRC, 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25, 529–545. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-B](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-B).

Jofre, J., 2007. Indicators of waterborne enteric viruses. In: Bosch, A. (Ed.), *Human Viruses in Water, Perspectives in Medical Virology*. Elsevier, pp. 227–249. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17011-7](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17011-7).

Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A.R., Muniesa, M., 2016. Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water (Switzerland)* 8. <https://doi.org/10.3390/w8050199>.

Lee, H.S., Sobsey, M.D., 2011. Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat. *Water Res.* 45, 3723–3734. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.024>.

Liang, W.-J., Wilson, K.J., Xie, H., Knol, J., Suzuki, S., Rutherford, N.G., Henderson, P.J.F., Jefferson, R.A., 2005. The gusBC genes of *Escherichia coli* encode a glucuronide transport system. *J. Bacteriol.* 187, 2377–2385. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2377-2385.2005>.

Lucena, F., Ribas, F., Duran, A.E., Skrabber, S., Gantzer, C., Campos, C., Morón, A., Calderón, E., Jofre, J., 2006. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *J. Appl. Microbiol.* 101, 96–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02907.x>.

Montemayor, M., Costan, A., Lucena, F., Jofre, J., Muñoz, J., Dalmau, E., Mujeriego, R., Sala, L., 2008. The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Sci. Technol.* 57, 935–940. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.206>.

Muniesa, M., Payan, A., Moce-Llivina, L., Blanch, A., Jofre, J., 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Res.* 43, 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.038>.

Muniesa, M., Lucena, F., Blanch, A.R., Payán, A., Jofre, J., 2012. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Res.* 46. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.015>.

Muniesa, M., Ballesté, E., Imamovic, L., Pascual-Benito, M., Toribio-Avedillo, D., Lucena, F., Blanch, A.R., Jofre, J., 2018. *Bluephage*: a rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water. *Water Res.* 128. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.030>.

NHMRC: NRMCC, 2011. *Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy*. Canberra.

North Carolina Administration, 2011. *North Carolina Administrative Code 15A NCAC 2U. Raleigh, USA*.

Queensland Government, 2005. *Queensland Water Recycling Guidelines*. Brisbane, Australia.

Republica de Colombia, 2014. Decreto n° 1287. *Cráterios para el uso de biosólidos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales*. Bogota.

Republique Française, 2014. Arrêté du 25 juin 2014 modifiant l'arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts.

Rose, R.E., 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* 16, 355.

Salter, R.S., Durbin, G.W., Conklin, E., Rosen, J., Clancy, J., 2010. Proposed modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol valida. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7803–7810. <https://doi.org/10.1128/AEM.01235-10>.

Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 999. Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb., NY.

Schaper, M., Durán, A.E., Jofre, J., 2002. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3702–3707.

Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J.P., Jofre, J., Muniesa, M., 2006. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol. Biol.* 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-31>.

Skraber, S., Schijven, J., Italiaander, R., Husman, A.M. de R., 2009. Accumulation of enteric bacteriophage in fresh water sediments. *J. Water Health* 7, 372. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.098>.

Sobsey, M.D., Yates, M.V., Hsu, F.C., Lovelace, G., Battigelli, D., Margolin, A., Pillai, S.D., Nwachuku, N., 2004. Development and evaluation of methods to detect coliphages in large volumes of water. *Water Sci. Technol.* 50, 211–217.

U.S. EPA, 2001a. *Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure*. EPA 821-R-01-029. Washington D.C.

- U.S. EPA, 2001b. Method 1601: Detection of Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure. EPA 821-R-01-030. Washington D.C.
- U.S. EPA, 2006. National Primary Drinking Water Regulations: Groundwater Rule. Final Rule; 40 CFR Parts 9, 141 and 142. vol. 71. Federal Register, Washington D.C.
- U.S. EPA, 2015. Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality. EPA 820-R-15-098. Washington D.C.
- U.S. EPA, 2016. 2016 Coliphage Experts Workshop: Discussion Topics and Findings. Office of Water (EPA 823-F-16F001).
- Western Australian Government, 2012. Western Australia Guidelines for Biosolids Management. Perth. Australia.
- WHO, 2017. Potable reuse: Guidance for Producing Safe Drinking-water. World Health Organization, Geneva, Switzerland (License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO).

4.5 Artículo 5:

Detección de colifagos F-específicos mediante el método *Bluephage*

Daniel Toribio-Avedillo, Julia Martín-Díaz, Pedro Blanco-Picazo, Anicet R. Blanch, Maite Muniesa

Water Research (2020); 184:116215. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116215

Introducción

La transmisión de patógenos debida a la contaminación fecal de aguas está asociada a miles de muertes diarias a nivel global (Naughton and Mihelcic 2017). Tradicionalmente se han usado indicadores bacterianos para el control de la contaminación fecal en aguas, pero debido a la diversidad de los patógenos que podemos encontrar en el ambiente, los indicadores bacterianos no son capaces de predecir correctamente el riesgo de determinados grupos de patógenos como los virus o los protozoos. Por ello, se han propuesto indicadores alternativos para estos grupos de patógenos entre los que se encuentran los colifagos, que actualmente están siendo incluidos en múltiples normativas alrededor del mundo (IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991; Muniesa and Jofre 2007; World Health Organisation 2017).

Los métodos estandarizados actuales requieren una preparación previa de materiales, personal cualificado y más de 8 horas en total para obtener resultados. La demanda de nuevos métodos que sean sencillos y económicamente rentables ha crecido en los últimos años con el objetivo de intentar solucionar los inconvenientes de los métodos tradicionales. Recientemente han surgido varias propuestas que buscan mejorar los métodos estandarizados (Muniesa et al., 2018; Rames and Macdonald, 2019), entre las cuales está el método *Bluephage*. Esta aproximación es un método colorimétrico que permite la detección de colifagos gracias a unas modificaciones genéticas en el operón de metabolismo del ácido glucurónico que causan la sobreexpresión de la enzima e impiden la entrada de su sustrato al citoplasma. De este modo la enzima y el sustrato solo entran en contacto tras un proceso de lisis celular. Es el método cultivable más rápido descrito actualmente, detectando colifagos somáticos o totales infecciosos en menos de 4 horas de incubación (Muniesa et al., 2018; Toribio-Avedillo et al. 2019).

En este estudio se decidió aplicar las modificaciones genéticas realizadas en el método *Bluephage* sobre cepas capaces de detectar exclusivamente colifagos F-específicos. La validez

de este grupo de colifagos como indicadores virales de contaminación fecal ha sido estudiada exhaustivamente a lo largo de las últimas décadas (Calci et al., 1998; Grabow, 2001; Jebri et al., 2017; Jofre, 2007). Este subgrupo requiere como prerrequisito para la infección de la formación de pili en las bacterias huéspedes. Los pili son estructuras conjugativas que se prolongan hacia el exterior celular cuando las bacterias huéspedes crecen a temperaturas superiores a los 32°C. Debido a este requerimiento de temperatura su propagación ambiental es extremadamente improbable (Havelaar and Hogeboom, 1988). Dos cepas huéspedes son utilizadas en los métodos estandarizados: *Salmonella entérica* WG49 y *Escherichia coli* HS/FAmp en los métodos descritos por la ISO y la U.S. EPA respectivamente (Havelaar and Hogeboom 1984; Debartorlomeis and Cabelli 1991).

Objetivos

Para este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- Adaptar el protocolo de *Bluephage* a la detección de colifagos F-específicos mediante el diseño de nuevas cepas huéspedes derivadas de las cepas utilizadas en los métodos estandarizados.
- Ensayar las nuevas cepas en diferentes muestras ambientales y de laboratorio para demostrar su capacidad de detección mediante ambas metodologías, estandarizada y *Bluephage*.
- Demostrar la aplicabilidad a metodologías cuantitativas del protocolo de *Bluephage* adaptado a la detección de colifagos F-específicos.
- Valorar la posibilidad de adaptación a nuevos volúmenes de la metodología *Bluephage* con las nuevas cepas huéspedes.
- Mejorar la eficiencia de la detección de colifagos F-específicos en ambos métodos mediante modificaciones en la agitación durante la incubación y el tiempo de incubación de las cepas huéspedes.

Resultados

Se desarrollaron dos nuevas cepas de *E. coli* capaces de detectar colifagos F-específicos mediante el método *Bluephage* siguiendo las modificaciones genéticas descritas en Muniesa et al. 2018 y Toribio-Avedillo et al. 2019. La cepa CB14 es una *E. coli* derivada de la cepa HS empleada en los métodos estandarizados de la U.S. EPA. La cepa CB16 es una *S. entérica* derivada de WG49 empleada en los métodos estandarizados de la ISO. Las modificaciones genéticas realizadas para la obtención de estas cepas están recogidas en la Figura 1 del artículo. Todas las modificaciones realizadas fueron comprobadas posteriormente mediante PCR para confirmar su presencia en las nuevas cepas.

El rendimiento de detección de colifagos F-específicos de las cepas CB14 y CB16 fue analizado mediante la titulación de diferentes suspensiones de fagos con alta, media y baja concentración de colifagos F-específicos de referencia (MS2, FI, GA, Q β) empleando el método DAL. La cepa *E. coli* CB12 y las cepas de las que derivan cada una de estas 3 cepas *Bluephage* (CB390, HS y WG49) fueron empleadas como huéspedes para la comparación de su susceptibilidad a la infección por fagos. No se observaron diferencias significativas en la capacidad de detección de colifagos F-específicos entre ninguna de las 6 cepas ensayadas ($p > 0,05$).

Demostrado el rendimiento de las nuevas cepas analizando suspensiones de laboratorio, se ensayaron con fagos de muestras ambientales de diversos orígenes (agua residual, aguas de río, lodos de depuradora, marisco y pescado) bajo las mismas condiciones, metodología y cepas huéspedes de referencia. En la Figura 2 del artículo se observa que sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cepas capaces de contar colifagos totales y las cepas que detectan exclusivamente colifagos F-específicos en las muestras de lodos, río, mar y pescados. Esta diferencia se debe probablemente a una mayor presencia de colifagos somáticos en las muestras analizadas.

Con las mismas muestras ambientales y suspensiones de fagos referencia se realizaron ensayos de *Bluephage* usando como huéspedes las cepas CB12, CB14 y CB16 monitorizando hasta 5 horas de incubación a 37°C. Los colifagos de referencia F-específicos analizados producían los cambios de color tras las 2 horas de incubación para concentraciones altas de fagos, de 3 a 4 horas para concentraciones moderadas y 5 horas para concentraciones bajas. Lo mismo se cumplía en el caso de las cepas CB12 y CB14 en muestras ambientales, como se refleja en la Figura 3 del artículo. No se observó una correlación exacta entre cambio de color y concentración de colifagos de la muestra, si bien las concentraciones más altas generalmente

producían el cambio antes (tiempos cercanos a las 2 o 3 horas) y las más bajas, más tarde (tiempos cercanos a las 4 o 5 horas). En el caso de la cepa CB16, en las muestras ambientales los resultados fueron menos consistentes. En múltiples ocasiones los cambios fueron observados en tiempos superiores a lo esperado teniendo en cuenta los resultados de las otras 2 cepas, llegando incluso a no producir cambios en algunas muestras donde las otras cepas proporcionaban resultados positivos.

En cuanto al estudio de la aplicabilidad a diferentes volúmenes y en ensayos cuantitativos mediante la técnica del NMP se emplearon microplacas de 96 pocillos para ensayos *Bluephage*. El medio BTM fue adaptado para mantener las proporciones originales en este nuevo volumen. Se usaron 3 muestras de cada tipo de muestra ambiental ensayado previamente, con 3 diluciones de cada una por triplicado para realizar los cálculos. La cepa CB14 obtuvo un buen rendimiento, sin presentar diferencias significativas entre los valores calculados por NMP y los recuentos reales ($p > 0,05$). Sin embargo, la cepa CB16 presentó unos resultados muy variables e inconsistentes entre réplicas y no se pudieron calcular los valores del NMP correspondientes.

La optimización del proceso de crecimiento fue valorada mediante el estudio de la influencia de la agitación y el tiempo de incubación en el crecimiento de las cepas huéspedes para la detección de colifagos F-específicos. Los experimentos se realizaron con suspensiones de colifagos F-específicos de referencia a distintas concentraciones y muestras ambientales usando las cepas CB14 y CB16 y las cepas usadas en la metodología estándar, HS y WG49, como huéspedes. En el caso de las cepas HS y CB14, tanto la ausencia de agitación como aumento del tiempo de incubación causaban diferencias significativas en la detección de colifagos F-específicos en determinados subgrupos de muestras ($p < 0,05$), aumentando el recuento en la detección de fagos por parte de la cepa HS en muchos casos. Las Figuras 5 y 6 del artículo indican cuales de estas muestras en concreto para cada cepa huésped. En el caso de las otras 2 cepas (CB16 y WG49) las modificaciones en la agitación o en los tiempos de incubación no causaron ningún cambio significativo en el recuento de fagos.

Discusión

Los colifagos somáticos y los colifagos F-específicos han sido propuestos como indicadores víricos de contaminación fecal en diferentes normativas a lo largo del mundo. Los colifagos somáticos suelen ser más abundantes que los fagos F-específicos, pero los colifagos F-específicos tienen una dinámica de crecimiento más parecida a los virus entéricos. Además,

bajo determinadas condiciones como tras tratamientos con UV o en algunos tipos de muestras como aguas regeneradas, sedimentos arcillosos o agua subterránea los colifagos F-específicos predominan frente a los somáticos (Ballester et al., 2005; Jebri et al., 2017; Jofre, 2007; Montemayor et al., 2008), por lo que son preferibles como indicadores a los colifagos somáticos. Por ello, el estudio de su comportamiento y el desarrollo de métodos que permitan una detección rápida y optimizada son importantes para el futuro de la detección de contaminación fecal vírica.

Gracias al método *Bluephage* se puede detectar hasta 1 colifago F-específico en menos de una jornada laboral en muestras de diversos orígenes. La obtención de resultados requiere de 2-3 horas de la incubación de la cepa huésped y generalmente unas 4 horas como máximo de incubación en medio BTM para la detección del cambio colorimétrico. En el caso de las nuevas cepas desarrolladas, la cepa CB14 crece excepcionalmente rápido en comparación con las cepas CB16 y CB12, aunque detecta ligeramente menos colifagos en el método estandarizado. Afortunadamente, este problema puede verse paliado gracias a las optimizaciones descubiertas respecto a la agitación y tiempo de incubación en este mismo estudio. La cepa CB16, aunque ofrece buenos resultados en las técnicas tradicionales, crece con mayor lentitud y rinde de manera inconsistente en los ensayos de *Bluephage*. Esto podría ser debido a que la presencia de plásmidos de *E. coli* en una cepa de *Salmonella* y la sobreexpresión de un gen no nativo de esta especie conllevan unos costes de adecuación excesivos que causan un crecimiento más lento e irregular. Estas dificultades no suponen un problema en los ensayos de DAL ya que requieren tiempos de incubación largos y permiten que la cepa tenga suficiente tiempo de adaptación. Pero supone un gran inconveniente para su aplicación en métodos de detección rápida ya que no permite obtener resultados rápidos y robustos de manera consistente. Respecto a los análisis cuantitativos y la variación de volúmenes de muestra, la cepa CB14 de nuevo demostró ser la cepa más apropiada y eficiente para ambos tipos de ensayos en comparación con la irregularidad de resultados mostrada por la cepa CB16.

La ausencia de agitación y los tiempos superiores de incubación mejoraron la sensibilidad de la cepa derivada de HS (CB14) en cuanto a detección de colifagos F-específicos mediante el método DAL. La ausencia de agitación probablemente contribuye a una menor ruptura mecánica de pili (Wetzel 1999), y el uso de la cepa huésped en una fase de crecimiento exponencial tardía podría promover la detección de fagos ya que permitiría una mejor unión entre fago y pili (Lampkowska et al. 2008). Estos cambios, aun siendo menores, suponen una disminución en las diferencias observadas tradicionalmente entre los recuentos de colifagos por

las cepas HS y WG49, ya que se había observado que la WG49 detectaba un número mayor de fagos (Jofre, 2007; Schaper and Jofre, 2000). Aplicando estas modificaciones en la metodología se igualan los recuentos de colifagos F-específicos en ambas cepas.

Conclusiones

- El uso de las nuevas cepas CB14 y CB16 en el método *Bluephage* permite la detección de colifagos F-específicos en menos de 5 horas mediante el método de *Bluephage*, dentro de los límites de una jornada de trabajo.
- La cepa CB14 rinde de manera similar a CB12 en el método *Bluephage* y su sensibilidad ha sido mejorada gracias a optimizaciones del método de crecimiento. La cepa CB12 se mantiene por encima en recuentos de manera significativa debido a su capacidad de detectar colifagos totales, incluyendo a los colifagos somáticos, que típicamente son más abundantes en muestras ambientales.
- El método es aplicable a técnicas cuantitativas mediante el uso de la técnica del NMP y es adaptable a volúmenes inferiores como en microplacas con la cepa CB14. Es potencialmente adaptable a ensayos de presencia/ausencia en altos volúmenes, tal como las recientes nuevas directivas de aguas de consumo en la UE requieren.
- Las modificaciones en el método respecto a la agitación y tiempo de incubación (incubación estática y 50 minutos de incubación extra) suponen una optimización de la detección de colifagos F-específicos en el ambiente y favorecen el rendimiento de la cepa HS respecto a la detección de colifagos y consecuentemente de la cepa *Bluephage* CB14.

(Nota: Los medios, tampones, protocolos, plásmidos y cebadores empleados en este artículo se encuentran descritos en los Anexos 2-5.)



F-specific coliphage detection by the *Bluephage* method

Daniel Toribio-Avedillo, Julia Martín-Díaz, Pedro Blanco-Picazo, Anicet R. Blanch, Maite Muniesa*

Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Barcelona E-08028, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2020

Revised 16 July 2020

Accepted 20 July 2020

Available online 21 July 2020

Keywords:

Viral indicator

Fecal pollution

Coliphages

F-specific coliphages

Virus

New tools

Glucuronidase

ABSTRACT

F-specific coliphages have been proposed as viral indicators of fecal pollution. These intestinal phages infect cells through the F-pili of the host strains used for their detection, *Escherichia coli* HS/Famp in the US-EPA standard method and *Salmonella enterica* WG49 in the ISO method.

The recently designed *Bluephage* protocol allows the rapid detection of as low as one somatic coliphage in a working day. The current study describes a new *Bluephage* method designed to exclusively detect F-specific phages. It employs two new host strains, CB14 and CB16, which detect the same number of F-specific phages as their respective parental strains HS and WG49. In the *Bluephage* method, when the strain is lysed by bacteriophage infection, the yellow medium turns blue. As low as one F-specific phage was detected in 3 to 5 h by this approach and when the sample contained high phage concentrations, results were obtained in less than 3 h. The F-specific *Bluephage* method can be used with different sample volumes and allows phage quantification by the most probable number technique. Strain CB14 performed more consistently than CB16, with comparable detection efficiency after increasing the incubation time to 50 min without shaking.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fecal water pollution has been linked with pathogen transmission for centuries and is still causing thousands of human deaths daily (Naughton, Coleen, and Mihelcic, 2017). Traditionally, bacterial indicators such as *Escherichia coli* have been used to determine the levels of fecal pollution in water and food. Nevertheless, the diversity of pathogens and the inability of bacterial indicators to predict the risk of viral or protozoan contamination in these environments has prompted a search for new indicators (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Muniesa and Jofre, 2007; WHO, 2017). In this scenario, several groups of bacteriophages have been proposed as indicators of viral fecal pollution, particularly in water, including somatic coliphages, F-specific RNA coliphages and some phages infecting *Bacteroides* (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991).

Since the elaboration of standardized methods for the detection of somatic (Anonymous, 2000) and F-specific RNA coliphages (Anonymous, 1995), coliphages have been progressively included in several guidelines around the globe (Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015; Republique Française, 2014; Western Australian Gov-

ernment, 2012), including water quality regulations in the USA (Nappier et al., 2019; U.S. EPA, 2015) and new directives in the EU for drinking and reused water (Council of the European Union, 2020).

The increasing interest in coliphage detection has created a demand for user-friendly and cost-effective methods that are feasible for routine analysis laboratories. Although standardized methods for detecting F-specific coliphages are available (Anonymous, 1995; U.S. EPA, 2001a, 2001b), they are not easy to implement, require previous preparation of calibrated biological materials, and in the best of cases, in the hands of qualified analysts, take more than 8 h to yield results. As a consequence, alternatives have been proposed (Muniesa et al., 2018; Rames and Macdonald, 2019), including the *Bluephage* method, which detects somatic coliphages using an *E.coli* strain genetically modified in the operon responsible for glucuronic acid metabolism (Liang et al., 2005). The modifications consist of knocking out glucuronic acid transporter genes (*uidB* and *uidC*) and overexpression of the β -glucuronidase gene (*uidA*), which leads to the accumulation of β -glucuronidase in the cytoplasm of the bacterial host cell. After lytic phage infection, the yellow medium turns blue as the released enzyme encounters its chromogenic substrate. *Bluephage* allows the detection of as low as 1 coliphage in under 4 h, and is the fastest method currently available for infectious somatic coliphages (Muniesa et al., 2018) and total coliphages (Toribio-Avedillo et al., 2019).

* Corresponding author.

E-mail address: mmuniesa@ub.edu (M. Muniesa).

The present study is focused on F-specific coliphages, which infect *E. coli* and other enterobacteria through the F-pilus, encoded in an F-plasmid. These pili are sensitive structures that cannot be formed under 32 °C (Havelaar and Hogeboom, 1988), which impedes the environmental propagation of F-specific phages, a prerequisite for a fecal pollution indicator. F-specific RNA phages have been extensively studied over the last decades and validated as tools for viral fecal pollution detection in water (Calci et al., 1998; Grabow, 2001; Jebri et al., 2017; Jofre, 2007). Standard methods use different strains as hosts for F-specific RNA phages, *Salmonella enterica* strain WG49 in the ISO methods (Anonymous, 1995; Havelaar and Hogeboom, 1984) and *E. coli* strain HS/F-Amp in the U.S. EPA methods (Debartolomeis and Cabelli, 1991; U.S. EPA, 2001c, 2001b).

The aim of the present study was to design a *Bluephage* protocol for the targeted detection of F-specific coliphages by incorporating new strains. In addition, seeking to improve the efficiency of F-specific coliphage detection in both traditional and *Bluephage* methods, different incubation conditions were tested with all the host strains.

2. Materials and methods

2.1. Medium and growth conditions

The media and conditions used were those previously established for the culture of strains *E. coli* CB10 and CB12 (Muniesa et al., 2018; Toribio-Avedillo et al., 2019). The protocols employ a modified version of Modified Scholten's Broth (MSB) (Anonymous, 1995), referred to here as *Bluephage* medium. Briefly, the *Bluephage* growth medium (BGM) used for the strain propagation was MSB supplemented with 0.05% (w/v) arabinose, ampicillin (ap) (100 µg/ml) and/or kanamycin (km) (50 µg/ml), depending on the strain used. The *Bluephage* test medium (BTM) used for the assay was MSB supplemented with 0.05% (w/v) arabinose, 0.5% (v/v) glycerol, 15 µl CaCl₂ 1 M and 0.1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid. The temperature for bacterial growth and phage tests in the different media and strains was always 37 °C and the periods of time varied.

To generate the new strains, Modified Scholten's agar (MSA) plates were supplemented with tetracycline (tc) (10 µg/ml), ampicillin (ap) (100 µg/ml) or kanamycin (km) (50 µg/ml). For conjugation experiments, LB broth or LB agar with ap and/or km were used. A Chromocult® agar plate (Merck, Darmstadt) containing x-glucuronide was used to check the inability of the newly developed CB14 and CB16 strains to incorporate the x-glucuronide. Colonization factor antigen (CFA) agar medium (1% Casamino acids, 0.15% yeast extract, 0.005% MgSO₄, 2% MgCl₂ and 2% agar), was used for electron microscopy visualization as it enhances pilus formation (Evans et al., 1977).

2.2. Plasmids

Plasmid pKD46 (GenBank AY048746), expressing the Red recombinase system, was used to insert DNA fragments into the *E. coli* chromosome (Datsenko and Wanner, 2000). The tetracycline resistance gene (*tet*) was amplified from plasmid pACYC184 (Genbank X06403) (Rose, 1988). The pBAD-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) containing an ap resistance marker was used to clone and overexpress the *uidA* gene. The F plasmid derivative pOX38Km (Chandler and Galas, 1983), containing a km resistance marker, was obtained from strain *E. coli* DH5α[pOX38Km], kindly provided by Prof F. de la Cruz (University of Cantabria, Spain). All the vectors were purified using Invitrogen™ PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific).

2.3. Samples and bacteriophages

This study used naturally occurring F-specific total coliphages purified from different samples and enumerated using the ISO 10705-1 protocol (Anonymous, 1995). Ten samples of raw urban sewage (containing ca 10⁴⁻⁵ PFU/ml) were collected from the influent of a wastewater treatment plant serving a population of approximately 500,000 inhabitants. The same plant was the source of five sewage sludge samples, which were a composite mixture of raw primary sludge (about two-thirds) and secondary sludge (about one-third). Eight samples were also collected from the lower course of the River Llobregat (ca 10¹⁻² PFU/ml), with the sampling points located in the Barcelona area (Catalonia, NE Spain). Five samples of seawater were collected from beaches in the metropolitan area of Barcelona. Seven samples of different kinds of shellfish (four of clams and three of mussels) and five of fish (two of mackerel, two of emperor fish and one of monk fish) were obtained from five local supermarkets of Barcelona. All samples were collected in sterile containers, transported to the laboratory at 5 ± 2 °C within two hours of collection, and processed immediately for bacteriophage enumeration and further experiments.

To purify bacteriophages from natural water samples (raw sewage, river water and sea water), samples were filtered through 0.22 µm pore size, low-protein-binding (PES) membranes (Millipore, Burlington, Massachusetts USA) to remove bacteria and other particulate material.

Phage extraction from sludge was performed as indicated in established policies (Guzmán et al., 2007), with minor modifications. Briefly, the samples were mixed in a 1:10 (w/v) ratio with 10% beef extract (pH 7.2) and homogenized by magnetic stirring for 30 min at room temperature. The suspension was then centrifuged at 10,000 xg for 30 min at 4 °C. The supernatant was filtered through 0.22 µm pore size, low-protein-binding (PES) membranes (Millipore).

For the study of phages in shellfish and fish, samples were spiked with F-specific coliphages isolated from raw sewage to reach a final estimated concentration of 10²⁻³ PFU/g of sample. Phages were incubated with the samples for 2 h at 23 °C. Phages were extracted from the clams, mussels and fish samples using previously reported methods (Lucena et al., 1994). Briefly, mussel/clam meat from a minimum of 10 mussels/clams per sample or 50 g of fish was homogenized in a Stomacher for 5 min. Elution of phage particles was performed on 100 ml of the homogenate by magnetic stirring for 15 min in 400 ml of borate buffer (0.01 M) containing 3% beef extract (pH 9.5). After neutralization to pH 7.2, the treated homogenate was clarified by centrifugation at 2,500xg for 15 min at 4 °C and then filtered through 0.22 µm pore size, low-protein-binding (PES) membranes.

Besides natural samples, reference bacteriophages obtained from laboratory stocks were analyzed. Suspensions of known concentration (10⁹ PFU/ml) of pure cultures of phages ΦX174 (NCBI:txid10847), MS2 (NCBI:txid12022), FI (NCBI:txid39804), GA (NCBI:txid12018) and Qβ (NCBI:txid39803) were used as reference phages for somatic coliphages (ΦX174) and F-RNA specific coliphages (MS2, FI, GA and Qβ) in accordance with the ISO protocols for bacteriophage enumeration (Anonymous, 2000, 1995).

Environmental phage laboratory stocks were also used in some of our analyses. For their preparation, we analyzed environmental samples with a high coliphage concentration and used strain WG49 to detect F-specific coliphages by double agar layer (DAL) methodology (Anonymous, 1995). Semisolid agar (containing bacteriophages) was recovered from Petri dishes with confluent bacteriophage plaques and diluted in phage buffer (22 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, 85 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, and 0.1 mM CaCl₂). It was then thoroughly mixed for 3 min and centrifuged at 16,000

xg for 5 min. The supernatant was filtered through 0.22 μ m pore size, low-protein-binding (PES) membranes and stored at -80 °C.

2.4. PCR techniques

PCRs were performed with a GeneAmp 2400 PCR system (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems, Barcelona, Spain.). The oligonucleotides used in this study (Table S1) were designed from the sequence available for *E. coli* K-12 (GenBank Accession number NC_000913). The primers for the detection of the F plasmids were designed from the sequence of the pOX38Km plasmid (F. de la Cruz, personal communication).

2.5. Electroporation

Electrocompetent cells were prepared from 50 ml of culture in super optimal broth (SOB) medium (Hanahan, 1983) with 0.05% L-arabinose as previously described (Sambrook and Russell, 2001), mixed with 0.5 μ g of DNA (plasmid or PCR-product) and transferred to a 0.2 cm electroporation cuvette (Bio-Rad, Inc., Hercules, California, USA). The cells were electroporated at 2.5 kV with 25 F and 200 Ω . Cells containing the construct were recovered on MSA agar plates with the corresponding antibiotic.

2.6. Generation of tailored CB14 and CB16 strains

E. coli strain CB14 was generated from *E. coli* strain HS (F-Amp), which is recommended in the US EPA standard method for F-specific coliphage detection (U.S. EPA, 2001b, 2001a). Strain CB16 was developed from *S. enterica* strain WG49, used in the ISO standard method for F-specific coliphage detection (Anonymous, 1995).

The *E. coli* HS derivative mutant strain CB14 was obtained as follows. First, using the acridine orange method (Hirota, 1960), the HS strain was cured of its F-Amp plasmid due to the incompatibility of selection markers with the pKD46 and pBAD plasmids used later. Plasmid curation was confirmed by PCR with primers Fkm up/lp (Table S1). A mutant of the cured HS strain was generated by replacing genes *uidB* and *uidC* with a *tet* cassette. This was carried out using the red recombinase system introduced in plasmid PKD46 (Datsenko and Wanner, 2000), prepared as described previously (Muniesa et al., 2018). Without the *uidB* and *uidC* genes, the strain would be unable to incorporate the glucuronic acid substrate into the cells. The strain was then manipulated to overexpress the *uidA* gene, which encodes the enzyme β -glucuronidase, responsible for the cleavage of glucuronic acid. This was achieved by transforming the HS mutant with the plasmid pBAD-TOPO® TA Expression Kit containing *uidA* under the expression of an arabinose-inducible promoter *araBAD* (Thermo Fisher Scientific). The strain containing pBAD::*uidA* in the presence of 0.05% of arabinose in the medium accumulates high intracellular amounts of the enzyme. The protocol and primers used to generate and confirm the construct were as previously described (Muniesa et al., 2018).

F-plasmid derivative pOX38Km containing kanamycin resistance as a selective marker was introduced by conjugation in the modified HS strain. Thus, a loop of the donor strain (*E. coli* DH5 α [pOX38Km]; kmR) was inoculated horizontally on one side of an LB agar plate containing km and ap. A loop of the recipient strain (modified *E. coli* HS Δ *uidBC*::*tet*; apR) was inoculated perpendicularly to the loop of the donor strain, crossing with the donor strain in the central part of the agar plate. Plates were incubated for 10 h at 37 °C and transconjugant colonies were selected from the central interphase and confirmed by PCR with primers Fkm up/lp (Table S1). F-plasmid derivative pOX38Km allowed expression of the F-pili required for F-specific coliphage infection in the final strain CB14.

The generation of strain CB16 only required the introduction of the pBAD::*uidA* plasmid, as the original *S. enterica* WG49 strain does not possess the β -glucuronidase operon in its genome and already contains a compatible F plasmid (Havelaar and Pot-Hogbeem, 1988). The pBAD::*uidA* plasmid was cloned as previously described (Muniesa et al., 2018). The presence or absence of all these genes was confirmed by PCR and sequencing with the primers described in Table S1.

2.7. Bacteriophage enumeration

The coliphage (both somatic and F-specific) detection performance of strains CB14 and CB16 was compared with that of the wild type (wt) strains HS and WG49, the *Bluephage* strain *E. coli* CB12 and strain *E. coli* CB390 (Guzmán et al., 2008).

All strains were used as hosts to detect phages Φ X174, MS2, FI, GA, and Q β and phages from raw sewage, river water, sludge, sea water, fish and mussels by both the DAL (Anonymous, 2000, 1995) and *Bluephage* methods (Muniesa et al., 2018). When using *Bluephage*, phages were analyzed in triplicate and the positive and negative results were used to quantify phages by application of the most probable number (MPN) method (Jarvis et al., 2010).

2.8. Strains CB14 and CB16 assayed using the *Bluephage* method

Bluephage strains (CB14 or CB16) were inoculated in BGM (with ap and km for CB14 and only ap for CB16) and incubated overnight at 37 °C. One ml of the overnight culture was 1/100 diluted in fresh BGM with the respective antibiotics and grown to the exponential growth phase, monitored by an optical density (OD) of 0.3 at 600 nm. At this stage, 0.5 ml of the culture was added to 2.5 ml of BTM. Strain CB12 was used for comparison as it can detect total coliphages, using the conditions described previously (Toribio-Avedillo et al., 2019).

A known number of phages purified from each sample were added to each BTM tube containing strains CB12, CB14 or CB16, and one tube of each strain in BTM without phages was used as a control in all experiments. The tubes were statically incubated at 37 °C and periodically evaluated for color change from light yellow to blue (at 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 4:30 and 5:00 h). Phage-induced cell lysis releases β -glucuronidase, which after cleaving the substrate liberates a blue chromogenic compound into the medium. Negative controls without phages were used to confirm that the *Bluephage* strains could not cause a color change in the absence of phage lysis during the time of the experiment. The experiment lasted until the control tube without phages turned blue (after a minimum of 7 h). All tubes were assayed in triplicate. As additional controls in the experiments with environmental samples, 1 ml of 1/100 diluted wastewater or 1 ml of river water filtered through high-protein binding membranes of 0.22 μ m (Millex-MF Millipore) to remove phages were inoculated in tubes containing BTM and the strain.

2.9. Influence of shaking and incubation time on F-specific bacteriophage enumeration

The influence of shaking and incubation time on F-specific coliphage detection was assessed in two different assays. The effect of shaking on F-specific coliphage enumeration was evaluated using the DAL method with host strains HS, WG49, CB14 and CB16 grown at 37 °C in static conditions (0 rpm) and shaking at 180 rpm. Twenty-one different samples comprising natural samples (wastewater and river water) and laboratory stocks (MS2, GA, FI, QB, and environmental phage laboratory stocks) were analyzed under both conditions.

The effect of the incubation time on enumeration was assessed with the same strains grown in static conditions. Phage enumeration was performed with strains HS and CB14 grown until the exponential growth phase ($OD_{600} = 0.3$, which corresponds to concentrations of 3×10^8 cells/ml), as currently used in DAL enumeration, or until a late exponential growth phase ($OD_{600} = 0.8$, corresponding to concentrations of 1×10^9 cells/ml), which involved 50 additional minutes of incubation at 37 °C). Thirty-two samples, comprising natural samples (wastewater, sludge and fish) and laboratory stocks (MS2, GA, FI, QB, and environmental phage laboratory stocks), were analyzed under both conditions.

2.10. Quantitative analysis by the Bluephage method applying the most probable number technique

For a quantitative application of the *Bluephage* method using the MPN approach, microplates of 96 wells were used, each containing dilutions of phage densities from 10^4 to 1 phage of MS2, GA, QB, and raw sewage. This experiment was performed with the same conditions, proportion of nutrients, substrate and strain as in the *Bluephage* tube assays. The microplates were incubated until 5 h, although many positive results were observed earlier. Assays were performed in triplicate and using 3 dilutions of each analyzed sample.

2.11. Transmission electron microscopy

Bacterial cell cultures were negatively stained to check for the presence of F-pili. Whole cells of strains CB10, CB12, CB14 and CB16 grown on CFA agar plates were harvested and carefully resuspended in bidistilled water. Afterwards, 10 μ l droplets of each cell preparation were applied to a copper grid overlaid with a carbon-coated Formvar film and incubated for 15 min. Afterwards, the grids were washed with 2 two droplets of bidistilled water. Finally, 10 μ l droplets of uranyl acetate (2%) were applied onto the copper grids and incubated for 1 or 2 min. Sample excess was carefully removed, and the copper grid was dried. The samples were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope (JEOL Inc. Peabody, MA USA) operating at 80 kV.

2.12. Statistical analysis

Computation of data and statistical tests were performed using the Statistical Package for Social Science software (SPSS). The ANOVA test was used to evaluate the differences between MPN, coliphage enumeration and *Bluephage* results; evaluations were based on significance levels of $\alpha = 0.05$. Data obtained from the three replicates performed for each sample or phage stock, or when indicated all data from the same type of sample or stock, were used to compare the results obtained between the different strains.

3. Results

3.1. Performance of strains detecting F-specific RNA phages

Several tests were performed to characterize the new *Bluephage* strains CB14 and CB16 and their properties. The inability of strains CB14 and CB16 to incorporate the glucuronide substrate due to the absence of *uidB* and *uidC* genes was confirmed by PCR and by culture of the strains in Chromocult agar plates, using the original strains (HS and WG49, respectively) as a control. The presence of plasmids pBAD::*uidA* and F-Kan was also confirmed by PCR analysis and sequencing using the primers described in Table S1. Schematic representations of all *Bluephage* strains, their genetic modifications and properties are shown in Fig. 1. F-pili expression

in the strains containing the F-plasmid (CB12, CB14 and CB16) was confirmed by TEM (Fig. 1).

Phage suspensions were diluted to high ($\approx 10^8$ PFU/ml), moderate ($\approx 10^4$ PFU/ml) and low ($\approx 10^{2-1}$ PFU/ml) concentrations (Table 1) and enumerated in triplicate by DAL using strains CB14 and CB16 (and their respective counterparts HS and WG49). As these strains are not capable of detecting somatic coliphages, they were not lysed by Φ X174 (Table 1). In contrast, control strain CB12 (Toribio-Avedillo et al., 2019) (and its counterpart CB390) can be infected by both somatic and F-RNA specific coliphages, and was therefore able to detect Φ X174 and all the F-specific reference phages (Table 1).

No significant differences ($p > 0.05$) were found in enumeration by the DAL method when comparing the *Bluephage* with the non-modified strains for each stock separately (Table 1).

3.2. Sensitivity of strains CB14 and CB16

Phage enumeration by the DAL method using the standard strains (CB390, HS or WG49) did not differ significantly ($p > 0.05$) from the results using their counterpart *Bluephage* strains (CB12, CB14 or CB16 respectively), when considering all the samples together or when analyzing each sample type separately.

In contrast, significantly higher counts were obtained in sludge ($p = 0.0048$), river water ($p = 0.0096$), sea water ($p = 0.0079$) and fish ($p = 7.08E-08$) (Fig. 2) when using total coliphage-detecting strains (CB390 or its *Bluephage* strain CB12) in comparison with strains susceptible only to F-specific phage infection (HS/CB14 and WG49/CB16), which is attributed to the presence of somatic coliphages in the environmental samples. This was plausibly also the case in wastewater, although in wastewater samples the differences between total coliphage-detecting and F-specific-detecting strains were not significant. In contrast, no significant differences ($p > 0.05$) were observed when comparing the results of the strains (HS/CB14) versus (WG49/CB16) since all exclusively detect F-specific coliphages (Table 1 and Fig. 2).

3.3. Time required by CB14 and CB16 to detect reference and environmental F-specific coliphages

To study their performance further, the CB14 and CB16 strains and their wild counterparts were incubated with suspensions of known phage concentration from laboratory stocks and environmental samples and the *Bluephage* strains were tested in the BTM containing the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid.

Before starting the *Bluephage* protocol, incubation times were compared. The most rapidly growing strain was CB14, which required 2 h to reach the exponential growth phase, whereas CB12 and CB16 had a similar incubation time of around 2:30 h. The faster growth of CB14 compensates for the longer times required for phage detection by the *Bluephage* assay.

When subjected to the highest concentration of reference coliphages, all the strains turned the medium blue at 2 h, with the exception of CB14 in the presence of MS2, which required 2:30 h (Fig. 3). For all the strains, when the phage concentration was moderate, the color change occurred at 3–4 h and when low, at 5 h (Fig. 3).

Environmental phages at concentrations ranging from 1 to 1000 were added to tubes containing BTM together with one of the three *Bluephage* strains (CB12, CB14 and CB16). When phage densities were high, CB12 and CB14 took only 2 h to turn the medium blue (Fig. 3) or sometimes even less (data not shown). Lower phage densities generally required more time to cause an infection, a maximum of 5 h in the case of CB12 and CB14, after which negative samples did not change. The correlation between high num-

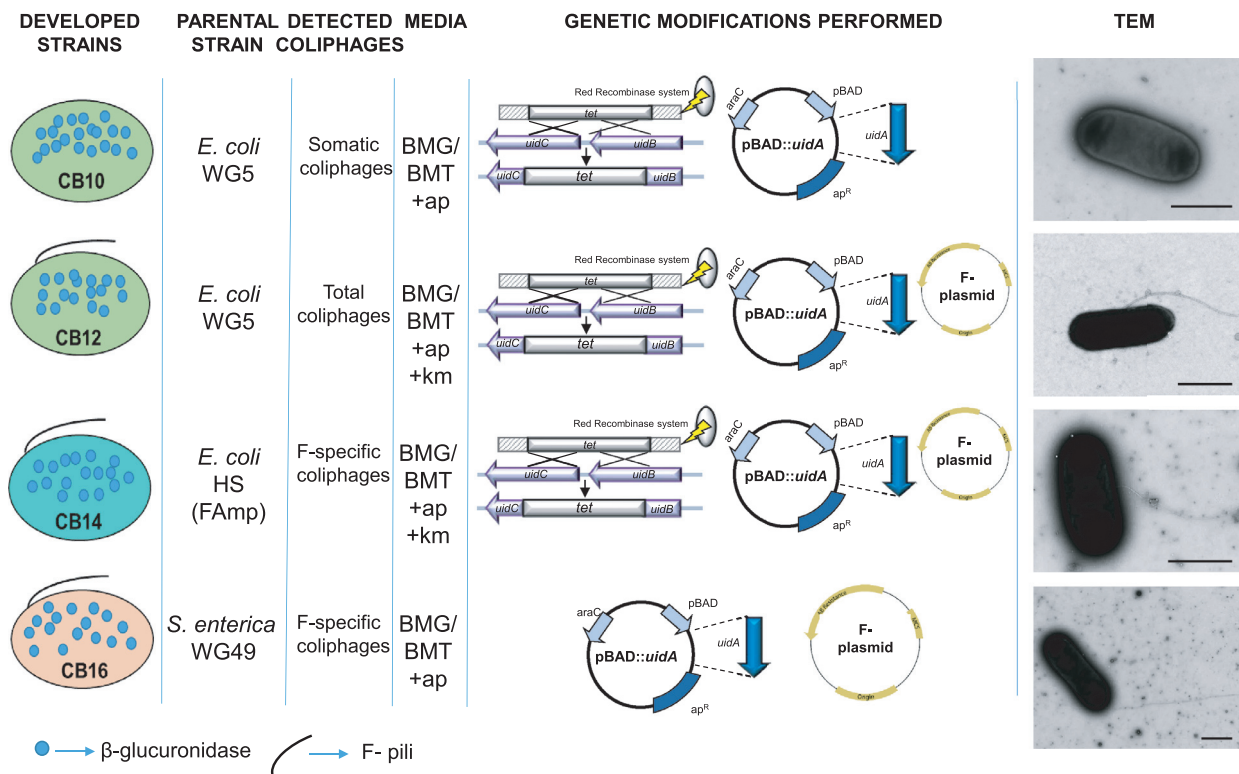


Fig. 1. Schematic representation of the developed *Bluephage* strains indicating the parental strain, the group of bacteriophages they are able to detect, the media used, the genetic modifications performed and the electron microscopy images showing the F-pili expression (bar size equals 1 μm).

Table 1

Phage enumeration (PFU/ml) using laboratory reference phages for somatic coliphages (ϕX174) and F-specific coliphages (MS2, FI, GA, $Q\beta$). All stocks were enumerated in triplicate.

| Reference stock | Source | Total coliphages | | ΔLog_{10} | F-specific coliphages | | ΔLog_{10} | F-specific coliphages | | ΔLog_{10} |
|-----------------------|------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| | | CB390 | CB12 | | HS | CB14 | | WG49 | CB16 | |
| ϕX174 - H | Laboratory | 1.63×10^8 | 2.31×10^8 | -0.150 | 0.00×10^0 | 0.00×10^0 | - | 0.00×10^0 | 0.00×10^0 | - |
| ϕX174 - M | Laboratory | 2.73×10^4 | 3.32×10^4 | -0.085 | 0.00×10^0 | 0.00×10^0 | - | 0.00×10^0 | 0.00×10^0 | - |
| ϕX174 - L | Laboratory | 2.83×10^1 | 2.78×10^1 | 0.008 | 0.00×10^0 | 0.00×10^0 | - | 0.00×10^0 | 0.00×10^0 | - |
| MS2 - H | Laboratory | 4.38×10^9 | 4.69×10^9 | -0.030 | 5.53×10^9 | 5.46×10^9 | 0.006 | 6.30×10^9 | 5.74×10^9 | 0.040 |
| MS2 - M | Laboratory | 2.94×10^4 | 3.24×10^4 | -0.042 | 2.86×10^4 | 5.67×10^4 | -0.297 | 6.86×10^4 | 4.46×10^4 | 0.187 |
| MS2 - L | Laboratory | 3.43×10^1 | 2.93×10^1 | 0.068 | 5.87×10^1 | 5.13×10^1 | 0.058 | 8.33×10^1 | 6.57×10^1 | 0.103 |
| FI - H | Laboratory | 3.90×10^{10} | 3.60×10^{10} | 0.035 | 4.23×10^{10} | 2.43×10^{10} | 0.240 | 6.13×10^{10} | 7.13×10^{10} | -0.066 |
| FI - M | Laboratory | 5.80×10^4 | 5.33×10^4 | 0.036 | 7.90×10^4 | 5.50×10^4 | 0.157 | 9.40×10^4 | 7.07×10^4 | 0.124 |
| FI - L | Laboratory | 2.94×10^1 | 1.97×10^1 | 0.174 | 4.78×10^1 | 4.05×10^1 | 0.072 | 5.74×10^1 | 5.16×10^1 | 0.046 |
| GA - H | Laboratory | 9.72×10^7 | 1.16×10^8 | -0.076 | 1.83×10^8 | 2.98×10^8 | -0.211 | 3.03×10^8 | 3.29×10^8 | -0.036 |
| GA - M | Laboratory | 1.63×10^4 | 1.57×10^4 | 0.015 | 2.17×10^4 | 1.98×10^4 | 0.040 | 2.46×10^4 | 2.19×10^4 | 0.049 |
| GA - L | Laboratory | 1.62×10^2 | 1.36×10^2 | 0.076 | 2.67×10^2 | 2.28×10^2 | 0.068 | 2.36×10^2 | 2.24×10^2 | 0.022 |
| $Q\beta$ - H | Laboratory | 4.79×10^9 | 5.30×10^9 | -0.044 | 6.20×10^9 | 5.85×10^9 | 0.025 | 6.30×10^9 | 6.21×10^9 | 0.006 |
| $Q\beta$ - M | Laboratory | 7.43×10^4 | 5.27×10^4 | 0.150 | 6.47×10^4 | 5.17×10^4 | 0.097 | 1.01×10^5 | 1.07×10^5 | -0.026 |
| $Q\beta$ - L | Laboratory | 4.90×10^2 | 4.68×10^2 | 0.020 | 7.06×10^2 | 6.12×10^2 | 0.062 | 6.26×10^2 | 6.86×10^2 | -0.040 |

H: high, M: moderate and L: low phage concentration.

bers of environmental phages and rapid color change was not always observed. For example, sample RW7 contained a higher concentration of coliphages than RW3, but an earlier color change was observed for the combination of RW3 and CB12. Similarly, sample SF5 had a higher concentration of F-specific coliphages than SF6 but the CB14 strain was more quickly infected when exposed to the latter. These differences were attributed to the variable phage composition of the environmental samples.

In the case of strain CB16, when using reference coliphages such as MS2, FI, GA and $Q\beta$, the results matched those of the other 2 strains (Fig. 3). In contrast, the results were less consistent for environmental phages, often taking more than 4 h to appear or remaining negative after 5 h of incubation in samples giving positive results for CB12 and CB14 (Fig. 3).

Strain CB14 provided the most consistent results in both environmental samples and laboratory stocks, although it detected lower amounts of coliphages than WG49 when using DAL methods. For concentrations higher than 10^3 PFU/ml, CB12 and CB14 gave positive results after a maximum of 2 h of incubation. With CB14, this was mainly the case in wastewater (WW) samples, whereas CB12, which is also capable of detecting somatic coliphages, obtained these results with seawater (SW), sludge (SL) and river water (RW) (Fig. 3). When phage densities were lower, CB12 and CB14 turned the medium blue at 3.5 h (Fig. 3).

To confirm that changes in color were exclusively caused by phage infection and bacterial cell lysis, each tube had a negative control containing only the strain and BTM. The controls remained yellow for the duration of the experiment and until monitoring

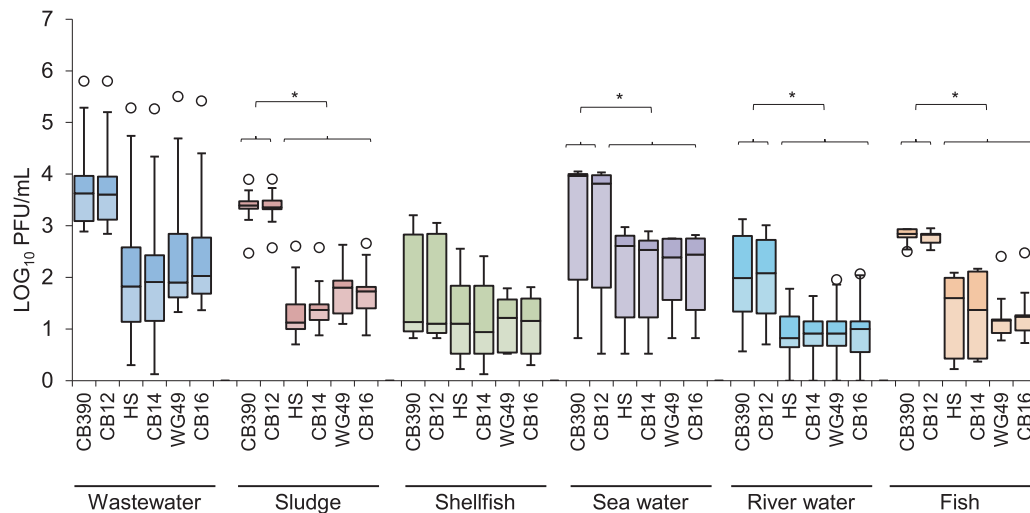


Fig. 2. Enumeration of bacteriophages from natural water samples (wastewater, river water, and sea water), sludge, shellfish and fish using the DAL method with strain CB390 and its *Bluephage* counterpart CB12, strain HS and its *Bluephage* counterpart CB14, and strain WG49 and its *Bluephage* counterpart CB16. Data are represented in boxplots (\log_{10} PFU/ml). The upper squares include samples with values within the 75th percentile, and the lower white boxes show values within the 25th percentile. Circles in the upper and lower part of each box plot indicate the maximal and minimal outliers. Asterisks indicate significant differences among Total coliphages-specific strains and F-specific coliphages-specific strains.

stopped (after 7 h). None of the positive samples showed any further changes beyond the 5-hour mark.

In summary, CB14 showed the best performance (with a similar behavior than CB12 that detect somatic plus F-specific coliphages), grew faster and is specific for F-specific phages. In contrast, CB16 performed inconsistently and considerably less efficiently than the other two strains in the analysis of environmental samples (Fig. 3).

3.4. Quantitative results for strains CB14 and CB16 using the *Bluephage* method based on the most probable number technique

Qualitative results based on presence/absence analysis can be easily transformed into quantitative data by applying the most probable number (MPN) method. Phage counts in wastewater environmental samples and reference phage samples of known concentration obtained by the DAL method were compared with those of *Bluephage* using the MPN technique (Fig. 4). For this experiment, 3 of each sample type, using 3 dilutions, were assayed in triplicate with both CB14 and CB16 up to five hours. Good performance was observed when using the *Bluephage* test medium downscaled for each component, maintaining the original proportions of the original BTM medium. The comparison shows that there were no significant differences ($p = 0.628$) between real counts (PFU/ml) and estimates (MPN) for CB14, while for CB16 the results varied among the different replicates (data not shown). Therefore, strain CB14 is more suitable for application in quantitative assays using the *Bluephage* method.

3.5. Influence of shaking during host growth on bacteriophage enumeration

Strains CB14 and CB16 and their respective parental counterparts HS and WG49 were analyzed in this experiment. Although growth was slightly higher when strains were incubated with shaking, higher phage counts were obtained in statically incubated samples (Fig. 5). While no significant differences were observed when considering the results of all the strains together (p (HS) = 0.611, p (CB14) = 0.419, p (WG49) = 0.974, p (CB16) = 0.975), separate subsets of these samples showed a significant improvement in phage recovery after static incubation, especially in the case of

environmental phages and MS2 detected with strain HS ($p = 0.016$, $p = 0.021$) and Q β with strain CB14 ($p = 0.003$). Additionally, for strains HS and CB14, there was a slight increase in counts in the absence of shaking, whether significant or not, whereas for CB16 and WG49 counts fluctuated (Fig. 5).

3.6. Influence of host strain incubation time on bacteriophage enumeration

The influence of incubation time during the host strain growth on F-specific bacteriophage enumeration was analyzed. The assays were performed without shaking as they provided more consistent results. When strains WG49 and CB16 were tested with WW, no changes were observed in PFU counts related to the incubation time (data not shown), so only strains CB14 and HS were used for the analysis, as they produced more consistent results with greater differences.

Two different incubation times were tested for the host strains: the usual time required to reach a mid-exponential growth phase (2 h) and the time required to reach a later-exponential growth phase (an additional 50 mins). No significant differences were observed for either strain when the results for all the samples were analyzed together (p (HS) = 0.113, p (CB14) = 0.091). However, significant differences in favor of longer incubation times were observed for some phage subsets, such as MS2, FI, GA, Q β and environmental phages for HS ($p = 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.002$, $p = 0.004$, $p = 0.005$) and MS2, FI, Q β and environmental phages for CB14 ($p = 0.001$, $p = 1.22E-04$, $p = 3.67E-04$, $p = 0.023$). Overall, even if the differences were not always significant, the longer incubation time slightly increased counts for all the samples and strains (Fig. 6).

4. Discussion

Somatic and F-specific coliphages have been proposed as surrogates for enteric viruses in safety guidelines around the globe. While somatic coliphages are often more abundant in samples, the dynamics of F-specific coliphages more closely resemble those of enteric viruses (Ballester et al., 2005; Love et al., 2014). Although somatic coliphages are typically found in higher densities in the environment (Jebri et al., 2015), F-specific coliphages consistently

| | CB12 | | | | | CB14 | | | | | CB16 | | | | |
|--------------------|-------------------------|---------------------|------|------|------|-------------------------|---------------------|------|------|------|-------------------------|---------------------|------|------|------|
| | DAL | Bluephage (+/hours) | | | | DAL | Bluephage (+/hours) | | | | DAL | Bluephage (+/hours) | | | |
| | PFU/mL | 2:00 | 3:00 | 4:00 | 5:00 | PFU/mL | 2:00 | 3:00 | 4:00 | 5:00 | PFU/mL | 2:00 | 3:00 | 4:00 | 5:00 |
| Reference | | | | | | | | | | | | | | | |
| φX174- H | 2.31 × 10 ⁸ | 3 | 3 | 3 | 3 | 0.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| φX174- M | 3.32 × 10 ⁴ | 0 | 3 | 3 | 3 | 0.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| φX174- L | 2.78 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 | 0.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS2 - H | 4.69 × 10 ⁹ | 3 | 3 | 3 | 3 | 5.46 × 10 ⁹ | 3 | 3 | 3 | 3 | 5.74 × 10 ⁹ | 3 | 3 | 3 | 3 |
| MS2 - M | 3.24 × 10 ⁴ | 0 | 0 | 3 | 3 | 5.67 × 10 ⁴ | 0 | 0 | 3 | 3 | 4.46 × 10 ⁴ | 0 | 3 | 3 | 3 |
| MS2 -L | 2.93 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 2 | 5.13 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 1 | 6.57 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 2 |
| FI - H | 3.60 × 10 ¹⁰ | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.43 × 10 ¹⁰ | 3 | 3 | 3 | 3 | 7.13 × 10 ¹⁰ | 3 | 3 | 3 | 3 |
| FI - M | 5.33 × 10 ⁴ | 2 | 3 | 3 | 3 | 5.50 × 10 ⁴ | 2 | 3 | 3 | 3 | 7.07 × 10 ⁴ | 2 | 3 | 3 | 3 |
| FI - L | 1.97 × 10 ¹ | 0 | 0 | 2 | 3 | 4.05 × 10 ¹ | 0 | 0 | 1 | 3 | 5.16 × 10 ¹ | 0 | 2 | 3 | 3 |
| GA - H | 1.16 × 10 ⁸ | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.98 × 10 ⁸ | 3 | 3 | 3 | 3 | 3.29 × 10 ⁸ | 3 | 3 | 3 | 3 |
| GA - M | 1.57 × 10 ⁴ | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.98 × 10 ⁴ | 0 | 2 | 3 | 3 | 2.19 × 10 ⁴ | 0 | 3 | 3 | 3 |
| GA - L | 1.36 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 3 | 2.28 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 2 | 2.24 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Qβ - H | 5.30 × 10 ⁹ | 3 | 3 | 3 | 3 | 5.85 × 10 ⁹ | 3 | 3 | 3 | 3 | 6.21 × 10 ⁹ | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Qβ - M | 5.27 × 10 ⁴ | 0 | 3 | 3 | 3 | 5.17 × 10 ⁴ | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.07 × 10 ⁵ | 0 | 3 | 3 | 3 |
| Qβ - L | 4.68 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 3 | 6.12 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 3 | 6.86 × 10 ² | 0 | 0 | 1 | 3 |
| Wastewater | | | | | | | | | | | | | | | |
| WW 1 | 1.23 × 10 ³ | 3 | 3 | 3 | 3 | 3.54 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 4.77 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| WW 2 | 6.96 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.33 × 10 ⁰ | 0 | 3 | 3 | 3 | 2.30 × 10 ¹ | 0 | 0 | 1 | 2 |
| WW 3 | 8.55 × 10 ² | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.43 × 10 ¹ | 0 | 1 | 3 | 3 | 4.73 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| WW 4 | 1.47 × 10 ⁴ | 3 | 3 | 3 | 3 | 1.17 × 10 ² | 3 | 3 | 3 | 3 | 6.40 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 |
| WW 5 | 6.35 × 10 ³ | 3 | 3 | 3 | 3 | 1.10 × 10 ² | 1 | 1 | 2 | 3 | 4.63 × 10 ² | 0 | 0 | 3 | 3 |
| WW 6 | 2.54 × 10 ³ | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.33 × 10 ¹ | 0 | 3 | 3 | 3 | 5.00 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| WW 7 | 6.31 × 10 ⁵ | 3 | 3 | 3 | 3 | 1.84 × 10 ⁵ | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.61 × 10 ⁵ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| WW 8 | 6.83 × 10 ³ | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.08 × 10 ³ | 1 | 1 | 2 | 3 | 3.89 × 10 ³ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| WW 9 | 9.76 × 10 ³ | 3 | 3 | 3 | 3 | 6.00 × 10 ¹ | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.53 × 10 ² | 0 | 0 | 3 | 3 |
| WW 10 | 1.60 × 10 ³ | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.43 × 10 ¹ | 2 | 3 | 3 | 3 | 7.33 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| Sludge | | | | | | | | | | | | | | | |
| SL 1 | 7.97 × 10 ³ | 0 | 3 | 3 | 3 | 3.77 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 4.57 × 10 ² | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SL 2 | 2.26 × 10 ³ | 0 | 3 | 3 | 3 | 2.33 × 10 ¹ | 0 | 3 | 3 | 3 | 5.33 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SL 3 | 3.06 × 10 ³ | 0 | 3 | 3 | 3 | 3.00 × 10 ¹ | 0 | 3 | 3 | 3 | 6.50 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SL 4 | 2.10 × 10 ³ | 0 | 3 | 3 | 3 | 7.50 × 10 ⁰ | 0 | 3 | 3 | 3 | 7.50 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SL 5 | 3.75 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.50 × 10 ¹ | 0 | 1 | 1 | 1 | 2.50 × 10 ¹ | 0 | 0 | 1 | 3 |
| Sea water | | | | | | | | | | | | | | | |
| SW 1 | 6.33 × 10 ¹ | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.67 × 10 ¹ | 0 | 2 | 3 | 3 | 2.33 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SW 2 | 9.48 × 10 ³ | 3 | 3 | 3 | 3 | 7.83 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 5.63 × 10 ² | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SW 3 | 1.08 × 10 ⁴ | 3 | 3 | 3 | 3 | 5.17 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 6.60 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SW 4 | 6.57 × 10 ³ | 2 | 3 | 3 | 3 | 3.40 × 10 ² | 0 | 2 | 2 | 2 | 2.77 × 10 ² | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SW 5 | 3.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 3.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 6.67 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| River water | | | | | | | | | | | | | | | |
| RW 1 | 7.00 × 10 ¹ | 0 | 2 | 3 | 3 | 1.33 × 10 ¹ | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.00 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| RW 2 | 5.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 2 | 1.67 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 1.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RW 3 | 8.37 × 10 ² | 3 | 3 | 3 | 3 | 4.33 × 10 ¹ | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.17 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RW 4 | 6.67 × 10 ⁰ | 0 | 2 | 3 | 3 | 1.00 × 10 ¹ | 0 | 2 | 3 | 3 | 3.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| RW 5 | 2.90 × 10 ¹ | 1 | 2 | 3 | 3 | 1.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 3.67 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| RW 6 | 2.07 × 10 ² | 0 | 1 | 3 | 3 | 1.67 × 10 ¹ | 0 | 1 | 1 | 1 | 1.33 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| RW 7 | 1.03 × 10 ³ | 0 | 2 | 3 | 3 | 6.67 × 10 ⁰ | 0 | 1 | 2 | 3 | 1.67 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| RW 8 | 4.57 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 6.67 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 1.00 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| Shellfish | | | | | | | | | | | | | | | |
| SF 1 | 1.27 × 10 ¹ | 0 | 3 | 3 | 3 | 8.67 × 10 ⁰ | 0 | 1 | 1 | 1 | 1.43 × 10 ¹ | 3 | 3 | 3 | 3 |
| SF 2 | 6.67 × 10 ⁰ | 0 | 3 | 3 | 3 | 3.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 3.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SF 3 | 1.00 × 10 ¹ | 1 | 2 | 3 | 3 | 3.33 × 10 ⁰ | 0 | 1 | 3 | 3 | 3.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SF 4 | 7.00 × 10 ⁰ | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.33 × 10 ⁰ | 0 | 1 | 2 | 2 | 2.00 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| SF 5 | 7.52 × 10 ² | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.56 × 10 ² | 0 | 2 | 3 | 3 | 3.93 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SF 6 | 1.14 × 10 ³ | 3 | 3 | 3 | 3 | 2.53 × 10 ¹ | 0 | 3 | 3 | 3 | 6.47 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SF 7 | 6.48 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.85 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 3.87 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fish | | | | | | | | | | | | | | | |
| FS 1 | 6.77 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 1.30 × 10 ² | 0 | 2 | 3 | 3 | 1.73 × 10 ¹ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| FS 2 | 4.70 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 3 | 2.33 × 10 ¹ | 0 | 1 | 1 | 1 | 1.83 × 10 ¹ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FS 3 | 8.92 × 10 ² | 1 | 3 | 3 | 3 | 1.46 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 2.98 × 10 ² | 0 | 0 | 3 | 3 |
| FS 4 | 6.95 × 10 ² | 0 | 3 | 3 | 3 | 2.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 9.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 3 | 3 |
| FS 5 | 3.35 × 10 ² | 0 | 0 | 0 | 2 | 2.67 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 1 | 5.33 × 10 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 |

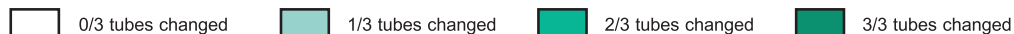


Fig. 3. Heatmap comparing the numbers of phages enumerated by the ISO method (PFU/ml) and the Bluephage methodology, in environmental samples and reference coliphages during 5 h of experiment. White cells show no positive tubes. Light, medium and dark coloration in cells indicate 1, 2 or 3 out of 3 positive tubes, respectively. Reference phage suspensions were diluted to high (H), moderate (M) and low (L) concentrations.

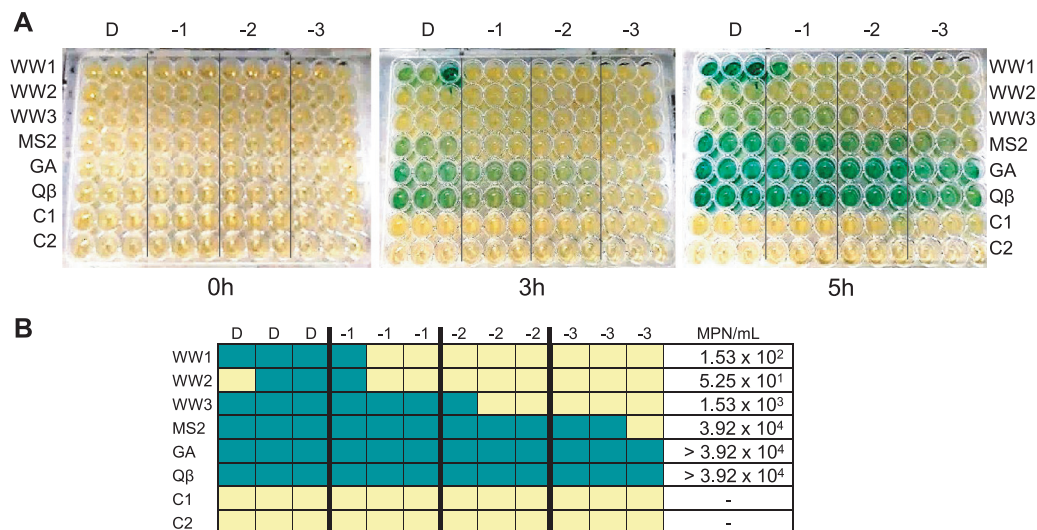


Fig. 4. A. *Bluephage* microplate results with strain CB14 in the presence of phages suspensions from environmental wastewater samples (WW) and reference phages (MS2, GA and Q β). Direct inoculum and dilution (from -1 to -3) of all suspensions were assayed at different times (0, 3 and 5 h). Blue indicates positive results while yellow negative results. Two controls were included, one containing CB14, BTM and sterilized wastewater (C1) and the other with BTM and sterilized wastewater but excluding strain CB14 (C2). B. Schematic representation of the 96-well microplate composition and the result after 5 h from the microplate in (A) and calculated results (MPN/ml) of these suspensions.

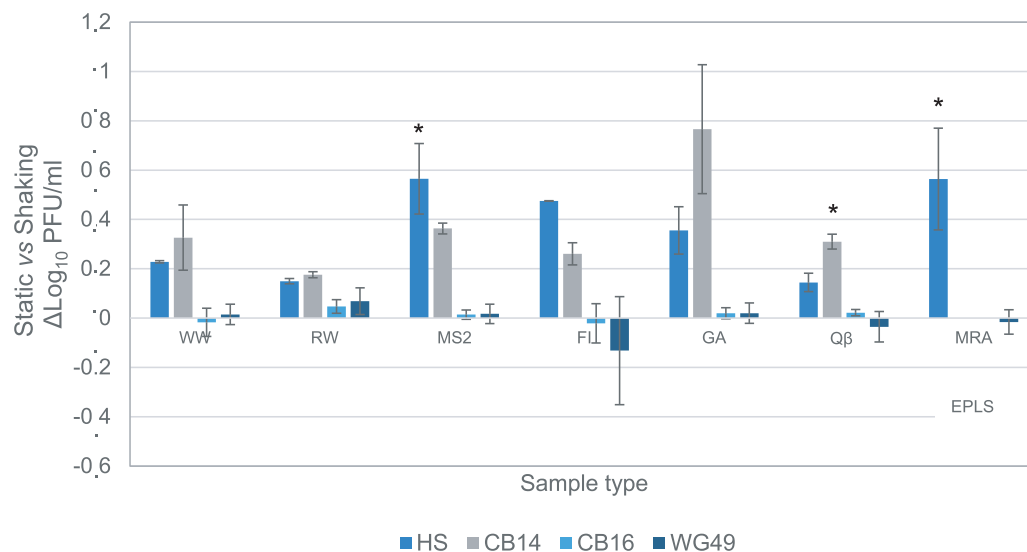


Fig. 5. Differences in the number of phages ($\Delta\log_{10}$ PFU/ml) detected when the host strains were incubated statically or by shaking (180 rpm). Positive bars indicate higher counts when incubated statically while negative bars show higher counts obtained when shaking. Host strains *E. coli* HS and *S. enterica* WG49 and their respective *Bluephage* counterparts CB14 and CB16 were used to enumerate phages from natural water samples (wastewater (WW), river water (RW)) and reference phages MS2, FL, GA, Q β by the DAL method. Asterisks indicate those strains and sample types where the increase in phage counts (PFU/ml) was statistically significant.

predominate in reclaimed water, clay sediments and groundwater (Lucena et al., 2006; Montemayor et al., 2008). They are also more commonly found in samples subjected to disinfection treatments such as UV irradiation (Jofre, 2007). The targeted analysis of F-specific coliphages would therefore be recommended in certain cases. This prompted us to develop a new rapid detection method aimed at F-specific coliphages and to study modifications to optimize the process.

As previously reported (Muniesa et al., 2018; Toribio-Avedillo et al., 2019), the *Bluephage* method can detect as low as 1 coliphage in less than a working day. The complete analysis takes up to 7 h: 2 to 3 h for the incubation of the host strain and then an average of 4 h for the incubation in BTM. The same timeframe applies for the detection of F-specific phages, although with some differences, depending on the strain. *E. coli* CB14 grew

much more quickly than CB12 or CB16 and also produced a faster color change. CB14 showed less sensitivity (measured by the number of phages detected by the DAL method) than CB16, a difference also observed between their respective counterparts HS and WG49 (Jofre, 2007; Schaper and Jofre, 2000). Although CB16 detects more PFU using the ISO DAL method (Anonymous, 1995), this *S. enterica* strain grew more slowly and performed poorly and inconsistently in the *Bluephage* method. The presence of plasmids from *E. coli* in CB16 and the overexpression of *uidA*, which is not found in *Salmonella*, can increase fitness costs, resulting in a delayed growth of the host strain. While this is not critical for the DAL method, it increases the time required for *Bluephage* detection. The quantitative and scaling analysis also indicated an efficient performance for CB14, but not for CB16. As a detection method needs to adapt to a range of volumes and parameters

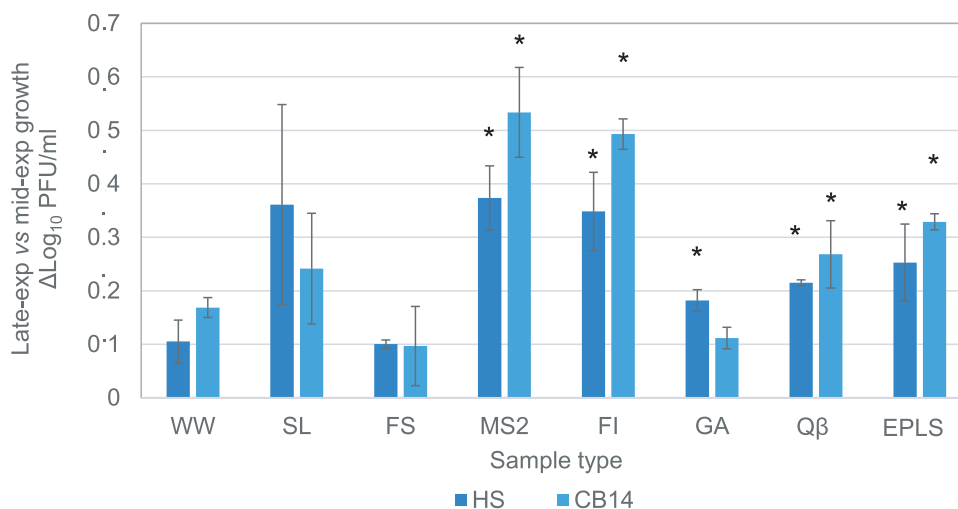


Fig. 6. Differences in the number of phages ($\Delta\log_{10}$ PFU/ml) detected when the host strains were incubated until the late-exponential growth ($OD_{600}= 0.8$) or mid-exponential growth phase ($OD_{600} = 0.3$). Host strain *E. coli* HS and its *Bluephage* counterparts CB14 and CB16 were used to enumerate phages from natural water samples (wastewater (WW), sludge (SL)), fish (FS), reference phages, MS2, FI, GA, Q β , and environmental phage laboratory stocks by the DAL method. Asterisks indicate those strains and sample type where the increase in phage counts (PFU/ml) when the host strains were incubated until the late-exponential growth was statistically significant.

in accordance with safety guidelines, CB14 is more suitable than CB16 as a host strain for *Bluephage* assays.

The absence of shaking and a longer incubation time were found to improve the sensitivity of strain HS in terms of PFU detection (Figs. 5 and 6). Static incubation might increase phage yields by preventing the shear of F-pili, which are required for F-specific phage infection (Wetzel, 1999, M.P. Garcillán-Barcia, personal communication). The use of a host strain grown to the late-exponential growth phase could promote detection due to improved phage attachment to the pili and DNA injection. Accordingly, better conjugation rates have been reported after using cultures at the late-exponential growth phase compared with early cultures (Lampkowska et al., 2008). Increasing the incubation time apparently had no influence on phage recovery by the *S. enterica* strains, which did not show a significant increase in PFU counts. In the case of WG49, this could be explained by the expression of an *E. coli* plasmid in the strain and the differences in growth rates of *Salmonella* compared with *E. coli*. Regarding its *Bluephage* counterpart CB16, the aforementioned lack of consistency in performance could have masked differences in phage recovery in the modified conditions. In any case, the lower counts traditionally observed for *E. coli* HS in comparison with *S. enterica* WG49 (Jofre, 2007) might be resolved by minor modifications in the incubation process, rendering both strains equally suitable for F-specific phage detection.

Based on the results of the *Bluephage* assays and the modifications of the incubation process, it was concluded that strain CB14 is a good candidate for rapid phage detection. Not only did it perform better in the *Bluephage* assays but its slightly lower detection rates (PFU/ml) compared to CB16 were overcome by static incubation at 37 °C for an additional 50 min before application for coliphage enumeration.

5. Conclusion

The use of strains CB14 and CB16 in the *Bluephage* method allowed the detection of F-specific coliphages in under 5 h, including the incubation of the host strain and phage detection, which makes it possible to complete the analysis within a working day. Strain CB14 performed very similarly to the *Bluephage* strain CB12, with improved sensitivity compared to other available methods, while

being specific only for phages that infect through the F-pili. The amount of coliphages detected by CB12 was significantly higher, as it can detect both somatic and F-specific coliphages, so this strain is more suitable if a single host is needed for both analyses. The *Bluephage* method can be adapted to microplates and allows quantitative evaluation using the MPN technique using 3 replicates of 3 of each sample type and incubating with strain CB14 in the original proportions of BTM medium for five hours. It can also be adapted to the presence/absence test for large sample volumes, making it suitable for the implementation of future EU directives on drinking water. Static incubation of the host strain for an additional 50 min improved phage detection by strain *E. coli* HS and its derivative *Bluephage* strain. These modifications could potentially help to further optimize the detection of F-specific phages in the environment. *Bluephage* is the fastest available microbiological method using cultivable microorganisms to determine fecal pollution reported to date and will provide results when rapid information about fecal pollution is required.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Authors thank M^a Pilar Garcillán-Barcia for useful comments about F-pili conjugation and protocols; Prof Fernando de la Cruz, University of Cantabria for providing plasmid pOX38Km and its complete sequence. Authors belong to the consolidated group of the Generalitat de Catalunya (2017 SGR 170) and the Institut de Recerca de l'Aigua/University of Barcelona. This work has been partially supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación AEI/FEDER (AGL201675536). Grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spanish Government supported Daniel Toribio-Avedillo (FPU-998758-2016). Pedro Blanco-Picazo (BES-2017-081296) and Julia Martín-Díaz with a Torres Quevedo contract (PTQ-17-09061). Authors declare no conflict of interest. *Bluephage* is a registered trademark by Bluephage, S.L.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.watres.2020.116215.

References

- Anonymous, 2000. ISO 10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages –part 2: Enumeration of somatic coliphages.
- Anonymous, 1995. ISO 10705-1. Water Quality Detection and Enumeration of Bacteriophages Part 1: Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages. Int. Stand. Organ. Geneva, Switz.
- Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Margolin, A.B., 2005. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *J. Water Health* 3, 59–68.
- Calci, K.R., Burkhardt, W., Watkins, W.D., Rippey, S.R., 1998. Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5027–5029. <https://doi.org/10.1128/aem.64.12.5027-5029.1998>.
- Chandler, M., Galas, D.J., 1983. Cointegrate formation mediated by Tn9: II. Activity of IS1 is modulated by external DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 61–91. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80227-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80227-7).
- Council of the European Union, 2020. Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption (recast) Political agreement Publications Office of the EU.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
- Debartolomeis, J., Cabelli, V.J., 1991. Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1301–1305.
- Evans, D.G., Evans, D.J., Tjoa, W., 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.* 18, 330–337.
- Food and Drug Administration and Interstate Shellfish Sanitation Commission, 2015. National Sanitation Program. Guide for the Control of Molluscan Shellfish. Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Grabow, W., 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27, 251–268. <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i2.4999>.
- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *J. Virol. Methods* 144, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jvromet.2007.03.017>.
- Guzmán, C., Mócé-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J., 2008. Evaluation of *Escherichia coli* host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 531–534. <https://doi.org/10.1128/AEM.01710-07>.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M., 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.* 56, 439–447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01372.x>.
- Havelaar, A.H., Pot-Hogeboom, W.M., 1988. F-Specific RNA-Bacteriophages as Model Viruses in Water Hygiene: ecological Aspects. *Water Sci. Technol.* 20, 399–407.
- Hirota, Y., 1960. The Effect of Acridine Dyes on Mating Type Factors in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46, 57–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.46.1.57>.
- IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991. Bacteriophages As Model Viruses in Water-Quality Control. *Water Res.* 25, 529–545. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-B](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-B).
- Jarvis, B., Wilrich, C., Wilrich, P.T., 2010. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1660–1667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x>.
- Jebri, S., Muniesa, M., Jofre, J., 2017. General and host-associated bacteriophage indicators of faecal pollution, in: Jiménez-Cisneros, J.B.R. and B. (Ed.), Global Water Pathogen Project. <http://www.waterpathogens.org> (A.Farnleitner, and A. Blanch (Eds) Part 2 Indicators and Microbial Source Tracking Markers) <http://www.waterpathogens.org/Book/Coliphage>. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.7>
- Jebri, S., Muniesa, M., Jofre, J., 2015. Part Two . Indicators and Microbial Source Tracking Markers General and Indicators of Faecal.
- Jofre, J., 2007. Indicators of Waterborne Enteric Viruses. In: Bosch, A. (Ed.), *Human Viruses in Water, Perspectives in Medical Virology*. Elsevier, pp. 227–249.
- Lampkowska, J., Feld, L., Monaghan, A., Toomey, N., Schjørring, S., Jacobsen, B., van der Voet, H., Andersen, S.R., Bolton, D., Aarts, H., Krogfelt, K.A., Wilcks, A., Baradowski, J., 2008. A standardized conjugation protocol to assess antibiotic resistance transfer between lactococcal species. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.017>.
- Liang, W.J., Wilson, K.J., Xie, H., Knol, J., Suzuki, S., Rutherford, N.G., Henderson, P.J.F., Jefferson, R.A., 2005. The gusBC genes of *Escherichia coli* encode a glucuronide transport system. *J. Bacteriol.* 187, 2377–2385. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2377-2385.2005>.
- Love, D.C., Rodriguez, R.A., Gibbons, C.D., Griffith, J.F., Yu, Q., Stewart, J.R., Sobsey, M.D., 2014. Human viruses and viral indicators in marine water at two recreational beaches in Southern California. U.S.A. *J. Water Health* 12, 136–150. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.078>.
- Lucena, F., Lasobras, J., McIntosh, D., Forcadell, M., 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, 2272–2277.
- Lucena, F., Ribas, F., Duran, A.E., Skrabber, S., Gantzer, C., Campos, C., Morón, A., Calderón, E., Jofre, J., 2006. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *J. Appl. Microbiol.* 101, 96–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02907.x>.
- Montemayor, M., Costan, A., Lucena, F., Jofre, J., Muñoz, J., Dalmáu, E., Mujeriego, R., Sala, L., 2008. The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. *Water Sci. Technol.* 57, 935–940. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.206>.
- Muniesa, M., Ballesté, E., Imamovic, L., Pascual-Benito, M., Toribio-Avedillo, D., Lucena, F., Blanch, A.R., Jofre, J., 2018. Bluephage: a rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water. *Water Res.* 128. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.030>.
- Muniesa, M., Jofre, J., 2007. The contribution of induction of temperate phages to the numbers of free somatic coliphages in waters is not significant. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 272–276. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00676.x>.
- Nappier, S.P., Hong, T., Ichida, A., Goldstone, A., Eftim, S.E., 2019. Occurrence of coliphage in raw wastewater and in ambient water: a meta-analysis. *Water Res.* 153, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.058>.
- Naughton, Coleen, and Mihelcic, J., 2017. Introduction to the Importance of Sanitation, in: Jiménez-Cisneros, J.B.R. and B. (Ed.), *Global Water Pathogen Project*. <http://www.waterpathogens.org> (J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros) (Eds) Part 1 The Health Hazards of Excreta: Theory and Control) <http://www.waterpathogens.org/Book/Introduction>. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.1>
- Rames, F., Macdonald, J., 2019. The QuantiPhage assay: a novel method for the rapid colorimetric detection of coliphages using cellulose pad materials. *Water Res.* 149, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.089>.
- Republique Française, 2014. Arrêté du 25 juin 2014 modifiant l'arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts.
- Rose, R.E., 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* 16, 355.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 999. Cold Spring Harb. Lab. Press, Cold Spring Harb. NY.
- Schaper, M., 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. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00171-3).
- 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.* 655, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.198>.
- U.S. EPA., 2015. Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality. EPA 820-R-15-098, Washington D.C.
- U.S. EPA., 2001a. Method 1601: detection of Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-Step Enrichment Procedure. EPA 821-R-01-030. Washington D.C.
- U.S. EPA., 2001b. Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. EPA 821-R-01-029, Washington D.C.
- U.S. EPA., 2001c. USEPA Manual of Methods for Virology. Chapter 16. EPA 600/4-84/013 (N16). Washington D.C.
- Western Australian Government, 2012. Western Australia Guidelines for Biosolids Management. Perth. Australia.
- Wetzel, R., 1999. Amyloids, Prions & other aggregates. In: Abelson, J.N., Simon, M.I. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego, p. 820.
- WHO, 2017. Potable reuse: Guidance for Producing Safe Drinking-Water. World Health Organization, Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Geneva, Switzerland.



5. DISCUSIÓN GENERAL

La relevancia e interés público en el control de la transmisión de patógenos víricos a través de la ruta fecal-oral impone la necesidad de determinar indicadores apropiados para la predicción de comportamiento y transmisión de virus en matrices ambientales (Bosch et al., 1991; Eren and McLellan, 2014). A pesar que esta necesidad se hizo relevante hace décadas, se ha visto reforzada en la actualidad a causa de la situación generada por la COVID-19 (Amoah et al., 2020; Yeo et al., 2020). La causa principal de la necesidad de implementar indicadores víricos es que el uso de bacterias como indicadoras de contaminación fecal no proporciona toda la información necesaria para controlar de manera apropiada grupos de microorganismos patógenos como los virus, cuyo destino, características de transporte dentro de una planta de tratamiento y persistencia en las matrices ambientales son muy diferentes a las de las bacterias (Ashbolt et al., 2001; Boehm et al., 2009; Gomila et al., 2008). De hecho, se han observado múltiples casos de brotes de infecciones víricas transmitidas a través del agua o alimentos que no han sido controlados mediante los indicadores bacterianos de contaminación establecidos actualmente en las legislaciones (Bányai et al., 2018; Malek et al., 2009; Westrell et al., 2010). La inclusión dentro de las normativas de los bacteriófagos que infectan a bacterias entéricas como parámetros de control para solucionar este problema ha sido propuesta desde hace varias décadas en numerosas ocasiones (Gerba et al., 1979; Grabow, 2001; IAWPRC Study group on health related water microbiology, 1991).

Los bacteriófagos dependen de sus huéspedes para replicarse y, por lo tanto, los fagos que infectan a bacterias presentes en el tracto digestivo son excretados en las heces junto con sus bacterias huéspedes (Calci et al., 1998; Havelaar et al., 1986). Como consecuencia, están presentes en los ambientes donde hay presencia de materia fecal, como las aguas residuales (Ahmed et al., 2020; Payment and Locas, 2011). Las características, morfologías, estructuras y modos de replicación de los fagos entéricos son similares a las de los virus patógenos, lo cual sugiere que mimetizan mejor su persistencia y transporte que otros grupos de organismos, como las bacterias indicadoras (Dias et al., 2018; Ji et al., 2021; McMinn et al., 2017; U.S. EPA, 2015; Worley-Morse et al., 2019). Los bacteriófagos que mayor atención han recibido como indicadores de contaminación fecal de virus entéricos son los colifagos, tanto somáticos como F-específicos, debido a su facilidad de detección (Cole et al., 2003; Durán et al., 2003; Skraber et al., 2004). Múltiples normativas de calidad de aguas y alimentos ya han añadido a los bacteriófagos como parámetros indicadores (World Health Organisation 2017; Western Australian Government 2012; U.S. EPA 2006; Republique Française 2014; Republica de Colombia 2014; The European Parliament and the Council of the European Union 2020b,

2020a) como se refleja en la Tabla 7 de la introducción de esta memoria de tesis. Se espera su incorporación a la legislación de nuevos países debido a la aceptación de las nuevas directivas de aguas de consumo y aguas regeneradas de la Unión Europea (The European Parliament and the Council of the European Union 2020b, 2020a). Consecuentemente, como la detección de colifagos va a ser requerida legalmente, es importante facilitar su implementación global en los análisis rutinarios de laboratorios de calidad.

Los métodos estandarizados de la ISO y U.S. EPA para la detección y recuento de colifagos son procedimientos sencillos con múltiples pasos durante los cuales tiene lugar la replicación de los colifagos dentro de las células huéspedes en fase exponencial de crecimiento (Anonymous, 1995, 2000; U.S. EPA, 2001b, 2001a). Aunque la implementación de los métodos estandarizados en laboratorios de análisis rutinario que carecen de experiencia es posible (Mooijman et al., 2005), existen ciertas complicaciones debido a su relativa complejidad, a los materiales que se han de preparar y, sobre todo, a los tiempos operacionales y de incubación necesarios para el análisis. Aunque los resultados de recuento de calvas en placas de agar se pueden comenzar a observar de manera relativamente rápida (6 horas de incubación), en realidad se necesitan al menos otras 2 horas previas de crecimiento de la cepa huésped y el tiempo recomendado de análisis para asegurar el funcionamiento correcto del método y el recuento total de calvas de lisis es de 18 horas. Por lo tanto, los métodos estandarizados no proporcionan resultados dentro de la misma jornada laboral. Esto puede suponer un problema cuando se requieren resultados en el mismo día de trabajo y el agua, potencialmente contaminada con patógenos virales, podría haber sido empleada ya para consumo, usos recreacionales o irrigación incluso días antes de haber obtenido los resultados mediante métodos estandarizados tradicionales (Boehm et al. 2009; Girones et al. 2010). La necesidad de solucionar este problema, en conjunto con la creciente demanda de análisis de colifagos causada por su incorporación en normativas de aguas y alimentos (Tabla 7), está potenciando el desarrollo de nuevos métodos alternativos, rápidos y sencillos de utilizar, que faciliten la implementación de la detección de bacteriófagos en laboratorios de análisis rutinarios (Blanch et al., 2020).

Como posible solución a estas problemáticas, se desarrolló el método presentado en la tesis, ***Bluephage***. Inicialmente, el método fue diseñado para la detección de colifagos somáticos (Artículo 1) por dos motivos: La predominancia de los colifagos somáticos en la mayor parte de las muestras de aguas analizadas (Jofre et al. 2016) y la superior velocidad de crecimiento

de la cepa huésped *E. coli* WG5 utilizada en los métodos ISO para la detección de somáticos frente a las cepas huéspedes que detectan colifagos F-específicos (Guzmán et al. 2008).

El método se basa en la detección colorimétrica de un compuesto cromógeno hidrolizado por las β -glucuronidasas liberadas al medio extracelular. Esta enzima es una proteína expresada a nivel intracelular y no está presente en el medio extracelular hasta que se produce la lisis bacteriana (Liang et al. 2005). En condiciones normales, el sustrato entra dentro de la célula mediante proteínas expresadas por los genes *uidB* y *uidC*, y una vez en el citoplasma puede ser hidrolizado por la enzima. Gracias a las modificaciones genéticas realizadas sobre los genes *uidB* y *uidC*, que codifican un transportador de glucurónidos (*uidB*) y una proteína de la membrana externa que potencia la captación de glucurónidos (*uidC*), se impide la introducción del sustrato al citoplasma celular en las células huéspedes. Por lo tanto, en ausencia de lisis celular, la reacción de la β -glucuronidasa no puede tener lugar porque el contacto entre las enzimas y sus sustratos es imposible. En presencia de bacteriófagos en cambio, las células bacterianas son lisadas liberando grandes cantidades de enzima al medio extracelular, incrementadas gracias a la sobreexpresión de gen *uidA* que la codifica. En el medio extracelular, la enzima puede interactuar con el sustrato unido a un compuesto cromógeno. Tras la degradación del sustrato por la enzima, se libera el cromógeno, lo que inducirá un cambio de color en el medio, visible a simple vista si suficientes células son lisadas.

De acuerdo con lo observado en los Artículos 1, 2, 4 y 5, *Bluephage* presenta la misma sensibilidad que los métodos estandarizados. Las nuevas cepas diseñadas no pierden capacidad de detección de colifagos tras las modificaciones genéticas realizadas en comparación con las cepas originales empleadas para la detección en los métodos estandarizados. El método es específico para la detección de colifagos, de diferente tipo en función de la cepa empleada: colifagos somáticos en el caso de la cepa CB10, totales con la cepa CB12 y F-específicos empleando la cepa CB14. El método puede ser utilizado para el análisis de diversas matrices ambientales (aguas de diversos orígenes, biosólidos o alimentos como el marisco), es adaptable a diferentes volúmenes de muestra y puede proporcionar resultados cuantitativos mediante la técnica del NMP del mismo modo que algunos de los kits utilizados actualmente para la detección de indicadores bacterianos como el test Colilert de IDEXX Laboratories, Inc. (Edberg et al. 1989). Además, el método es tan preciso como las técnicas descritas en los métodos estandarizados de la ISO para la detección de colifagos en muestras de 100 ml. Su límite de detección no difiere de los métodos ISO (1 UFP/100 ml) por lo que es aplicable en el análisis de muestras de 100 ml. Este hecho es especialmente importante porque las nuevas normativas

que incluyen colifagos como parámetros de control microbiológicos, como las nuevas directivas de la Unión Europea, piden reducciones altas de las concentraciones de virus o bajas concentraciones/ausencia de los mismos en volúmenes de muestra de 100 ml (World Health Organisation 2017; Gerba and Betancourt 2017; U.S. EPA 2009; North Carolina Administration 2011; NHMRC; NRMCC 2011; The European Parliament and the Council of the European Union 2020a).

La fiabilidad del método queda establecida por los bajos porcentajes de falsos positivos observados durante el tiempo de ensayo, que son inferiores al 1,25%. Esto es, sobre todo, gracias a las modificaciones genéticas realizadas sobre las cepas, que impiden que haya cambio de color en ausencia de lisis. Aun así, se observa cambio de color en los controles negativos (sin fagos) tras tiempos de incubación superiores 8 horas. Este cambio de color se atribuye a la lisis espontánea de las células tras periodos de incubación largos. Por lo tanto, se ha establecido que el tiempo de análisis no debe superar el intervalo en que el control negativo cambia de color, y se ha confirmado que este intervalo es suficiente para garantizar que la detección de fagos en la muestra sea correcta. No obstante, no se puede excluir que la presencia en la muestra de otros agentes bacteriolíticos no fágicos (Danner et al., 2019; Jonkers et al., 2020; Togo et al., 2006), altas concentraciones de β -glucuronidasa libre en la muestra o cepas bacterianas capaces de expresar la enzima (Davies et al., 1994; Stadler et al., 2016; Tryland and Fiksdal, 1998), pudieran conllevar un aumento de los falsos positivos detectados. Para paliar este problema, se recomienda la filtración previa de la muestra a través de membranas con baja afinidad proteica con poros de 0,22 μm , tal y como se describe en los métodos ISO, para purificar parcialmente los fagos (Anonymous, 1995, 2000).

El tiempo de detección de colifagos mediante el método *Bluephage* es inferior a una jornada laboral de 8 horas y requiere un equipo de laboratorio mínimo, básicamente una incubadora a 37°C. Se requieren entre 1,5-2 h para el crecimiento previo de la cepa huésped hasta alcanzar la fase exponencial del cultivo que se ha de inocular en los tubos y los métodos permiten la detección de un fago por tubo en 3,5- 4 h. Por tanto, la duración máxima de la prueba es de 5,5 h en el caso de los colifagos somáticos y totales o de 6 h en el caso de los colifagos F-específicos, lo cual se encuentra dentro del límite de una jornada laboral. La tendencia general observada es que las concentraciones superiores de fagos causan un cambio de color más rápidamente, aunque existen excepciones para todos los tipos de colifagos. Esto se atribuye a las diferencias en el tipo de colifago predominante en cada muestra analizada, especialmente en el caso de los colifagos somáticos, que es un grupo compuesto por diferentes tipos de fagos

y cuya distribución puede variar entre muestras (Burbano-Rosero et al. 2011; Reyes and Jiang 2010). La pertenencia a diferentes familias con diferentes tamaños de explosión y diferentes tiempos necesarios para su replicación podría causar que las mismas concentraciones de fagos, pero distribuidos en diferentes familias, generasen respuestas ligeramente diferentes respecto a los tiempos de detección (Dion et al., 2020; Muniesa et al., 1999). También se observa variabilidad de resultados a concentraciones bajas de colifagos. Esto se atribuye a que, a niveles límite de fagos, la posibilidad de inocular un único fago en un tubo es estocástica y puede variar entre los diferentes tubos como consecuencia de la distribución de los virus en la muestra (Maul 1999).

A pesar de estas observaciones, el uso de métodos que proporcionan resultados en el mismo día del muestreo es muy útil en muchos casos. Por ejemplo, en la evaluación de la calidad del agua de las playas abiertas al público, la duración de los métodos de cultivo bacteriano hace que exista al menos 24 horas de retraso entre aperturas y cierres de playas como consecuencia de los parámetros microbiológicos analizados. Esto implica que los usuarios de las playas podrían verse expuestos innecesariamente a aguas contaminadas fecalmente o que las playas pudieran verse cerradas cuando la calidad es buena (Griffith et al., 2009). Por lo tanto, utilizar métodos que permitieran obtener resultados en el mismo día reduciría los riesgos de potencial exposición y contribuiría además favoreciendo a la generación de más beneficios económicos, al estar solamente cerradas cuando la calidad del agua es insuficiente.

La necesidad de métodos rápidos, fáciles para el usuario y de fácil implementación ha hecho que en los últimos años, además del método *Bluephage*, se hayan desarrollado otras opciones alternativas de detección de colifagos que usan diferentes aproximaciones, como los sensores microelectrónicos, las técnicas moleculares, la adaptación y optimización de los medios y procedimientos existentes o la detección de diferentes enzimas liberadas al medio extracelular (Blanch et al., 2020). Algunas de las opciones más prometedoras dentro de estas aproximaciones para la detección rápida de colifagos, comparando las ventajas y desventajas ofrecidas en relación con el método *Bluephage*, son:

- Los **sensores microelectrónicos**, que permiten la detección rápida de partículas víricas o de la lisis del huésped en tiempos incluso inferiores a 1 hora. La mayoría de estos métodos se basan en el uso de inmunosensores, utilizando anticuerpos específicos para la retención de virus concretos (García-Aljaro et al., 2010; Janczuk-Richter et al., 2017; Łoś et al., 2005; Matatagui et al., 2014; Zhu et al., 2008). Esto favorece mucho la especificidad de detección, pero en el

análisis de muestras reales está limitada debido a la gran diversidad de colifagos presentes (Ackermann and Nguyen 1983; Burbano-Rosero et al. 2011; Reyes and Jiang 2010). La detección conseguida es mucho más rápida que otros métodos (en apenas unos minutos pueden llegar a ofrecer resultados), pero los límites de detección que presentan son bastante superiores. Generalmente suelen encontrarse por encima de 10^3 UFP/ml en los métodos basados en la detección mediante anticuerpos o 10^2 UFP/ml empleando otras técnicas, como la citometría de flujo (Michelsen et al., 2007), las técnicas basadas en la detección de uniones de partículas a una superficie mediante cambios en la conductividad iónica y la impedancia (Chaturvedi et al., 2016; García-Aljaro et al., 2009) o la resonancia de superficie por plasmones (García-Aljaro et al., 2008). Esta última técnica es la única dentro de las aproximaciones que emplean sensores microelectrónicos que fue ensayada con colifagos somáticos extraídos de muestras de agua residual. Esto es posible gracias a que emplean como sensor células de *E. coli* WG5 inmovilizadas sobre una superficie. Por ello, esta técnica es potencialmente aplicable para el análisis de muestras reales con mayor facilidad. Sin embargo, tras la interacción con los bacteriófagos se observó que se producían cambios en la superficie de bacterias inmovilizadas, lo cual limita su aplicación en gran medida pese a ofrecer otras ventajas como la monitorización a tiempo real.

Los sensores microelectrónicos proporcionan respuestas en tiempos muy cortos, pero carecen generalmente de otras múltiples ventajas que proporciona el método *Bluephage* como su sensibilidad, precisión o adaptabilidad. La implementación de los sensores microelectrónicos se ve limitada por sus desventajas, entre otras la inferior precisión y sensibilidad en relación con los métodos estandarizados, el requerimiento de equipos altamente sofisticados, la incapacidad de diferenciar el estado infectivo de los bacteriófagos, la dificultad de realizar y la complejidad de analizar e interpretar. En conclusión, pese a su gran velocidad, no es posible implementarlos en las condiciones actuales en laboratorios de análisis rutinario.

- Las técnicas basadas en **métodos moleculares** generalmente presentan dos principales ventajas frente a las técnicas de cultivo: una mayor velocidad y una mejor sensibilidad. No obstante, aunque detectan con rapidez la presencia de partículas virales en muestras, presentan un problema importante: no permiten la diferenciación de manera directa entre partículas infectivas y no infectivas sin la adición de pasos adicionales en el método incluyendo enzimas o agentes intercalantes (Parshionikar et al., 2010; Yang and Griffiths, 2014). Incluso en estos casos, no se detectan concretamente partículas infectivas, sino partículas víricas intactas, que no proporcionan la misma información porque podrían no ser infectivas pese a su integridad.

Dentro de los métodos moleculares diferenciamos entre aquellos basados en el reconocimiento serológico o en las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

- Dentro de las **técnicas serológicas**, destaca el ensayo de aglutinación de partículas poliméricas cubiertas de anticuerpos para la detección de colifagos F-específicos concretos (Love and Sobsey, 2007). Este método permite la detección de estos fagos F-específicos en tiempos de hasta 1 minuto, pero sus límites de detección varían en función del tipo de fago y el serogrupo analizado y presentan un límite de detección 5×10^3 UFP/ml. Estos límites son mejorables hasta 1 UFP/ml, pero requiere la adición de un enriquecimiento previo que requiere unas 3 h de incubación. Pese a su bajo coste y facilidad de aplicación, este método es complicado de realizar, requiere múltiples pasos operativos y no es capaz de detectar todos los bacteriófagos F-específicos presentes en una muestra, solo determinados bacteriofagos (Rodríguez et al. 2012). Además, la escasa disponibilidad de antisueros dificulta aún más su implementación en análisis rutinarios (Jebri et al., 2017).
- Los métodos basados en las **técnicas de amplificación de ácidos nucleicos** emplean fundamentalmente métodos de PCR cuantitativa (qPCR) y qPCR con retrotranscripción (RT-qPCR) para la detección rápida (entre 2 y 5 horas en función de la realización o no de un paso de enriquecimiento), sensible (con límites de detección desde 10^2 UFP/ml hasta 1 UFP/ml con enriquecimientos de la muestra), directa y cuantitativa de las copias genómicas (CG) presentes en una muestra. Sin embargo, su aplicación para la detección de colifagos como indicadores de contaminación fecal se ve dificultada debido a la incapacidad de los métodos moleculares para identificar partículas infectivas y la falta de equivalencia entre las CG detectadas directamente por estos métodos y el número de virus infecciosos presentes en la muestra. Las cifras de GC exceden generalmente los números obtenidos mediante métodos de cultivo y esta diferencia observada no es constante entre muestras, por lo que no es posible realizar extrapolaciones precisas del número real de virus infecciosos directamente a partir de las CG detectadas (Hartard et al., 2015). Además, estos métodos presentan dificultades en la detección de grupos víricos heterogéneos (colifagos somáticos especialmente). La alta diversidad de familias en las que se subdividen estos grupos (Dion et al., 2020; Muniesa et al., 1999) y la diversidad intrafamiliar (Ackermann 2007) dificultan el desarrollo de procedimientos moleculares generales para su detección directa.

La detección mediante técnicas moleculares en grupos víricos más homogéneos está más extendida especialmente en el caso de los colifagos F-específicos. Esto es debido a que la distribución de los diferentes genogrupos o serogrupos de colifagos F-ARN específicos difiere en función de la fuente de la contaminación fecal: Los subgrupos II y III típicamente corresponden a orígenes humanos y los subgrupos I y IV a animales (Jofre et al., 2011). Se han elaborado diferentes técnicas de RT-qPCR para la detección tanto de determinados genogrupos o serogrupos (Ogorzaly and Gantzer 2006; Hsu et al. 1995) como para el análisis conjunto de todos mediante técnicas multiplex (Kirs and Smith, 2007; Wolf et al., 2010). Se están desarrollando también otras técnicas moleculares para la detección de colifagos como la amplificación gLAMP (Huang et al. 2018) o la captación de virus presentes en el aire para detección posterior mediante qPCR (Matsubara and Katayama 2019). No obstante, aunque estas aproximaciones proporcionan más información y con mayor rapidez de análisis, no solucionan otros problemas de las técnicas moleculares como la discrepancia entre CG detectadas y la diferenciación de la infectividad de los virus.

El ámbito de aplicación de los métodos moleculares, debido a las limitaciones indicadas, es diferente al de *Bluephage*. El método *Bluephage* se usa para la detección de bacteriófagos como indicadores de contaminación fecal, mientras que los métodos moleculares se aplican mejor en otras situaciones como el Microbial Source Tracking (MST) y para la detección específica de determinados virus. Por ello, la detección de fagos como indicadores de contaminación fecal por métodos moleculares en el análisis rutinario no se contempla por el momento.

- Otros métodos rápidos fácilmente aplicables basados en la detección de organismos cultivables se basan en la **mejora de los métodos tradicionales**, tanto a nivel de los componentes como del procedimiento operativo. Dentro de esta aproximación destacan los métodos Easyphage y Quantiphage que incorporan soportes no basados en agar.

- En el caso de **Easyphage** (Fung et al., 2007), se usa pectina para formar un medio sólido en lugar del agar. El método está descrito solamente para la detección de bacteriófagos F-específicos, pero parece fácilmente adaptable para la detección de colifagos somáticos. El kit proporciona una botella de 10 ml con medio selectivo para crecer *E. coli* HS/Famp incluyendo un inductor de la β -galactosidasa, el sustrato cromógeno X-Gal y pectina como agente que permite la solidificación del medio sin requerimiento de calor en 45 min. Además, incluye placas de Petri previamente tratadas con cloruro de calcio que permiten la polimerización y solidificación de la pectina y un vial con un

agente de tinción para el césped bacteriano que facilita la visualización de las calvas. El método analiza 10 ml de muestra por cada placa ensayada por el método SAL (Single Agar Layer) (U.S. EPA 2001b), por lo que sus límites de detección son equivalentes. Mencionar que la enumeración de colifagos F-específicos mediante SAL es equivalente a los ensayos DAL (Double Agar Layer) (Luther and Fujioka 2004) y requiere de 12-16 horas de incubación. La mayor ventaja que proporciona Easyphage es la formación rápida del gel sin necesidad de utilizar calor y la sensibilidad y límites de detección equivalentes a los métodos estandarizados. Sin embargo, debido al tiempo de incubación necesario la velocidad con la que proporciona resultados es superior a una jornada laboral. Consecuentemente, la utilidad de su aplicación en laboratorios de análisis es limitada, ya que no aporta mejoras respecto a la velocidad de la metodología tradicional, solo contribuye a simplificar el proceso.

- El método de **Quantiphage** (Rames and Macdonald 2019) emplea un soporte de material celulósico en lugar de agar para la detección colorimétrica de las calvas generadas por la infección de los colifagos. El método presenta dos versiones: la versión original que requiere una incubación previa durante la noche anterior al ensayo y una versión rápida que emplea células huéspedes conservadas a 4°C inmovilizadas en gelatina de manera termorreversible. Esta versión rápida es la que utilizaremos para la comparación, ya que su tiempo de detección es inferior a una jornada laboral. Brevemente, para el ensayo se colocan círculos de una fibra de celulosa de 50 mm de diámetro sobre placas Petri de 55-60 mm de diámetro. Sobre ellos, se añade una mezcla de células bacterianas en fase exponencial, suspensión de bacteriófagos y medio de ensayo hasta tener un volumen final óptimo para la distribución sobre la placa. Antes del ensayo, las células inmovilizadas en gelatina deben ser activadas durante 40-60 minutos a 37-40 °C. Una vez dispensada la mezcla sobre las placas, éstas se incuban a 40 °C. En función del huésped y de la muestra analizada, tras 1,5-3 horas de incubación se pueden observar calvas sobre el material celulósico. El método es adaptable para la detección de diferentes tipos de colifagos en función de la cepa huésped empleada. También es adaptable a muestras de mayor volumen (10 ml), aumentando la superficie de la membrana y ajustando las proporciones de bacterias, fagos y medio que deben ser añadidos sobre la placa, por lo que su límite de detección es de 1 UFP/10 ml. Es una técnica fácil de realizar, rápida y no requiere de calor para fundir el agar como los métodos estandarizados. La versión del método Quantiphage que emplea células

inmovilizadas en gelatina tiene un tiempo total de análisis de 2,5-4 horas, dependiendo del tipo de bacteriófagos de la muestra, lo cual entra dentro de una jornada laboral. En principio, de acuerdo con los datos publicados (Rames and Macdonald 2019), el límite de detección sería inferior al de *Bluephage* ya que solo fue aplicado en ensayos de 10 ml, pero en su web comercial indican un límite de detección de 1 UFP/100 ml de acuerdo con datos no publicados, por lo que a priori no observaríamos diferencia entre los métodos en este apartado. Al igual que *Bluephage*, es aplicable en localizaciones remotas o con bajos recursos debido a su bajo coste y la ausencia de requerimiento de equipos complejos para el análisis. Una ventaja que presenta es la observación cuantitativa directa de las calvas de colifagos, que en el caso de *Bluephage* se realiza mediante técnicas de NMP. Sin embargo, se necesita profundizar en la mejora y viabilidad de las células inmovilizadas en gelatina. De acuerdo con los datos observados en el estudio (Rames and Macdonald 2019), la viabilidad de las células inmovilizadas en gelatina disminuye a partir de los 14 días en el caso de las cepas de detección de colifagos F-específicos. Esto puede limitar la incorporación en kits de detección rápida ya que en función de las circunstancias geográficas y la demanda podrían requerirse tiempos superiores de almacenaje. Otro posible defecto para tener en cuenta es que en la publicación el método está probado principalmente con suspensiones de fagos de referencia, analizando pocas muestras ambientales. Por ello, los resultados que se podrían obtener en el futuro pueden diferir en gran medida al analizar muestras con composiciones diferentes (Burbano-Rosero et al. 2011; Grose and Casjens 2014; Muniesa et al., 1999). El método es muy prometedor, pero requiere análisis posteriores que confirmen los datos y solventen los problemas para su futura implementación en laboratorios de análisis.

- Otra de las aproximaciones seguidas para la elaboración de métodos de detección rápida es la **detección de la lisis celular en cultivos líquidos del huésped**. Dentro de este grupo diferenciamos dos principales alternativas: la monitorización de los cambios en la densidad óptica y la detección de actividad de enzimas liberadas durante el proceso infectivo. *Bluephage* se encuentra dentro de esta categoría.

- Respecto a los **cambios en la densidad óptica**, destaca el estudio de Rajnovic et al., 2019 en el que se describen de manera detallada las cinéticas de descenso de la DO_{650nm} de un cultivo de *E. coli* siendo infectado por el bacteriófago modelo T4, en función de la abundancia de fago y la concentración de los organismos huéspedes. Los datos

obtenidos proporcionan una información útil respecto a los rangos de sensibilidad, la duración de los ensayos, los porcentajes de inhibición y el tipo de comportamiento de lisis para cada concentración de fago. El método descrito puede detectar cantidades de hasta 10^2 UFP/ml en periodos de incubación de fagos de hasta 3,5 horas. Sin embargo, actualmente estos resultados solo son aplicables a una suspensión pura del bacteriófago T4 y su aplicación debe evaluarse en muestras ambientales que contengan mezclas de bacteriófagos dada su enorme diversidad (Grose and Casjens 2014; Dion et al., 2020). Pese al requerimiento de espectrofotómetro, los autores indican que las simplicidades de la tecnología y los pasos analíticos implicados hacen que el sistema sea apropiado para la miniaturización y automatización. En comparación con el método *Bluephage*, este método carece de la sensibilidad adecuada y necesita ser evaluado con muestras de diferentes orígenes ambientales para poder demostrar su aplicabilidad en laboratorios de análisis.

- Finalmente, los métodos basados en la **detección de actividad enzimática**, como *Bluephage*, generalmente presentan los mejores resultados. Además de la enzima β -glucuronidasa empleada en el método *Bluephage*, otras enzimas estudiadas son la adenilato quinasa y la β -galactosidasa.

La enzima **adenilato quinasa** se usa en el método descrito por Guzmán-Luna et al., 2009. Este protocolo implica 2 reacciones: Primero, la adenilato quinasa es liberada durante la lisis mediada por bacteriófagos y convierte ADP en ATP. Después, el ATP producido se mide mediante la detección de la bioluminiscencia generada por la activación de la enzima luciferasa. Tras 2-3 horas de incubación, seguidas de una centrifugación y la adición de los reactivos apropiados al sobrenadante, todos los cultivos infectados por bacteriófagos muestran un incremento significativo en su señal bioluminiscente (Guzmán Luna et al. 2009). Esta aproximación ha sido ensayada tanto con colifagos de referencia, como con colifagos somáticos en muestras naturales. Dentro de su rango operativo el método no tiene problemas para la distinción entre positivos y negativos y ofrece una buena velocidad de detección, pero su sensibilidad es inferior a la establecida por otros métodos rápidos de detección, como *Bluephage*, con un límite de detección de 10 UFP/10 ml. Requiere además un paso adicional de centrifugación y el uso de un luminómetro para la detección de la bioluminiscencia, complicando su implementación en laboratorios de análisis rutinario.

La liberación de la **β -galactosidasa** al medio extracelular ha sido estudiada como parámetro en técnicas rápidas desde el método descrito por Ijzerman et al., 1993. Este es un método colorimétrico cualitativo que permite la detección de colifagos basándose en la inducción de esta enzima con el compuesto isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido que inactiva el represor *lac* de *E. coli*. La liberación de la enzima en el medio tras la lisis celular permite la hidrólisis de un compuesto cromógeno (rojo de clorofenol β -D-galactopiranosido), que inicialmente es amarillo y se convierte en rojo en las muestras positivas tras la hidrólisis enzimática, manteniendo el color amarillo en las muestras negativas. El método es barato, sensible y fácil de realizar, pero cuando la infección es producida por un bajo número de bacteriófagos es difícil de interpretar ya que se observan numerosos falsos positivos como consecuencia de una larga incubación de las células huéspedes, entrada del sustrato en las células y cambio de color del medio. En este caso se requieren confirmaciones para asegurar la certeza de lo observado.

La aproximación más prometedora que emplea la β -galactosidasa es el método **Fastphage** (Salter et al. 2010). Esta técnica permite la detección cualitativa de colifagos somáticos o F-específicos en un medio de enriquecimiento con isopropil-D-1-tiogalactopiranosido para inducir la transcripción del operón *lac* de las cepas de *E. coli* huéspedes. Cuando se produce la infección, como la producción de β -galactosidasa ha sido incrementada en gran medida por la inducción del operón *lac*, la enzima se libera con rapidez durante el proceso de lisis causada por los colifagos. La enzima extracelular es detectada al transferir una alícuota del primer enriquecimiento a un medio secundario de detección que contiene el sustrato de la enzima: MUG-Gal (4-metil umbeliferil-D-galactósido). El medio emitirá fluorescencia bajo luz UV de longitud de onda de 366nm al liberarse el componente fluorogénico MUG tras la hidrólisis enzimática. Este ensayo permite la detección de entre 1,3-1,5 UFP/100 ml en menos de 8 horas y es adaptable al formato de NMP para proporcionar resultados cuantitativos. Se han realizado ensayos interlaboratorio con el método Fastphage en EE. UU. y está ya incluido en el método de la USEPA 1601 (U.S. EPA 2001a) gracias a su facilidad de uso, el uso de reactivos estables ya preparados para el uso y los ahorros en coste y tiempo generados. Uno de sus principales problemas es el requerimiento de un fluorímetro para la detección, que no es un aparato comúnmente presente en todos los laboratorios de análisis. Como consecuencia de la entrada de sustrato en las células, se observan en múltiples casos falsos positivos en los resultados. Además, dado que también se observan

ocasionalmente la presencia de falsos negativos, el método recomienda la realización de confirmaciones en placa en caso de duda, especialmente en el caso de colifagos F-específicos. Este efecto podría ser debido a la ralentización del crecimiento, la producción de progenie o la dificultad de inducción de ciclos líticos desde la lisogenia de los colifagos (Dhillon et al., 1976; Kasman, 2005; Muniesa and Jofre, 2007). De modo que este método presenta múltiples ventajas en común con *Bluephage*, pero la necesidad de equipamiento de laboratorio poco frecuente y los posibles problemas de observación de falsos positivos y falsos negativos suponen un problema que no presenta el método descrito en esta tesis doctoral.

Por lo tanto, dentro de los métodos rápidos descritos en la actualidad, *Bluephage* es la alternativa que más ventajas proporciona, debido a su adaptabilidad, sensibilidad, especificidad, sencillez y velocidad de análisis. Actualmente están siendo desarrollados kits de detección rápida que permitirían una implementación fácil en laboratorios de análisis rutinario.

El método *Bluephage* puede ser mejorado y existen múltiples posibilidades de estudio futuro para optimizarlo, como por ejemplo evaluar la sensibilidad del uso de sustratos fluorógenos en comparación con los cromógenos, la incorporación de cepas huéspedes liofilizadas (más sencillas de almacenar, siempre y cuando se validase su viabilidad y el marco de tiempo necesario para generar resultados), o la adaptación a plataformas online ya disponibles para el automatizado de la detección (Hesari et al., 2016; Rochelet et al., 2015; Satoh et al., 2020; Togo et al., 2007). La investigación de otras posibles mejoras en la detección mediante los métodos tradicionales también podría contribuir a la optimización del método *Bluephage*. En esta tesis se han explorado estas posibles mejoras en la detección de colifagos mediante cambios en los métodos estandarizados (Artículos 3 y 5), algunos como mejoras globales en el método y otros específicos para la detección de determinados tipos de colifagos.

En el caso de las **mejoras generales**, en el artículo 3 se estudiaron dos posibles aproximaciones: la adición de compuestos que favorezcan el crecimiento de la cepa huésped para reducir el tiempo de incubación necesario y la reducción de la concentración de los nutrientes presentes en el medio MS original para reducir los costes del ensayo, ya que los posee en exceso. Aunque no se encontró una mejora conclusiva respecto a la adición de nuevos componentes, los resultados obtenidos probaron que la reducción de la concentración de nutrientes hasta la mitad de la concentración original no afecta a la velocidad de crecimiento de la cepa ni a la detección de fagos. Esto puede suponer una gran ventaja especialmente para el análisis de muestras de

grandes volúmenes, que requieren cultivos de enriquecimiento utilizando actualmente los medios concentrados al doble de su concentración habitual para que al añadir la muestra el medio no se diluya (Anonymous, 1995, 2000). Sin embargo, a la luz de estos nuevos datos, se podría utilizar el medio original, lo cual implicaría una reducción teórica del coste de hasta un 30% sin afectar el crecimiento total de la cepa ni el recuento de los bacteriófagos. Teniendo en cuenta las normativas que están entrando en vigor, esta reducción de componentes del medio podría tener importantes repercusiones económicas para muchos laboratorios de análisis (The European Parliament and the Council of the European Union 2020b, 2020a). Además, facilita la exploración de nuevas posibilidades de diseño y optimización para kits rápidos de detección de bacteriófagos, ya que los costes añadidos generados por la inclusión de nuevos componentes pueden ser compensados con el ahorro obtenido por la dilución del medio.

En cuanto a las posibles **mejoras asociadas a la detección de un tipo específico de bacteriófago**, durante los ensayos del artículo 5 se observó que la ausencia de agitación y el aumento en los tiempos de incubación hasta una fase exponencial tardía aumentaban la sensibilidad de detección de colifagos F-específicos de *E. coli* HS/FAmp y sus derivadas. En relación con la ausencia de agitación, la causa más probable de este incremento es la prevención de la rotura mecánica de los pili, requeridos para la infección (Wetzel 1999). En el caso de la fase exponencial tardía, se ha descrito que la presencia de concentraciones mayores de bacterias huéspedes metabólicamente activas puede promover una mejor captación y propagación de fagos y, consecuentemente, una mejor detección (Rajnovic and Mas 2020). Se ha comprobado también que los ratios de conjugación son superiores en cultivos de fase exponencial tardía que temprana (Lampkowska et al. 2008), por lo que la expresión de un mayor número de estructuras conjugativas aumentaría la detección de los colifagos F-específicos. Estas modificaciones, sin embargo, no mejoraron la detección de fagos cuando se aplicaron a las cepas de *Salmonella*. La causa puede radicar en la expresión de genes nativos de *E. coli* (el plásmido F) en cepas de *Salmonella*, ralentizando sus tasas de crecimiento debido al aumento en los costes de adaptación generados por la inclusión de estos componentes no nativos (San Millan et al., 2015; Zhang et al., 2006). Este retraso, aunque no es crítico en el método tradicional donde la incubación de las placas permite a la cepa crecer durante toda la noche, puede ser de crucial importancia en el caso de métodos rápidos, y es una de las razones por las que se seleccionó la cepa CB14 derivada de *E. coli* en lugar de la cepa CB16 derivada de *Salmonella* para las aplicaciones de *Bluephage*. En resumen, con las pequeñas modificaciones sobre los protocolos estandarizados se han corregido diferencias observadas tradicionalmente entre los recuentos de las dos cepas

huéspedes usadas para detectar fagos F-específicos, haciendo a ambas equiparables (Chung et al., 1998; Schaper and Jofre, 2000).

A la hora de elaborar nuevas normativas que incluyan a los bacteriófagos como parámetro microbiológico, existe un debate respecto al tipo de colifago que debería ser detectado. Cada uno de los grupos de colifagos ofrece una serie de ventajas y desventajas que condicionan el tipo de muestra donde se aplicarían (IAWPRC Study group on health related water microbiology 1991). Por ello, se ha planteado como solución el **análisis simultáneo de ambos tipos de colifagos** empleando una única cepa capaz de detectar colifagos totales. En el artículo 4 de la tesis se explora esta alternativa y su posible adaptación al método *Bluephage*.

Morfológicamente, los colifagos somáticos son más similares a los virus entéricos de ADN y los colifagos F-específicos se asemejan más a virus de ARN como los norovirus o el virus de hepatitis A, patógenos fecales de importancia clínica (Ballester et al., 2005; Love et al., 2014). Por ello, se considera que los colifagos F-específicos son mejores indicadores del destino de los virus patógenos más comunes en las muestras, especialmente el grupo I de los F-ARN específicos (Amarasiri et al., 2017; Haramoto et al., 2015). No obstante, como indicadores de contaminación fecal, la detección de los colifagos somáticos es más sencilla por su abundancia en la mayor parte de las muestras contaminadas fecalmente, su facilidad de visualización y la robustez de sus cepas huéspedes (Nappier et al., 2019). Los colifagos somáticos son excretados en mayor cantidad (Armon and Kott, 1996; IAWPRC Study group on health related water microbiology, 1991; Lucena and Jofre, 2010) y tienen una mayor persistencia en el ambiente (Gantzer, et al., 2001; Grabow, 2001; Lee and Sobsey, 2011; McMinn et al., 2014; Mocé-Llivina et al., 2003; Schaper et al., 2002), lo cual explica la tendencia a encontrarse en mayores concentraciones en las muestras. Los colifagos F-específicos, en cambio, son más abundantes sólo en determinados tipos de muestras como: en las aguas regeneradas debido a que la radiación UV tiene importancia en los procesos de inactivación, (Montemayor et al., 2008; Rajala-Mustonen et al., 1997; Souza et al., 2013; Zyara et al., 2016), en los sedimentos arcillosos (Skraber et al., 2009), en aguas subterráneas de determinados acuíferos (Abbaszadegan et al., 2003; Armon et al., 1997; Lucena et al., 2006), en efluentes secundarios y en determinadas aguas superficiales (Brion et al., 2002; Muniesa et al., 2009; U.S. EPA, 2001c). Sin embargo, su persistencia en aguas superficiales, especialmente en climas cálidos, es baja, así como su persistencia a tratamientos de inactivación basados en calor y pH elevados (McMinn et al., 2017; Silverman et al., 2013; Sinton et al., 1999; Sinton et al., 2002; Sun et al.,

1997). Por tanto, el análisis paralelo de ambos grupos de bacteriófagos cubriría todas las opciones.

El uso de cepas que permiten la detección de ambos tipos de colifagos ha sido estudiado desde hace tiempo, y algunas de las cepas estudiadas en los momentos iniciales de desarrollo de los métodos estandarizados, como la *E. coli* C3000, eran capaces de detectar colifagos F-específicos y colifagos somáticos (Deborde et al., 1998; Rose, 2005). Sin embargo, inicialmente se descartaron precisamente porque se estaba tratando de desarrollar cepas que detectaran exclusivamente F-específicos. Sólo en las últimas décadas se ha trabajado en el perfeccionamiento y la mejora de cepas capaces de detectar ambos tipos de colifagos con la misma eficacia (Guzmán et al. 2008). Desde el desarrollo de la cepa de *E. coli* CB390, el interés por el uso de cepas que permitan detectar ambos tipos de colifagos con un solo análisis ha crecido y se han realizado múltiples estudios comparativos con otras cepas de los métodos estandarizados en diferentes tipos de muestras de múltiples localizaciones (Agulló-Barceló et al., 2016; Bailey et al., 2017; Giek Goh et al., 2019; Jebri et al., 2012; Korajkic et al., 2020; Sobsey, 2014). Se ha comprobado que el uso de una cepa capaz de detectar ambos tipos de colifagos supone una ventaja en la metodología, ya que evita la necesidad de realizar dos análisis independientes, sin disminuir la capacidad de detección de fagos.

Sin embargo, como ya hemos visto, los métodos tradicionales de los protocolos estandarizados implican tiempos superiores a 12 h, tanto en ensayos cualitativos como cuantitativos, y la detección de colifagos totales no supone una excepción a esta tendencia (Guzmán et al. 2008). Por ello, en el estudio realizado en el artículo 4 se desarrolló la cepa CB12, capaz de detectar colifagos totales mediante el método *Bluephage*. Esta cepa permite detectar hasta 1 colifago en un tiempo de 5,5 h, dentro de la jornada laboral, evitando falsos positivos hasta en 8 h de incubación. Este es el método más rápido de detección de colifagos totales descrito hasta la fecha. Se observó también que no existen diferencias significativas entre los recuentos de colifagos totales y los recuentos de somáticos, dado que los colifagos F-ARN específicos se encuentran habitualmente en números significativamente inferiores en muestras naturales, tal y como se observó en el artículo 5 en la comparativa entre las cepas capaces de detectar colifagos totales y las cepas que detectan colifagos F-específicos. Por lo tanto, la CB12 supone una mejora global en la detección de colifagos, sin generar diferencias significativas en la capacidad de detección respecto al funcionamiento del método *Bluephage*.

En definitiva, ante la necesidad de la detección de colifagos causada por su inclusión como parámetros microbiológicos en múltiples normativas, se han multiplicado globalmente los esfuerzos para el desarrollo de métodos rápidos para la detección de colifagos. Dentro de los métodos actualmente disponibles, *Bluephage* es la alternativa que proporciona mejores resultados de una manera rápida y sencilla. Ofrece una flexibilidad que otros métodos no siempre disponen, al ser adaptable a los requerimientos de volumen especificados por las normativas y aplicable para la detección de todos los tipos de colifagos planteados como indicadores. Además, puede ser fácilmente producido y distribuido gracias a la liofilización de sus cepas, facilitando su implementación a nivel global. En conjunto con las diversas mejoras en el método y las cepas realizadas en este trabajo de tesis, se puede realizar la implementación de un método rápido como *Bluephage* para la detección de colifagos y el cumplimiento de los parámetros establecidos por las normativas de una manera sencilla y barata para los laboratorios de análisis, garantizando un mejor nivel de seguridad en aguas y alimentos



6. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales extraídas de los diferentes estudios realizados en esta tesis doctoral son:

- La incorporación de la detección de colifagos en las normativas de gestión de agua requiere métodos sencillos para los usuarios. *Bluephage* puede facilitar la implementación rutinaria de la detección de colifagos en laboratorios con requerimientos mínimos de equipo y de conocimientos previos.
- *Bluephage* permite la detección de hasta 1 colifago en menos de 6 horas incluyendo la incubación de la cepa huésped y la detección de fagos, dentro del tiempo correspondiente a una jornada laboral.
- Empleando las cepas CB10, CB12 o CB14, *Bluephage* permite la detección de colifagos somáticos, totales o F-específicos respectivamente.
- La sensibilidad del método *Bluephage* es equivalente a la sensibilidad de los métodos estandarizados para las 3 cepas desarrolladas (CB10, CB12 y CB14). El límite de detección observado experimentalmente es de 1 UFP/100 ml.
- El método *Bluephage* es un método específico, preciso y permite la realización de ensayos cualitativos de presencia/ausencia de manera rápida para la detección de colifagos.
- El test de presencia/ausencia de *Bluephage* puede ser adaptado a volúmenes pequeños usando microplacas y a volúmenes de hasta 100 ml teniendo en cuenta su límite de detección, haciéndolo adecuado para la implementación en normativas como la actual directiva de la UE para aguas de consumo.
- Se pueden obtener resultados cuantitativos mediante la aplicación de la técnica del NMP a los resultados de presencia/ausencia de *Bluephage*.
- El método ha sido aplicado con éxito en diversos tipos de muestras de aguas y alimentos, incluyendo aguas residuales, aguas de río, aguas de mar, mariscos, pescados, lodos y suspensiones de colifagos de referencia, tanto en análisis de presencia/ausencia como en análisis cuantitativos por NMP.
- La suplementación del medio MS con nuevos componentes no compromete el crecimiento bacteriano, algunos componentes como el hidrogenofosfato de sodio o el deoxicolato de sodio incluso mejoran ligeramente la tasa de crecimiento sin alterar el

recuento de bacteriófagos. No obstante, se requerirían más estudios para analizar los efectos de estos compuestos y optimizar la cantidad de los mismos que debe añadirse.

- Es posible diluir el medio MS hasta 4 veces sin afectar significativamente el crecimiento bacteriano y hasta 2 veces sin alterar la velocidad de crecimiento de la cepa huésped ni el recuento de bacteriófagos. De acuerdo con las estimaciones se podría alcanzar un ahorro de hasta el 33 % en los costes mediante la reducción de la concentración del medio MS hasta la mitad.
- La detección simultánea de colifagos somáticos y F-específicos en muestras diferentes empleando una única cepa huésped supone una mejora en las metodologías de detección de indicadores de contaminación fecal, ya que ahorra en costes y tiempo de análisis. La cepa CB12 ha sido generada y validada para este propósito.
- La incubación estática de la cepa huésped hasta una fase exponencial tardía mejora la detección de fagos de las cepas de *E. coli* HS y CB14. Estas modificaciones potencialmente podrían ayudar a optimizar la detección de colifagos F-específicos en aguas y alimentos.
- De momento, se descarta la aplicación de la cepa CB16 en el método *Bluephage* para la detección de colifagos F-específicos por falta de robustez y reproducibilidad, siendo preferible el uso de la cepa CB14.
- *Bluephage* es el método microbiológico más rápido descrito hasta la fecha para la detección de contaminación fecal utilizando microorganismos cultivables y puede proveer resultados donde la información rápida de contaminación fecal es esencial.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbaszadegan, Morteza, Mark Lechevallier, and Charles Gerba. 2003. "Occurrence of Viruses in US Groundwaters." *Journal / American Water Works Association* 95 (9): 107–20. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2003.tb10458.x>.
- Abbaszadegan, Morteza, Patricia Monteiro, Nena Nwachuku, Absar Alum, and Hodon Ryu. 2008. "Removal of Adenovirus, Calicivirus, and Bacteriophages by Conventional Drinking Water Treatment." *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 43 (2): 171–77. <https://doi.org/10.1080/10934520701781541>.
- Abdelzaher, Amir M., Mary E. Wright, Cristina Ortega, A. Rasem Hasan, Tomoyoki Shibata, Helena M. Solo-Gabriele, Jonathan Kish, et al. 2011. "Daily Measures of Microbes and Human Health at a Non-Point Source Marine Beach." *Journal of Water and Health* 9 (3): 443–57. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.146>.
- Ackermann, H. W. 2007. "5500 Phages Examined in the Electron Microscope." *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>.
- Ackermann, H. W., and T. M. Nguyen. 1983. "Sewage Coliphages Studied by Electron Microscopy." *Applied and Environmental Microbiology* 45 (3): 1049–59. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.1049-1059.1983>.
- Adams, M. H. 1959. "Bacteriophages." In *Bacteriophages*, 592.
- Agulló-Barceló, Miriam, Belén Galofré, Lluís Sala, Cristina García-Aljaro, Francisco Lucena, and Juan Jofre. 2016. "Simultaneous Detection of Somatic and F-Specific Coliphages in Different Settings by Escherichia Coli Strain CB390." *FEMS Microbiology Letters* 363 (17): 1–5. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw180>.
- Ahmed, Warish, Masaaki Kitajima, Sarmila Tandukar, and Eiji Haramoto. 2020. "Recycled Water Safety: Current Status of Traditional and Emerging Viral Indicators." *Current Opinion in Environmental Science and Health*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.02.009>.
- Amarasiri, Mohan, Masaaki Kitajima, Thanh H. Nguyen, Satoshi Okabe, and Daisuke Sano. 2017. "Bacteriophage Removal Efficiency as a Validation and Operational Monitoring Tool for Virus Reduction in Wastewater Reclamation: Review." *Water Research* 121: 258–69. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.035>.

- American Public Health Association. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Edited by A. D. Eaton and L. S. Clesceri. E. W. Rice, R. B. Baird. Washington D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association and the Water Environment Federation.
- Amoah, Isaac Dennis, Sheena Kumari, and Faizal Bux. 2020. "Coronaviruses in Wastewater Processes: Source, Fate and Potential Risks." *Environment International*.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105962>.
- Amoah, Isaac Dennis, Gulshan Singh, Thor Axel Stenström, and Poovendhree Reddy. 2017. "Detection and Quantification of Soil-Transmitted Helminths in Environmental Samples: A Review of Current State-of-the-Art and Future Perspectives." *Acta Tropica* 169: 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.014>.
- Anderson, Kimberly L., John E. Whitlock, and Valerie J. Harwood. 2005. "Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (6): 3041–48.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3041-3048.2005>.
- Anonymous. 1995. *ISO 10705-1. Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 1: Enumeration of F-Specific RNA Bacteriophages*. Geneva, Switzerland: International Standardisation Organisation.
- . 2000. *ISO 10705-2: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages*. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- . 2001. *ISO 10705-4: Water Quality. Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 4: Enumeration of Bacteriophages Infecting Bacteroides Fragilis*. Geneva, Switzerland: International Standardization Organization.
- AQUASTAT. 2014. "Infographics." Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La (FAO), Agricultura. 2014.
www.fao.org/nr/water/aquastat/didyouknow/index2.stm.
- Armon, R., and Y. Kott. 1996. "Bacteriophages as Indicators of Pollution." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 26 (4): 299–335.
<https://doi.org/10.1080/10643389609388494>.

- Armon, R, R Araujo, Y Kott, F Lucena, and J Jofre. 1997. “Bacteriophages of Enteric Bacteria in Drinking Water, Comparison of Their Distribution in Two Countries.” *Journal of Applied Microbiology* 83 (5): 627–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00278.x>.
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., & Snozzi, M. 2001. “Indicators of Microbial Water Quality.” In *Water Quality - Guidelines, Standards and Health. Assessment of Risk and Risk Management for Water-Related Infectious Disease.*, edited by L. Fewtrell & J. Bartram, 289–316. London: IWA Publishing.
- Aw, Tiong. 2018. “Environmental Aspects and Features of Critical Pathogen Groups.” In *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*, edited by Joan B. Rose and Blanca Jiménez Cisneros, 1–33. New Orleans, United States: Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.2>.
- Bailey, Emily S., Matthew Price, Lisa M. Casanova, and Mark D. Sobsey. 2017. “E. Coli CB390: An Alternative E. Coli Host for Simultaneous Detection of Somatic and F+ Coliphage Viruses in Reclaimed and Other Waters.” *Journal of Virological Methods* 250 (September): 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.016>.
- Ballester, Nicola A., Justin H. Fontaine, and Aaron B. Margolin. 2005. “Occurrence and Correlations between Coliphages and Anthropogenic Viruses in the Massachusetts Bay Using Enrichment and ICC-NPCR.” *Journal of Water and Health* 3 (1): 59–68. <https://doi.org/10.2166/wh.2005.0006>.
- Bányai, Krisztián, Mary K Estes, Vito Martella, and Umesh D Parashar. 2018. “Viral Gastroenteritis.” *The Lancet* 392 (10142): 175–86. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0).
- BIS. 2012. “Indian Standard Drinking Water Specification (Second Revision).” *Bureau of Indian Standards IS 10500* (May): 1–11. <http://cgwb.gov.in/Documents/WQ-standards.pdf>.
- Blanch, Anicet R., Lluís Belanche-Muñoz, Xavier Bonjoch, James Ebdon, Christophe Gantzer, Francisco Lucena, Jakob Ottoson, et al. 2006. “Integrated Analysis of Established and Novel Microbial and Chemical Methods for Microbial Source Tracking.” *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9): 5915–26.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02453-05>.

- Blanch, Anicet R., Francisco Lucena, Maite Muniesa, and Juan Jofre. 2020. "Fast and Easy Methods for the Detection of Coliphages." *Journal of Microbiological Methods* 173 (May): 105940. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105940>.
- Boehm, Alexandria B., Kevan M. Yamahara, David C. Love, Britt M. Peterson, Kristopher McNeill, and Kara L. Nelson. 2009. "Covariation and Photoinactivation of Traditional and Novel Indicator Organisms and Human Viruses at a Sewage-Impacted Marine Beach." *Environmental Science and Technology* 43 (21): 8046–52. <https://doi.org/10.1021/es9015124>.
- Bofill-Mas, Silvia, Nestor Albinana-Gimenez, Pilar Clemente-Casares, Ayalkibet Hundesa, Jesus Rodriguez-Manzano, Annika Allard, Miquel Calvo, and Rosina Girones. 2006. "Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (12): 7894–96. <https://doi.org/10.1128/AEM.00965-06>.
- Borchardt, Mark A., Nathaniel L. Haas, and Randall J. Hunt. 2004. "Vulnerability of Drinking-Water Wells in La Crosse, Wisconsin, to Enteric-Virus Contamination from Surface Water Contributions." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 5937–46. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5937-5946.2004>.
- Borrego, Juan J., Roberto Córna, Miguel A. Moriñigo, Eduardo Martínez-Manzanares, and Pedro Romero. 1990. "Coliphages as an Indicator of Faecal Pollution in Water. Their Survival and Productive Infectivity in Natural Aquatic Environments." *Water Research* 24 (1): 111–16. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90072-E](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90072-E).
- Bosch, Albert, Francisco Lucena, José M. Diez, Rodrigo Gajardo, Miquel Blasi, and Juan Jofre. 1991. "Waterborne Viruses Associated With Hepatitis Outbreak." *Journal - American Water Works Association* 83 (3): 80–83. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1991.tb07119.x>.
- Brion, G M, J S Meschke, and M D Sobsey. 2002. "F-Specific RNA Coliphages: Occurrence, Types, and Survival in Natural Waters." *Water Research* 36 (9): 2419–25. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00547-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00547-4).
- Brion, Gail, Chandramouli Viswanathan, T. R. Neelakantan, Srinivasa Lingireddy, Rosina Girones, David Lees, Annika Allard, and Apostolos Vantarakis. 2005. "Artificial Neural

- Network Prediction of Viruses in Shellfish.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9): 5244–53. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5244-5253.2005>.
- Burbano-Rosero, E M, M Ueda-Ito, J J Kisielius, T. K. Nagasse-Sugahara, B C Almeida, C P Souza, C Markman, G G Martins, L Albertini, and I. N.G. Rivera. 2011. “Diversity of Somatic Coliphages in Coastal Regions with Different Levels of Anthropogenic Activity in São Paulo State, Brazil.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (12): 4208–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02780-10>.
- Burek, P., S. Langan, W. Cosgrove, G. Fischer, T. Kahil, P. Magnuszewski, Y. Satoh, S. Tramberend, Y. Wada, and D. Wiberg. 2016. “Water Futures and Solution: Fast Track Initiative (Final Report).” Laxenburg, Austria. <http://pure.iiasa.ac.at/13872/>.
- Calci, Kevin R., William Burkhardt, William D. Watkins, and Scott R. Rippey. 1998. “Occurrence of Male-Specific Bacteriophage in Feral and Domestic Animal Wastes, Human Feces, and Human-Associated Wastewaters.” *Applied and Environmental Microbiology* 64 (12): 5027–29. <https://doi.org/10.1128/aem.64.12.5027-5029.1998>.
- Chapron, Christopher D., Nicola A. Ballester, Justin H. Fontaine, Christine N. Frades, and Aaron B. Margolin. 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.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6): 2520–25. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2520-2525.2000>.
- Chaturvedi, Pavan, Stacy D. Rodriguez, Ivan Vlassioux, Immo A. Hansen, and Sergei N. Smirnov. 2016. “Simple and Versatile Detection of Viruses Using Anodized Alumina Membranes.” *ACS Sensors* 1 (5): 488–92. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00003>.
- Christen, Pierre, and Maurice Raimbault. 1991. “Optimization of Culture Medium for Aroma Production by *Ceratocystis Fimbriata*.” *Biotechnology Letters* 13 (7): 521–26. <https://doi.org/10.1007/BF01049211>.
- Chung, H, L. A. Jaykus, G Lovelace, and M D Sobsey. 1998. “Bacteriophages and Bacteria as Indicators of Enteric Viruses in Oysters and Their Harvest Waters.” In *Water Science and Technology*, 38:37–44. International Association on Water Quality. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00797-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00797-5).
- Clokje, Martha R.J., Andrew D. Millard, Andrey V. Letarov, and Shaun Heaphy. 2011.

- “Phages in Nature.” *Bacteriophage* 1 (1): 31–45. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942>.
- Cole, Dana, Sharon C Long, and Mark D Sobsey. 2003. “Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11): 6507–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003>.
- Contreras-Coll, N., F. Lucena, K. Mooijman, A. Havelaar, V. Pierzo, M. Boque, A. Gawler, et al. 2002. “Occurrence and Levels of Indicator Bacteriophages in Bathing Waters throughout Europe.” *Water Research* 36 (20): 4963–74. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00229-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00229-4).
- Cormier, Jiemin, and Marlene Janes. 2014. “A Double Layer Plaque Assay Using Spread Plate Technique for Enumeration of Bacteriophage MS2.” *Journal of Virological Methods* 196: 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.034>.
- Cornax, Roberto, Miguel A. Moriñigo, M. Carmen Balebona, Dolores Castro, and Juan J. Borrego. 1991. “Significance of Several Bacteriophage Groups as Indicators of Sewage Pollution in Marine Waters.” *Water Research* 25 (6): 673–78. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90042-O](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90042-O).
- Danner, Marie Claire, Anne Robertson, Volker Behrends, and Julia Reiss. 2019. “Antibiotic Pollution in Surface Fresh Waters: Occurrence and Effects.” *Science of the Total Environment* 664: 793–804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>.
- Davies, C. M., S. C. Apte, S. M. Peterson, and J. L. Stauber. 1994. “Plant and Algal Interference in Bacterial β -D-Galactosidase and β -D- Glucuronidase Assays.” *Applied and Environmental Microbiology* 60 (11): 3959–64. <https://doi.org/10.1128/aem.60.11.3959-3964.1994>.
- Davies, Kenneth W. 1993. “Design of Experiments for Predictive Microbial Modeling.” *Journal of Industrial Microbiology* 12 (3–5): 295–300. <https://doi.org/10.1007/BF01584206>.
- Debartorlomeis, J., and V.J. Cabelli. 1991. “Evaluation of an Escherichia Coli Host Strain for Enumeration of of F Male-Specific Bacteriophages.” *Applied and Environmental Microbiology* 57 (5): 1301–5. <https://doi.org/10.1039/c2lc21298f>.
- Deborde, Dan C., William W Woessner, Bruce Lauerman, and Patrick Ball. 1998. “Coliphage

- Prevalence in High School Septic Effluent and Associated Ground Water.” *Water Research* 32 (12): 3781–85. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00171-7).
- Dhillon, T. S., E. K.S. Dhillon, H C Chau, W K Li, and A. H. Tsang. 1976. “Studies on Bacteriophage Distribution: Virulent and Temperate Bacteriophage Content of Mammalian Feces.” *Applied and Environmental Microbiology* 32 (1): 68–74. <https://doi.org/10.1128/aem.32.1.68-74.1976>.
- Dias, Edgard, James Ebdon, and Huw Taylor. 2018. “The Application of Bacteriophages as Novel Indicators of Viral Pathogens in Wastewater Treatment Systems.” *Water Research* 129: 172–79. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.022>.
- Dion, Moïra B., Frank Oechslin, and Sylvain Moineau. 2020. “Phage Diversity, Genomics and Phylogeny.” *Nature Reviews Microbiology* 18 (3): 125–38. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>.
- Diston, David, and Melanie Wicki. 2015. “Occurrence of Bacteriophages Infecting Bacteroides Host Strains (ARABA 84 and GB-124) in Fecal Samples of Human and Animal Origin.” *Journal of Water and Health* 13 (3): 654–61. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.199>.
- Doré, William J., Kathleen Henshilwood, and David N. Lees. 2000. “Evaluation of F-Specific RNA Bacteriophage as a Candidate Human Enteric Virus Indicator for Bivalve Molluscan Shellfish.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4): 1280–85. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1280-1285.2000>.
- Durán, A. E., M. Muniesa, L. Mocé-Llivina, C. Campos, J. Jofre, and F. Lucena. 2003. “Usefulness of Different Groups of Bacteriophages as Model Micro-Organisms for Evaluating Chlorination.” *Journal of Applied Microbiology* 95 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x>.
- Dutilh, Bas E., Noriko Cassman, Katelyn McNair, Savannah E. Sanchez, Genivaldo G.Z. Silva, Lance Boling, Jeremy J. Barr, et al. 2014. “A Highly Abundant Bacteriophage Discovered in the Unknown Sequences of Human Faecal Metagenomes.” *Nature Communications* 5: 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5498>.
- Edberg, S. C., M. J. Allen, D. B. Smith, M. LeChevallier, N. Kriz, D. Callan, R. Ward, et al. 1989. “National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and Escherichia Coli from Drinking Water: Comparison

with Presence-Absence Techniques.” *Applied and Environmental Microbiology* 55 (4): 1003–8. <https://doi.org/10.1128/aem.55.4.1003-1008.1989>.

Edwards, Robert A., Alejandro A. Vega, Holly M. Norman, Maria Ohaeri, Kyle Levi, Elizabeth A. Dinsdale, Ondrej Cinek, et al. 2019. “Global Phylogeography and Ancient Evolution of the Widespread Human Gut Virus CrAssphage.” *Nature Microbiology* 4 (10): 1727–36. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0494-6>.

Eren, A. Murat, and Sandra L. McLellan. 2014. “Discovering New Indicators of Fecal Pollution.” *Trends in Microbiology* 22 (12): 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.08.002>.

Farahbakhsh, K., and D. W. Smith. 2004. “Removal of Coliphages in Secondary Effluent by Microfiltration - Mechanisms of Removal and Impact of Operating Parameters.” *Water Research* 38 (3): 585–92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.018>.

Fauquet, C. M., and D. Fargette. 2005. “International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 Unassigned Species.” *Virology Journal* 2: 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-64>.

Feachem, R. G., Bradley, D. J., Garelick, H. & Mara, D. D. 1983. *Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol. 78. Chichester, UK: John Wiley & Sons. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(84\)90011-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90011-7).

Fewtrell, Lorna, and Jamie Bartram, eds. 2001. *Guidelines , Standards and Health : Assessment Of. IWA Publishing*. London SW1H: IWA Publishing on behalf of the World Health Organization. www.iwapublishing.com.

Figueras, M. J., F. Polo, I. Inza, and J. Guarro. 1994. “Poor Specificity of M-Endo and M-FC Culture Media for the Enumeration of Coliform Bacteria in Sea Water.” *Letters in Applied Microbiology* 19 (6): 446–50. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00978.x>.

Fletcher, Stephanie M., Damien Stark, John Harkness, and John Ellis. 2012. “Enteric Protozoa in the Developed World: A Public Health Perspective.” *Clinical Microbiology Reviews* 25 (3): 420–49. <https://doi.org/10.1128/CMR.05038-11>.

Fung, Daniel Y.C., Roger Fujioka, Kannappan Vijayavel, Dayna Sato, and Dane Bishop.

2007. "Evaluation of Fung Double Tube Test for *Clostridium Perfringens* and EasyPhage Test for F-Specific RNA Coliphages as Rapid Screening Tests for Fecal Contamination in Recreational Waters of Hawaii." *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 15 (3): 217–29. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2007.00091.x>.
- Furuse, K. 1987. "Distribution of Coliphages in the Environment: General Considerations." In *Phage Ecology*, edited by S.M. Goyal and G. Gerba, C.P. and Bitton, 87–123. New York, NY, USA.
- Gantzer, C, L Gillerman, M Kuznetsov, and G Oron. 2001. "Adsorption and Survival of Faecal Coliforms, Somatic Coliphages and F-Specific RNA Phages in Soil Irrigated with Wastewater." *Water Science and Technology* 43 (12): 117–24. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0722>.
- Gantzer, Christophe, Joseph Henny, and Louis Schwartzbrod. 2002. "Bacteroides Fragilis and Escherichia Coli Bacteriophages in Human Faeces." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205 (4): 325–28. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00152>.
- García-Aljaro, C., A.R. Blanch, C. Campos, J. Jofre, and F. Lucena. 2019. "Pathogens, Faecal Indicators and Human-Specific Microbial Source-Tracking Markers in Sewage." *Journal of Applied Microbiology* 126 (3): 701–17. <https://doi.org/10.1111/jam.14112>.
- García-Aljaro, Cristina, Lakshmi N Cella, Dhamanand J Shirale, Miso Park, Francisco Javier Muñoz, Marylynn V. Yates, and Ashok Mulchandani. 2010. "Carbon Nanotubes-Based Chemiresistive Biosensors for Detection of Microorganisms." *Biosensors and Bioelectronics* 26 (4): 1437–41. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.077>.
- García-Aljaro, Cristina, Xavier Muñoz-Berbel, A Toby A Jenkins, Anicet R Blanch, and Francesc Xavier Muñoz. 2008. "Surface Plasmon Resonance Assay for Real-Time Monitoring of Somatic Coliphages in Wastewaters." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (13): 4054–58. <https://doi.org/10.1128/AEM.02806-07>.
- García-Aljaro, Cristina, Xavier Muñoz-Berbel, and Francisco J. Muñoz. 2009. "On-Chip Impedimetric Detection of Bacteriophages in Dairy Samples." *Biosensors and Bioelectronics* 24 (6): 1712–16. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.047>.
- García-Aljaro, Cristina, Elisenda Ballesté, Maite Muniesa, and Juan Jofre. 2017. "Determination of CrAssphage in Water Samples and Applicability for Tracking Human Faecal Pollution." *Microbial Biotechnology* 10 (6): 1775–80.

<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12841>.

Gerba, C P, S M Goyal, R L LaBelle, and G F Bodgan. 1979. "Failure of Indicator Bacteria to Reflect the Occurrence of Enteroviruses in Marine Waters." *American Journal of Public Health* 69 (11): 1116–19. <https://doi.org/10.2105/AJPH.69.11.1116>.

Gerba, Charles P., and Walter Q. Betancourt. 2017. "Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment." *Environmental Science and Technology* 51 (13): 7318–25. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835>.

Gerba, Charles P., Dawn M. Gramos, and Nena Nwachuku. 2002. "Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (10): 5167–69. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5167-5169.2002>.

Giek Goh, Shin, Nazanin Saeidi, Xiaoqiong Gu, Genevieve Gabrielle Rose Vergara, Liang Liang, Haoming Fang, Masaaki Kitajima, Ariel Kushmaro, and Karina Yew-Hoong Gin. 2019. "Occurrence of Microbial Indicators, Pathogenic Bacteria and Viruses in Tropical Surface Waters Subject to Contrasting Land Use." *Water Research* 150 (January): 200–215. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.058>.

Girones, R., M. A. Ferrús, J. L. Alonso, J. Rodriguez-Manzano, B. Calgua, A. de Abreu Corrêa, A. Hundesa, A. Carratala, and S. Bofill-Mas. 2010. "Molecular Detection of Pathogens in Water - The Pros and Cons of Molecular Techniques." *Water Research* 44 (15): 4325–39. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.030>.

Girones, R., J. Jofre, and A. Bosch. 1989. "Natural Inactivation of Enteric Viruses in Seawater." *Journal of Environmental Quality* 18 (1): 34–39. <https://doi.org/10.2134/jeq1989.00472425001800010006x>.

Gleick, Peter H. 1993. "Water and Conflict: Fresh Water Resources and International Security." *International Security* 18 (1): 79–112.

Gomila, Margarita, Javier J Solis, Zoyla David, Cristina Ramon, and Jorge Lalucat. 2008. "Comparative Reductions of Bacterial Indicators, Bacteriophage-Infecting Enteric Bacteria and Enteroviruses in Wastewater Tertiary Treatments by Lagooning and UV-Radiation." *Water Science and Technology* 58 (11): 2223–33. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.584>.

Goyal, Sagar M., ed. 2006. *Viruses in Foods*. Food Microbiology and Food Safety. Boston,

- MA, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/0-387-29251-9>.
- Grabow, W. O.K. 2001. "Bacteriophages: Update on Application as Models for Viruses in Water." *Water SA* 27 (2): 251–68. <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i2.4999>.
- Grabow, W O K, South Africa. Water Research Commission, and University of Pretoria. Department of Medical Virology. 1998. *Evaluation of the Application of Bacteriophages as Indicators of Water Quality*. WRC Report. Water Research Commission. <https://books.google.es/books?id=oT1BGQAACAAJ>.
- Grabow, WOK, CS Holtzhausen, and JC De Villiers. 1993. "Research on Bacteriophages as Indicators of Water Quality." *Water Research Commission Report*. Vol. 321. [https://scholar.google.com.br/scholar?q= Research on Bacteriophages as Indicators of Water Quality#0](https://scholar.google.com.br/scholar?q=Research+on+Bacteriophages+as+Indicators+of+Water+Quality#0).
- Green, J, K. Bruce, C. Conner, and R. Mutesi. 2000. "The APHA Standard Method for the Enumeration of Somatic Coliphages in Water Has Low Efficiency of Plating." *Water Research* 34 (3): 759–62. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00233-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00233-X).
- Griffin, Dale W., Charles J. Gibson, Erin K. Lipp, Kelley Riley, John H. Paul, and Joan B. Rose. 1999. "Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcriptase PCR and of Microbial Indicators by Standard Methods in the Canals of the Florida Keys." *Applied and Environmental Microbiology* 65 (9): 4118–25. <https://doi.org/10.1128/aem.65.9.4118-4125.1999>.
- Griffith, John F, Yiping Cao, Charles D. McGee, and Stephen B Weisberg. 2009. "Evaluation of Rapid Methods and Novel Indicators for Assessing Microbiological Beach Water Quality." *Water Research* 43 (19): 4900–4907. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.017>.
- Grose, Julianne H., and Sherwood R. Casjens. 2014. "Understanding the Enormous Diversity of Bacteriophages: The Tailed Phages That Infect the Bacterial Family Enterobacteriaceae." *Virology* 468: 421–43. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.024>.
- Guelin, A. 1948. "Etude Quantitative de Bacteriophages de La Mer." *Ann Inst Pasteur* 74: 104–112.
- Guyader, Françoise S. Le, Jean Claude Le Saux, Katia Ambert-Balay, Joanna Krol, Ophelie Serais, Sylvain Parnaudeau, Hélène Giraudon, et al. 2008. "Aichi Virus, Norovirus,

Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak.” *Journal of Clinical Microbiology* 46 (12): 4011–17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01044-08>.

Guzmán, Carolina, Juan Jofre, Anicet R. Blanch, and Francisco Lucena. 2007. “Development of a Feasible Method to Extract Somatic Coliphages from Sludge, Soil and Treated Biowaste.” *Journal of Virological Methods* 144 (1–2): 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.03.017>.

Guzmán, Carolina, Laura Mocé-Llivina, Francisco Lucena, and Juan Jofre. 2008. “Evaluation of Escherichia Coli Host Strain CB390 for Simultaneous Detection of Somatic and F-Specific Coliphages.” *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2): 531–34. <https://doi.org/10.1128/AEM.01710-07>.

Guzmán Luna, Carolina, Ana Costán-Longares, Francisco Lucena, and Joan Jofre. 2009. “Detection of Somatic Coliphages through a Bioluminescence Assay Measuring Phage Mediated Release of Adenylate Kinase and Adenosine 5'-Triphosphate.” *Journal of Virological Methods* 161 (1): 107–13. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.05.021>.

Hagler, Allen N., Leda C. Mendonça-Hagler, Edielson A. Santos, Sheila Farage, Julio B. Silva Filho, Augusto Schrank, and Renilson B. De Oliverira. 1986. “Microbial Pollution Indicators in Brazilian Tropical and Subtropical Marine Surface Waters.” *Science of The Total Environment* 58 (1–2): 151–60. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(86\)90084-7](https://doi.org/10.1016/0048-9697(86)90084-7).

Haramoto, Eiji, Saki Fujino, and Mikie Otagiri. 2015. “Distinct Behaviors of Infectious F-Specific RNA Coliphage Genogroups at a Wastewater Treatment Plant.” *Science of the Total Environment* 520: 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.034>.

Haramoto, Eiji, Hiroyuki Katayama, Kumiko Oguma, and Shinichiro Ohgaki. 2005. “Application of Cation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (5): 2403–11. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2403-2411.2005>.

Hartard, C, R Rivet, S Banas, and C Gantzer. 2015. “Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins.” *Applied and Environmental Microbiology* 81 (18): 6505–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.01905-15>.

- Harwood, Valerie J., Audrey D. Levine, Troy M. Scott, Vasanta Chivukula, Jerzy Lukasik, Samuel R. Farrah, and Joan B. Rose. 2005. "Validity of the Indicator Organism Paradigm for Pathogen Reduction in Reclaimed Water and Public Health Protection." *Applied and Environmental Microbiology* 71 (6): 3163–70. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005>.
- Harwood, Valerie, Orin Shanks, Asja Korajkic, Matthew Verbyla, Warish Ahmed, and Mercedes Iriarte. 2019. "General and Host-Associated Bacterial Indicators of Faecal Pollution." In *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*, edited by Andreas Farnleitner and Anicet Blanch. Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.6>.
- Hata, A., M. Kitajima, and H. Katayama. 2013. "Occurrence and Reduction of Human Viruses, F-Specific RNA Coliphage Genogroups and Microbial Indicators at a Full-Scale Wastewater Treatment Plant in Japan." *Journal of Applied Microbiology* 114 (2): 545–54. <https://doi.org/10.1111/jam.12051>.
- Havelaar, A. H., K. Furuse, and W. M. Hogeboom. 1986. "Bacteriophages and Indicator Bacteria in Human and Animal Faeces." *Journal of Applied Bacteriology* 60 (3): 255–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01081.x>.
- Havelaar, A. H., and W. M. Hogeboom. 1983. "Factors Affecting the Enumeration of Coliphages in Sewage and Sewage-Polluted Waters." *Antonie van Leeuwenhoek* 49 (4–5): 387–97. <https://doi.org/10.1007/BF00399318>.
- . 1984. "A Method for the Enumeration of Male-specific Bacteriophages in Sewage." *Journal of Applied Bacteriology* 56 (3): 439–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01372.x>.
- Havelaar, A. H., M. Van Olphen, and Y. C. Drost. 1993. "F-Specific RNA Bacteriophages Are Adequate Model Organisms for Enteric Viruses in Fresh Water." *Applied and Environmental Microbiology* 59 (9): 2956–62. <https://doi.org/10.1128/aem.59.9.2956-2962.1993>.
- Havelaar, A. H., and W. M. Pot-Hogeboom. 1988. "F-Specific RNA-Bacteriophages as Model Viruses in Water Hygiene: Ecological Aspects." *Water Science and Technology* 20 (11–12): 399–407. <https://doi.org/10.2166/wst.1988.0312>.

- Hernández-Delgado, E. A., and G. A. Toranzos. 1995. "In Situ Replication Studies of Somatic and Male-Specific Coliphages in a Tropical Pristine River." *Water Science and Technology* 31 (5–6): 247–50. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00274-Q](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00274-Q).
- Hernando-Amado, Sara, Teresa M. Coque, Fernando Baquero, and José L. Martínez. 2019. "Defining and Combating Antibiotic Resistance from One Health and Global Health Perspectives." *Nature Microbiology* 4 (9): 1432–42. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>.
- Hesari, Nikou, Absar Alum, Mohamad Elzein, and Morteza Abbaszadegan. 2016. "A Biosensor Platform for Rapid Detection of E. Coli in Drinking Water." *Enzyme and Microbial Technology* 83: 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.11.007>.
- Hsu, F. C., Y. S.C. Shieh, J. Van Duin, M. J. Beekwilder, and M. D. Sobsey. 1995. "Genotyping Male-Specific RNA Coliphages by Hybridization with Oligonucleotide Probes." *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11): 3960–66. <https://doi.org/10.1128/aem.61.11.3960-3966.1995>.
- Hsu, F C, Y. C.Carol Shieh, and M D Sobsey. 2002. "Enteric Bacteriophages as Potential Fecal Indicators in Ground Beef and Poultry Meat." *Journal of Food Protection* 65 (1): 93–99. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.1.93>.
- Huang, Xiao, Xingyu Lin, Katharina Urmann, Lijie Li, Xing Xie, Sunny Jiang, and Michael R. Hoffmann. 2018. "Smartphone-Based in-Gel Loop-Mediated Isothermal Amplification (GLAMP) System Enables Rapid Coliphage MS2 Quantification in Environmental Waters." *Environmental Science and Technology* 52 (11): 6399–6407. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00241>.
- Hurst, C. J., J. C. Blannon, R. L. Hardaway, and W. C. Jackson. 1994. "Differential Effect of Tetrazolium Dyes upon Bacteriophage Plaque Assay Titers." *Applied and Environmental Microbiology* 60 (9): 3462–65. <https://doi.org/10.1128/aem.60.9.3462-3465.1994>.
- Hyman, Paul, and Stephen T. Abedon. 2009. "Practical Methods for Determining Phage Growth Parameters." In *Bacteriophages*, edited by Martha R.J. Clokie and Andrew M. Kropinski, 175–202. Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_18.
- IAWPRC Study group on health related water microbiology. 1991. "Bacteriophages as Model Viruses in Water Quality Control." *Water Research* 25 (5): 529–45. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-B](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-B).

- Ijzerman, M. Marian, Joseph O. Falkinham, and Charles Hagedorn. 1993. "A Liquid, Colorimetric Presence-Absence Coliphage Detection Method." *Journal of Virological Methods* 45 (2): 229–34. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(93\)90106-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(93)90106-2).
- Ikner, Luisa A., Charles P. Gerba, and Kelly R. Bright. 2012. "Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review." *Food and Environmental Virology* 4 (2): 41–67. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9080-2>.
- Janczuk-Richter, Marta, Magdalena Dominik, Ewa Roźniecka, Marcin Koba, Predrag Mikulic, Wojtek J. Bock, Marcin Łoś, Mateusz Śmietana, and Joanna Niedziółka-Jönsson. 2017. "Long-Period Fiber Grating Sensor for Detection of Viruses." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 250: 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.148>.
- Jebri, Sihem, Juan Jofre, Insaf Barkallah, Mouldi Saidi, and Fatma Hmaied. 2012. "Presence and Fate of Coliphages and Enteric Viruses in Three Wastewater Treatment Plants Effluents and Activated Sludge from Tunisia." *Environmental Science and Pollution Research* 19 (6): 2195–2201. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0722-y>.
- Jebri, Sihem, Maite Muniesa, and Juan Jofre. 2017. "General and Host-Associated Bacteriophage Indicators of Faecal Pollution." In *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*, edited by Andreas Farnleitner and Anicet Blanch. Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO: Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.7>.
- Ji, Mengzhi, Zichen Liu, Kaili Sun, Zhongfang Li, Xiangyu Fan, and Qiang Li. 2021. "Bacteriophages in Water Pollution Control: Advantages and Limitations." *Frontiers of Environmental Science and Engineering* 15 (5). <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1378-y>.
- Jiang, S., R. Noble, and W. Chu. 2001. "Human Adenoviruses and Coliphages in Urban Runoff-Impacted Coastal Waters of Southern California." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (1): 179–84. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.179-184.2001>.
- Jiang, Sunny C., Weiping Chu, and Jian Wen He. 2007. "Seasonal Detection of Human Viruses and Coliphage in Newport Bay, California." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20): 6468–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.01370-07>.
- Jofre, J. 2009. "Is the Replication of Somatic Coliphages in Water Environments

Significant?” *Journal of Applied Microbiology* 106 (4): 1059–69.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03957.x>.

Jofre, J., M. Blasi, A. Bosch, and F. Lucena. 1989. “Occurrence of Bacteriophages Infecting *Bacteroides Fragilis* and Other Viruses in Polluted Marine Sediments.” *Water Science and Technology* 21 (3): 15–19. <https://doi.org/10.2166/wst.1989.0072>.

Jofre, Joan, Anicet R. Blanch, Francisco Lucena, and Maite Muniesa. 2014. “Bacteriophages Infecting *Bacteroides* as a Marker for Microbial Source Tracking.” *Water Research* 55: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.006>.

Jofre, Juan. 2007. “Indicators of Waterborne Enteric Viruses.” In *Human Viruses in Water*, edited by Albert Bosch, 227–49. Barcelona, Spain: Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17011-7](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17011-7).

Jofre, Juan, Francisco Lucena, Anicet R. Blanch, and Maite Muniesa. 2016. “Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources.” *Water* 8: 199–220. <https://doi.org/10.3390/w8050199>.

Jofre, Juan, Jill R Stewart, and Willie Grabow. 2011. “Phage Methods.” In *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*, edited by Charles Hagedorn, Anicet R Blanch, and Valerie J Harwood, 137–56. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9386-1_6.

Jonkers, Tim J.H., Maurice Steenhuis, Louis Schalkwijk, Joen Luirink, Dirk Bald, Corine J. Houtman, Jeroen Kool, Marja H. Lamoree, and Timo Hamers. 2020. “Development of a High-Throughput Bioassay for Screening of Antibiotics in Aquatic Environmental Samples.” *Science of the Total Environment* 729: 139028. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139028>.

Jung, Eun Lee, Young Lim Mi, Yoon Kim Sei, Sunhee Lee, Heetae Lee, Hyun Myung Oh, Hor Gil Hur, and Gwang Pyo Ko. 2009. “Molecular Characterization of Bacteriophages for Microbial Source Tracking in Korea.” *Applied and Environmental Microbiology* 75 (22): 7107–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.00464-09>.

Jung, Ji Hee, Chang Hoon Yoo, Eung Seo Koo, Hak Min Kim, Youjin Na, Weon Hwa Jheong, and Yong Seok Jeong. 2011. “Occurrence of Norovirus and Other Enteric Viruses in Untreated Groundwaters of Korea.” *Journal of Water and Health* 9 (3): 544–55. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.142>.

- Kasman, Laura M. 2005. "Barriers to Coliphage Infection of Commensal Intestinal Flora of Laboratory Mice." *Virology Journal* 2: 1–7. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-34>.
- Kirs, Marek, and David C Smith. 2007. "Multiplex Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase PCR for F⁺-Specific RNA Coliphages: A Method for Use in Microbial Source Tracking." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3): 808–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.00399-06>.
- Kölbél, Julian, Colin Strong, Cindy Noe, and Paul Reig. 2018. "Mapping Public Water Management By Harmonizing and Sharing Corporate Water Risk Information." *World Resources Institute*. www.wri.org/publication/mapping-public-water.
- Koonin, Eugene V., Valerian V. Dolja, Mart Krupovic, Arvind Varsani, Yuri I. Wolf, Natalya Yutin, F. Murilo Zerbini, and Jens H. Kuhn. 2020. "Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 84 (2): 1–33. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00061-19>.
- Koplan, Jeffrey P., T. Christopher Bond, Michael H. Merson, K. Srinath Reddy, Mario Henry Rodriguez, Nelson K. Sewankambo, and Judith N. Wasserheit. 2009. "Towards a Common Definition of Global Health." *The Lancet* 373 (9679): 1993–95. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60332-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60332-9).
- Korajkic, Asja, Brian McMinn, Michael P Herrmann, Mano Sivaganesan, Catherine A Kelty, Pat Clinton, Maliha S Nash, and Orin C Shanks. 2020. "Viral and Bacterial Fecal Indicators in Untreated Wastewater across the Contiguous United States Exhibit Geospatial Trends." *Applied and Environmental Microbiology* 86 (8): 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.02967-19>.
- Kott, Yehuda, Netta Roze, Shoshana Sperber, and Nachum Betzer. 1974. "Bacteriophages as Viral Pollution Indicators." *Water Research* 8 (3): 165–71. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(74\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(74)90039-6).
- Lampkowska, Joanna, Louise Feld, Aine Monaghan, Niamh Toomey, Susanne Schjørring, Bodil Jacobsen, Hilko van der Voet, et al. 2008. "A Standardized Conjugation Protocol to Assess Antibiotic Resistance Transfer between Lactococcal Species." *International Journal of Food Microbiology* 127 (1–2): 172–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.017>.
- Lasobras, J., J. Dellunde, Joan Jofre, and F. Lucena. 1999. "Occurrence and Levels of Phages

Proposed as Surrogate Indicators of Enteric Viruses in Different Types of Sludges.” *Journal of Applied Microbiology* 86 (4): 723–29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00722.x>.

LeChevallier, M, and A Kwok-Keung. 2004. *Water Treatment and Pathogen Control: Process Efficiency in Achieving Safe Drinking Water*. London, UK: World Health Organization.

Lee, Hee Suk, and Mark D. Sobsey. 2011. “Survival of Prototype Strains of Somatic Coliphage Families in Environmental Waters and When Exposed to UV Low-Pressure Monochromatic Radiation or Heat.” *Water Research* 45 (12): 3723–34. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.024>.

Levine, Myron M. 1987. “Escherichia Coli That Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent.” *Journal of Infectious Diseases* 155 (3): 377–81. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.3.377>.

Li, Laam, Nilmini Mendis, Hana Trigui, James D. Oliver, and Sebastien P. Faucher. 2014. “The Importance of the Viable but Non-Culturable State in Human Bacterial Pathogens.” *Frontiers in Microbiology* 5 (JUN): 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>.

Liang, Wei Jun, Kate J. Wilson, Hao Xie, Jan Knol, Shun’ichi Suzuki, Nicholas G. Rutherford, Peter J.F. Henderson, and Richard A. Jefferson. 2005. “The GusBC Genes of Escherichia Coli Encode a Glucuronide Transport System.” *Journal of Bacteriology* 187 (7): 2377–85. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2377-2385.2005>.

Lodder, W. J., H. H.J.L. Van Den Berg, S. A. Rutjes, and A. M. De Roda Husman. 2010. “Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands.” *Applied and Environmental Microbiology* 76 (17): 5965–71. <https://doi.org/10.1128/AEM.00245-10>.

Lodder, W. J., and A. M. De Roda Husman. 2005. “Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands.” *Applied and Environmental Microbiology* 71 (3): 1453–61. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005>.

Łoś, Joanna M., Piotr Golec, Grzegorz Węgrzyn, Alicja Węgrzyn, and Marcin Łoś. 2008. “Simple Method for Plating Escherichia Coli Bacteriophages Forming Very Small Plaques or No Plaques under Standard Conditions.” *Applied and Environmental*

- Microbiology* 74 (16): 5113–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00306-08>.
- Łoś, M., J. M. Łoś, L. Blohm, E. Spillner, T. Grunwald, J. Albers, R. Hintsche, and Grzegorz Węgrzyn. 2005. “Rapid Detection of Viruses Using Electrical Biochips and Anti-Virion Sera.” *Letters in Applied Microbiology* 40 (6): 479–85. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01706.x>.
- Love, David C., Roberto A. Rodriguez, Christopher D. Gibbons, John F. Griffith, Qilu Yu, Jill R. Stewart, and Mark D. Sobsey. 2014. “Human Viruses and Viral Indicators in Marine Water at Two Recreational Beaches in Southern California, USA.” *Journal of Water and Health* 12 (1): 136–50. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.078>.
- Love, David C., and Mark D. Sobsey. 2007. “Simple and Rapid F+ Coliphage Culture, Latex Agglutination, and Typing Assay to Detect and Source Track Fecal Contamination.” *Applied and Environmental Microbiology* 73 (13): 4110–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-06>.
- Lowther, J. A., L. Cross, T. Stapleton, N. E. Gustar, D. I. Walker, M. Sills, S. Treagus, V. Pollington, and D. N. Lees. 2019. “Use of F-Specific RNA Bacteriophage to Estimate Infectious Norovirus Levels in Oysters.” *Food and Environmental Virology* 11 (3): 247–58. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09383-3>.
- Lucena, F., R. Araujo, and J. Jofre. 1996. “Usefulness of Bacteriophages Infecting *Bacteroides Fragilis* as Index Microorganisms of Remote Faecal Pollution.” *Water Research* 30 (11): 2812–16. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00193-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00193-5).
- Lucena, F., A. E. Duran, A. Morón, E. Calderón, C. Campos, C. Gantzer, S. Skrabber, and J. Jofre. 2004. “Reduction of Bacterial Indicators and Bacteriophages Infecting Faecal Bacteria in Primary and Secondary Wastewater Treatments.” *Journal of Applied Microbiology* 97 (5): 1069–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02397.x>.
- Lucena, F., J. Lasobras, D. McIntosh, M. Forcadell, and J. Jofre. 1994. “Effect of Distance from the Polluting Focus on Relative Concentrations of *Bacteroides Fragilis* Phages and Coliphages in Mussels.” *Applied and Environmental Microbiology* 60 (7): 2272–77. <https://doi.org/10.1128/aem.60.7.2272-2277.1994>.
- Lucena, F., X. Méndez, A. Morón, E. Calderón, C. Campos, A. Guerrero, M. Cárdenas, et al. 2003. “Occurrence and Densities of Bacteriophages Proposed as Indicators and Bacterial Indicators in River Waters from Europe and South America.” *Journal of Applied*

Microbiology 94 (5): 808–15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x>.

Lucena, F., F. Ribas, A. E. Duran, S. Skraber, C. Gantzer, C. Campos, A. Morón, E. Calderón, and J. Jofre. 2006. “Occurrence of Bacterial Indicators and Bacteriophages Infecting Enteric Bacteria in Groundwater in Different Geographical Areas.” *Journal of Applied Microbiology* 101 (1): 96–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02907.x>.

Lucena, Francisco, and Juan Jofre. 2014. “Potential Use of Bacteriophages as Indicators of Water Quality and Wastewater Treatment Processes.” In *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*, 103–18. Washington, DC, USA: ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555816629.ch6>.

Luther, Kartini, and Roger Fujioka. 2004. “Usefulness of Monitoring Tropical Streams for Male-Specific RNA Coliphages.” *Journal of Water and Health* 2 (3): 171–81. <https://doi.org/10.2166/wh.2004.0015>.

Malek, Mark, Ezra Barzilay, Adam Kramer, Brendan Camp, Lee Ann Jaykus, Blanca Escudero-Abarca, Greg Derrick, et al. 2009. “Outbreak of Norovirus Infection among River Rafters Associated with Packaged Delicatessen Meat, Grand Canyon, 2005.” *Clinical Infectious Diseases* 48 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1086/594118>.

Matatagui, Daniel, José Fontecha, María Fernández, Isabel Gràcia, Carles Cané, José Santos, and María Horrillo. 2014. “Love-Wave Sensors Combined with Microfluidics for Fast Detection of Biological Warfare Agents.” *Sensors* 14 (7): 12658–69. <https://doi.org/10.3390/s140712658>.

Matsubara, Koichi, and Hiroyuki Katayama. 2019. “Development of a Portable Detection Method for Enteric Viruses from Ambient Air and Its Application to a Wastewater Treatment Plant.” *Pathogens* 8 (3): 131. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030131>.

Maul, A. 1999. *Echantillonnage et Inférence Statistique-Virologie Des Milieux Hydriques*. Edited by Louis Schwartzbrod. Paris: Tec & Doc/Lavoisier.

Mazzocco, Amanda, Thomas E. Waddell, Erika Lingohr, and Roger P. Johnson. 2009. “Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 501: 81–85. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_9.

- McLaughlin, M. R., and M. F. Balaa. 2006. “Enhanced Contrast of Bacteriophage Plaques in Salmonella with Ferric Ammonium Citrate and Sodium Thiosulfate (FACST) and Tetrazolium Red (TZR).” *Journal of Microbiological Methods* 65 (2): 318–23. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.08.008>.
- McMinn, B. R., N. J. Ashbolt, and A. Korajkic. 2017. “Bacteriophages as Indicators of Faecal Pollution and Enteric Virus Removal.” *Letters in Applied Microbiology* 65 (1): 11–26. <https://doi.org/10.1111/lam.12736>.
- McMinn, B R, A Korajkic, and N J Ashbolt. 2014. “Evaluation of Bacteroides Fragilis GB-124 Bacteriophages as Novel Human-Associated Faecal Indicators in the United States.” *Letters in Applied Microbiology* 59 (1): 115–21. <https://doi.org/10.1111/lam.12252>.
- Mekonnen, Mesfin M., and Arjen Y. Hoekstra. 2016. “Sustainability: Four Billion People Facing Severe Water Scarcity.” *Science Advances* 2 (2): 1–7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500323>.
- Méndez, Javier, Ana Audicana, Ana Isern, Julián Llana, Belén Moreno, María Luisa Tarancón, Juan Jofre, and Francisco Lucena. 2004. “Standardised Evaluation of the Performance of a Simple Membrane Filtration-Elution Method to Concentrate Bacteriophages from Drinking Water.” *Journal of Virological Methods* 117 (1): 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.013>.
- Michelsen, Ole, Álvaro Cuesta-Dominguez, Bjarne Albrechtsen, and Peter Ruhdal Jensen. 2007. “Detection of Bacteriophage-Infected Cells of Lactococcus Lactis by Using Flow Cytometry.” *Applied and Environmental Microbiology* 73 (23): 7575–81. <https://doi.org/10.1128/AEM.01219-07>.
- Miles, A. A., S. S. Misra, and J. O. Irwin. 1938. “The Estimation of the Bactericidal Power of the Blood.” *Journal of Hygiene* 38 (6): 732–49. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>.
- Mocé-Llivina, Laura, Maite Muniesa, Hugo Pimenta-Vale, Francisco Lucena, and Juan Jofre. 2003. “Survival of Bacterial Indicator Species and Bacteriophages after Thermal Treatment of Sludge and Sewage.” *Applied and Environmental Microbiology* 69 (3): 1452–56. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1452-1456.2003>.
- Momba, Maggy, James Ebdon, Ilunga Kamika, and Matthew Verbyla. 2019. “Using Indicators to Assess Microbial Treatment and Disinfection Efficacy.” In *Water and*

Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project), edited by Andreas Farnleitner and Anicet Blanch. Michigan State University.
<https://doi.org/10.14321/waterpathogens.9>.

Montemayor, M., A. Costan, F. Lucena, J. Jofre, J. Muñoz, E. Dalmau, R. Mujeriego, and L. Sala. 2008. "The Combined Performance of UV Light and Chlorine during Reclaimed Water Disinfection." *Water Science and Technology* 57 (6): 935–40.
<https://doi.org/10.2166/wst.2008.206>.

Mooijman, K. A., M. Bahar, N. Contreras, and A. H. Havelaar. 2001. "Optimisation of the ISO-Method on Enumeration of Somatic Coliphages (Draft ISO 10705-2)." *Water Science and Technology* 43 (12): 205–8. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0739>.

Mooijman, K A, Z Ghameshlou, M Bahar, J Jofre, and A H Havelaar. 2005. "Enumeration of Bacteriophages in Water by Different Laboratories of the European Union in Two Interlaboratory Comparison Studies." *Journal of Virological Methods* 127 (1): 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.013>.

Muniain-Mujika, I., R. Girones, G. Tofino-Quesada, M. Calvo, and F. Lucena. 2002. "Depuration Dynamics of Viruses in Shellfish." *International Journal of Food Microbiology* 77 (1–2): 125–33. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00052-1).

Muniesa, M., E. Ballesté, L. Imamovic, M. Pascual-Benito, D. Toribio-Avedillo, F. Lucena, A. R. Blanch, and J. Jofre. 2018. "Bluephage: A Rapid Method for the Detection of Somatic Coliphages Used as Indicators of Fecal Pollution in Water." *Water Research* 128: 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.030>.

Muniesa, M., F. Lucena, and J. Jofre. 1999. "Study of the Potential Relationship between the Morphology of Infectious Somatic Coliphages and Their Persistence in the Environment." *Journal of Applied Microbiology* 87 (3): 402–9.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00833.x>.

Muniesa, Maite, and Juan Jofre. 2004. "Factors Influencing the Replication of Somatic Coliphages in the Water Environment." *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 86 (1): 65–76.
<https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024909.75523.be>.

———. 2007. "The Contribution of Induction of Temperate Phages to the Numbers of Free

- Somatic Coliphages in Waters Is Not Significant.” *FEMS Microbiology Letters* 270 (2): 272–76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00676.x>.
- Muniesa, Maite, Francisco Lucena, Anicet R. Blanch, Andrey Payán, and Juan Jofre. 2012. “Use of Abundance Ratios of Somatic Coliphages and Bacteriophages of Bacteroides Thetaiotaomicron GA17 for Microbial Source Identification.” *Water Research* 46 (19): 6410–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.015>.
- Muniesa, Maite, Laura Mocé-Llivina, Hiroyuki Katayama, and Juan Jofre. 2003. “Bacterial Host Strains That Support Replication of Somatic Coliphages.” *Antonie van Leeuwenhoek* 83 (4): 305–15. <https://doi.org/10.1023/a:1023384714481>.
- Muniesa, Maite, Andrey Payan, Laura Moce-Llivina, Anicet R. Blanch, and Juan Jofre. 2009. “Differential Persistence of F-Specific RNA Phage Subgroups Hinders Their Use as Single Tracers for Faecal Source Tracking in Surface Water.” *Water Research* 43 (6): 1559–64. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.038>.
- Murphy, Heather. 2019. “Persistence of Pathogens in Sewage and Other Water Types.” In *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*, edited by Marylynn V. Yates. Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.51>.
- Nappier, Sharon P., Tao Hong, Audrey Ichida, Alexandra Goldstone, and Sorina E. Eftim. 2019. “Occurrence of Coliphage in Raw Wastewater and in Ambient Water: A Meta-Analysis.” *Water Research* 153 (April): 263–73. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.058>.
- Naughton, Colleen, and James Mihelcic. 2017. “Introduction to the Importance of Sanitation.” In *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*, edited by Joan B. Rose and Blanca Jiménez Cisneros. Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.1>.
- NHMRC; NRMCC. 2011. “Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy.” Canberra.
- Nieuwstad, Th.J., E.P. Mulder, A.H. Havelaar, and M. Van Olphen. 1988. “Elimination of Micro-Organisms from Wastewater by Tertiary Precipitation and Simultaneous

Precipitation Followed by Filtration.” *Water Research* 22 (11): 1389–97.

[https://doi.org/10.1016/0043-1354\(88\)90095-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(88)90095-4).

NIH. 2007. *Understanding Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases*. Biological.

Bethesda (MD): National Institutes of Health (US).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20370/>.

North Carolina Administration. 2011. “North Carolina Administrative Code 15A NCAC 2U.”

Raleigh, USA.

Nuanualsuwan, Suphachai, and Dean O. Cliver. 2002. “Pretreatment to Avoid Positive RT-

PCR Results with Inactivated Viruses.” *Journal of Virological Methods* 104 (2): 217–25.

[https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00089-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00089-7).

O’Connell, Kevin P., Jennifer R. Bucher, Patricia E. Anderson, Cheng J. Cao, Akbar S. Khan,

Mark V. Gostomski, and James J. Valdes. 2006. “Real-Time Fluorogenic Reverse

Transcription-PCR Assays for Detection of Bacteriophage MS2.” *Applied and*

Environmental Microbiology 72 (1): 478–83. [https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.478-](https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.478-483.2006)

483.2006.

Ogorzaly, Leslie, Isabelle Bertrand, Myriam Paris, Armand Maul, and Christophe Gantzer.

2010. “Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific

RNA Phages in Raw Groundwater.” *Applied and Environmental Microbiology* 76 (24):

8019–25. <https://doi.org/10.1128/AEM.00917-10>.

Ogorzaly, Leslie, and Christophe Gantzer. 2006. “Development of Real-Time RT-PCR

Methods for Specific Detection of F-Specific RNA Bacteriophage Genogroups:

Application to Urban Raw Wastewater.” *Journal of Virological Methods* 138 (1–2):

131–39. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004>.

Ogunseitan, Oladele A., Gary S. Sayler, and Robert V. Miller. 1990. “Dynamic Interactions

Of *Pseudomonas Aeruginosa* and Bacteriophages in Lake Water.” *Microbial Ecology* 19

(2): 171–85. <https://doi.org/10.1007/BF02012098>.

OMS, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2018. *Guidelines on Sanitation and*

Health. World Health Organization.

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274939/9789241514705-eng.pdf?ua=1>.

OMS, ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, and Fondo de las Naciones Unidas

- para la Infancia UNICEF. 2017. *Progresos En Materia de Agua Potable, Saneamiento e Higiene. Organización Mundial de La Salud.*
- Parshionikar, Sandhya, Ian Laseke, and G. Shay Fout. 2010. "Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR to Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13): 4318–26. <https://doi.org/10.1128/AEM.02800-09>.
- Payment, P., M. Trudel, and R. Plante. 1985. "Elimination of Viruses and Indicator Bacteria at Each Step of Treatment during Preparation of Drinking Water at Seven Water Treatment Plants." *Applied and Environmental Microbiology* 49 (6): 1418–28. <https://doi.org/10.1128/aem.49.6.1418-1428.1985>.
- Payment, Pierre, and Annie Locas. 2011. "Pathogens in Water: Value and Limits of Correlation with Microbial Indicators." *Ground Water* 49 (1): 4–11. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2010.00710.x>.
- Payment, Pierre, Jack Siemiatycki, Lesley Richardson, Gilles Renaud, Eduardo Franco, and Michèle Prévost. 1997. "A Prospective Epidemiological Study of Gastrointestinal Health Effects Due to the Consumption of Drinking Water." *International Journal of Environmental Health Research* 7 (1): 5–31. <https://doi.org/10.1080/09603129773977>.
- Payne, Claire M, C.George Ray, Virginia Borduin, Linda L Minnich, and Michael D Lebowitz. 1986. "An Eight-Year Study of the Viral Agents of Acute Gastroenteritis in Humans: Ultrastructural Observations and Seasonal Distribution with a Major Emphasis on Coronavirus-like Particles." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 5 (1): 39–54. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(86\)90090-8](https://doi.org/10.1016/0732-8893(86)90090-8).
- Persson, Frank, Jonas Långmark, Gerald Heinicke, Torsten Hedberg, John Tobiason, Thor Axel Stenström, and Malte Hermansson. 2005. "Characterisation of the Behaviour of Particles in Biofilters for Pre-Treatment of Drinking Water." *Water Research* 39 (16): 3791–3800. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.007>.
- Pisciotta, John M., Damon F. Rath, Paul A. Stanek, D. Michael Flanery, and Valerie J. Harwood. 2002. "Marine Bacteria Cause False-Positive Results in the Colilert-18 Rapid Identification Test for Escherichia Coli in Florida Waters." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2): 539–44. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.539-544.2002>.
- Plackett RL and Burman J . P. 1946. "The Design of Optimum Multifactorial Experiments."

Biometrika 33 (4): 305–25.

Raivio, Tracy. 2011. “Identifying Your Enemies - Could Envelope Stress Trigger Microbial Immunity?” *Molecular Microbiology* 79 (3): 557–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07485.x>.

Rajala-Mustonen, R. L., P S Toivola, and H. Heinonen-Tanski. 1997. “Effects of Peracetic Acid and UV Irradiation on the Inactivation of Coliphages in Wastewater.” *Water Science and Technology* 35 (11–12): 237–41. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00265-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00265-5).

Rajnovic, Denis, and Jordi Mas. 2020. “Fluorometric Detection of Phages in Liquid Media: Application to Turbid Samples.” *Analytica Chimica Acta* 1111 (May): 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.016>.

Rajnovic, Denis, Xavier Muñoz-Berbel, and Jordi Mas. 2019. “Fast Phage Detection and Quantification: An Optical Density-Based Approach.” Edited by Eric Charles Dykeman. *PLOS ONE* 14 (5): e0216292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216292>.

Rames, Emily, and Joanne Macdonald. 2019. “The QuantiPhage Assay: A Novel Method for the Rapid Colorimetric Detection of Coliphages Using Cellulose Pad Materials.” *Water Research* 149: 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.089>.

Ramírez-Castillo, Flor Yazmín, Abraham Loera-Muro, Mario Jacques, Philippe Garneau, Francisco Javier Avelar-González, Josée Harel, and Alma Lilián Guerrero-Barrera. 2015. “Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges.” *Pathogens* 4 (2): 307–34. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>.

Republica de Colombia. 2014. “Decreto N° 1287. Criterios Para El Uso de Biosólidos Generados En Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Municipales.” Bogota.

Republique Française. 2014. “Arrêté Du 25 Juin 2014 Modifiant l’arrêté Du 2 Août 2010 Relatif à l’utilisation d’eaux Issues Du Traitement d’épuration Des Eaux Résiduairees Urbaines Pour l’irrigation de Cultures Ou d’espaces Verts.” France.

Reyes, V C, and S C Jiang. 2010. “Ecology of Coliphages in Southern California Coastal Waters.” *Journal of Applied Microbiology* 109 (2): 431–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04676.x>.

Rezaeinejad, S., G. G.R.V. Vergara, C. H. Woo, T. T. Lim, M. D. Sobsey, and K. Y.H. Gin.

2014. "Surveillance of Enteric Viruses and Coliphages in a Tropical Urban Catchment." *Water Research* 58: 122–31. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.051>.
- Rice, E. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Edited by Water Environment Federation American Public Health Association, American Water Works Association. Washington D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Richards, G. P. 1985. "Outbreaks of Shellfish-Associated Enteric Virus Illness in the United States: Requisite for Development of Viral Guidelines." *Journal of Food Protection* 48 (9): 815–23. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-48.9.815>.
- Rochelet, Murielle, Sébastien Solanas, Laetitia Betelli, Benoît Chantemesse, Fabienne Vienney, and Alain Hartmann. 2015. "Rapid Amperometric Detection of Escherichia Coli in Wastewater by Measuring β -D Glucuronidase Activity with Disposable Carbon Sensors." *Analytica Chimica Acta* 892: 160–66. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.023>.
- Rodríguez, Roberto A, David C Love, Jill R Stewart, Julianne Tajuba, Jacqueline Knee, Jerold W Dickerson, Laura F Webster, and Mark D Sobsey. 2012. "Comparison of Methods for the Detection of Coliphages in Recreational Water at Two California, United States Beaches." *Journal of Virological Methods* 181 (1): 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.01.013>.
- Rose, J. B., T. M. Scott, M. R. McLaughlin, V. J. Harwood, V. Chivukula, A. Levine, A. Gennaccaro, J. Lukasik, and S. R. Farrah. 2003. *Reduction of Pathogens, Indicator Bacteria, and Alternative Indicators by Wastewater Treatment and Reclamation Processes. Water Science and Technology: Water Supply*. Vol. 3. <https://doi.org/10.2166/ws.2003.0069>.
- Rose, Joan. 2005. "Reduction of Pathogens, Indicator Bacteria, and Alternative Indicators by Wastewater Treatment and Reclamation Processes." IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/9781780404370>.
- Sadowsky, MJ and Whitman, RL. 2011. *The Fecal Bacteria*. Edited by RL Sadowsky, MJ. and Whitman. Washington D.C.: ASM Press.
- Salter, Robert S, Gregory W Durbin, Ernestine Conklin, Jeff Rosen, and Jennifer Clancy. 2010. "Proposed Modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for

Detection of Coliphages in Drinking Water, with Same-Day Fluorescence-Based Detection and Evaluation by the Performance-Based Measurement System and Alternative Test Protocol Valida.” *Applied and Environmental Microbiology* 76 (23): 7803–10. <https://doi.org/10.1128/AEM.01235-10>.

San Millan, Alvaro, MacArena Toll-Riera, Qin Qi, and R. Craig MacLean. 2015. “Interactions between Horizontally Acquired Genes Create a Fitness Cost in *Pseudomonas Aeruginosa*.” *Nature Communications* 6: 4–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms7845>.

Santos, Sílvia B., Carla M. Carvalho, Sanna Sillankorva, Ana Nicolau, Eugénio C. Ferreira, and Joana Azeredo. 2009. “The Use of Antibiotics to Improve Phage Detection and Enumeration by the Double-Layer Agar Technique.” *BMC Microbiology* 9: 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-148>.

Satoh, Hisashi, Kai Kikuchi, Yutaka Katayose, Shu Tsuda, Reiko Hirano, Yuga Hirakata, Masaaki Kitajima, et al. 2020. “Simple and Reliable Enumeration of *Escherichia Coli* Concentrations in Wastewater Samples by Measuring β -D-Glucuronidase (GUS) Activities via a Microplate Reader.” *Science of the Total Environment* 715: 136928. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136928>.

Schaper, M., A. E. Durán, and J. Jofre. 2002. “Comparative Resistance of Phage Isolates of Four Genotypes of F-Specific RNA Bacteriophages to Various Inactivation Processes.” *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8): 3702–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3702-3707.2002>.

Schaper, Melanie, and Joan Jofre. 2000. “Comparison of Methods for Detecting Genotypes of F-Specific RNA Bacteriophages and Fingerprinting the Origin of Faecal Pollution in Water Samples.” *Journal of Virological Methods* 89 (1–2): 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00171-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00171-3).

Schewe, Jacob, Jens Heinke, Dieter Gerten, Ingjerd Haddeland, Nigel W. Arnell, Douglas B. Clark, Rutger Dankers, et al. 2014. “Multimodel Assessment of Water Scarcity under Climate Change.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (9): 3245–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222460110>.

Seeley, N. D., and S. B. Primrose. 1980. “The Effect of Temperature on the Ecology of Aquatic Bacteriophages.” *Journal of General Virology* 46 (1): 87–95.

<https://doi.org/10.1099/0022-1317-46-1-87>.

- Shkoporov, Andrey N., Ekaterina V. Khokhlova, C. Brian Fitzgerald, Stephen R. Stockdale, Lorraine A. Draper, R. Paul Ross, and Colin Hill. 2018. "ΦCrAss001 Represents the Most Abundant Bacteriophage Family in the Human Gut and Infects *Bacteroides Intestinalis*." *Nature Communications* 9 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07225-7>.
- Silverman, Andrea I, Britt M Peterson, Alexandria B Boehm, Kristopher McNeill, and Kara L Nelson. 2013. "Sunlight Inactivation of Human Viruses and Bacteriophages in Coastal Waters Containing Natural Photosensitizers." *Environmental Science and Technology* 47 (4): 1870–78. <https://doi.org/10.1021/es3036913>.
- Sinton, Lester W, Rochelle K Finlay, and Philippa A Lynch. 1999. "Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage- Polluted Seawater." *Applied and Environmental Microbiology* 65 (8): 3605–13. <https://doi.org/10.1128/aem.65.8.3605-3613.1999>.
- Sinton, Lester W, Carollyn H Hall, Philippa A Lynch, and Robert J. Davies-Colley. 2002. "Sunlight Inactivation of Fecal Indicator Bacteria and Bacteriophages from Waste Stabilization Pond Effluent in Fresh and Saline Waters." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (3): 1122–31. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1122-1131.2002>.
- Skraber, S., C. Gantzer, A. Maul, and L. Schwartzbrod. 2002. "Fates of Bacteriophages and Bacterial Indicators in the Moselle River (France)." *Water Research* 36 (14): 3629–37. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00063-5).
- Skraber, S., B. Gassilloud, and C. Gantzer. 2004. "Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (6): 3644–49. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3644-3649.2004>.
- Skraber, Sylvain, Jack Schijven, Ronald Italiaander, and Ana Maria De Roda Husman. 2009. "Accumulation of Enteric Bacteriophage in Fresh Water Sediments." *Journal of Water and Health* 7 (3): 372–79. <https://doi.org/10.2166/wh.2009.098>.
- Sobsey, MD., D. Wait, E. Bailey, T. Witsil, AJ. Karon, L. Groves, and M. Price. 2014. "Methods to Detect Fecal Indicator Viruses and Protozoan Surrogates in NC Reclaimed Water: Optimization, Performance Evaluation, Protocol Development, Validation,

Collaborative Testing, and Outreach.” Chapel Hill, NC.

<https://www.semanticscholar.org/paper/Methods-to-Detect-Fecal-Indicator-Viruses-and-in-NC-Sobsey-Wait/dfb96becfeb77bcac8c4cbb44536f61213994862>.

Solo-Gabriele, Helena M., Melinda A. Wolfert, Timothy R. Desmarais, and Carol J. Palmer. 2000. “Sources of Escherichia Coli in a Coastal Subtropical Environment.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (1): 230–37. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.230-237.2000>.

Souza, Bruno S, Renato F Dantas, Míriam Agulló-Barceló, Francisco Lucena, Carme Sans, Santiago Esplugas, and Márcia Dezotti. 2013. “Evaluation of UV/H₂O₂ for the Disinfection and Treatment of Municipal Secondary Effluents for Water Reuse.” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 88 (9): 1697–1706. <https://doi.org/10.1002/jctb.4021>.

Stachler, Elyse, Catherine Kelty, Mano Sivaganesan, Xiang Li, Kyle Bibby, and Orin C. Shanks. 2017. “Quantitative CrAssphage PCR Assays for Human Fecal Pollution Measurement.” *Environmental Science and Technology* 51 (16): 9146–54. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02703>.

Stadler, Philipp, Günter Blöschl, Wolfgang Vogl, Juri Koschelnik, Markus Epp, Maximilian Lackner, Markus Oismüller, et al. 2016. “Real-Time Monitoring of Beta-d-Glucuronidase Activity in Sediment Laden Streams: A Comparison of Prototypes.” *Water Research* 101: 252–61. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.072>.

Stetler, R. E. 1984. “Coliphages as Indicators of Enteroviruses.” *Applied and Environmental Microbiology* 48 (3): 668–70. <https://doi.org/10.1128/aem.48.3.668-670.1984>.

Straub, T. M., J. R. Hutchison, R. A. Bartholomew, C. O. Valdez, N. B. Valentine, A. Dohnalkova, R. M. Ozanich, and C. J. Bruckner-Lea. 2013. “Defining Cell Culture Conditions to Improve Human Norovirus Infectivity Assays.” *Water Science and Technology* 67 (4): 863–68. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.636>.

Sun, Z. P., Y. Levi, L. Kiene, N. Dumoutier, and F. Lucena. 1997. “Quantification of Bacteriophages of Bacteroides Fragilis in Environmental Water Samples of Seine River.” *Water, Air, and Soil Pollution* 96 (1–4): 175–83. <https://doi.org/10.1023/A:1026444102501>.

Suttle, C. A. 1994. “The Significance of Viruses to Mortality in Aquatic Microbial

- Communities.” *Microbial Ecology* 28 (2): 237–43. <https://doi.org/10.1007/BF00166813>.
- Tartera, C., and J. Jofre. 1987. “Bacteriophages Active against *Bacteroides Fragilis* in Sewage-Polluted Waters.” *Applied and Environmental Microbiology* 53 (7): 1632–37. <https://doi.org/10.1128/aem.53.7.1632-1637.1987>.
- The European Parliament and the Council of the European Union. 2020a. “Directive (EU) 2020/2184, EU (Revised) Drinking Water Directive.” *Official Journal of the European Communities* 2019 (December): 1–62.
- . 2020b. “Regulation (EU) 2020/741, Minimum Requirements for Water Reuse.” *Official Journal of the European Union* 2019 (February 2019): L 177/32-L 177/55.
- Thingstad, T. F., S. Vage, J. E. Storesund, R.-A. Sandaa, and J. Giske. 2014. “A Theoretical Analysis of How Strain-Specific Viruses Can Control Microbial Species Diversity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (21): 7813–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400909111>.
- Togo, Chamunorwa Aloius, Victor Collins Wutor, Janice Leigh Limson, and Brett Ivan Pletschke. 2007. “Novel Detection of *Escherichia Coli* β -d-Glucuronidase Activity Using a Microbially-Modified Glassy Carbon Electrode and Its Potential for Faecal Pollution Monitoring.” *Biotechnology Letters* 29 (4): 531–37. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9282-5>.
- Togo, Chamunorwa Aloius, Victor Collins Wutor, and Brett Ivan Pletschke. 2006. “Properties of in Situ *Escherichia Coli* β -D-Glucuronidase (GUS): Evaluation of Chemical Interference on the Direct Enzyme Assay for Faecal Pollution Detection in Water.” *African Journal of Biotechnology* 5 (22): 2338–44. <https://doi.org/10.5897/AJB06.536>.
- Toribio-Avedillo, Daniel, Julia Martín Díaz, Juan Jofre, Anicet R. Blanch, and Maite Muniesa. 2019. “New Approach for the Simultaneous Detection of Somatic Coliphages and F-Specific RNA Coliphages as Indicators of Fecal Pollution.” *Science of the Total Environment* 655: 263–72. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.198>.
- Tryland, I., and L. Fiksdal. 1998. “Enzyme Characteristics of β -D-Galactosidase- and β -D-Glucuronidase- Positive Bacteria and Their Interference in Rapid Methods for Detection of Waterborne Coliforms and *Escherichia Coli*.” *Applied and Environmental Microbiology* 64 (3): 1018–23. <https://doi.org/10.1128/aem.64.3.1018-1023.1998>.

- U.S. EPA. 2001a. "Method 1601: Male-Specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-Step Enrichment Procedure April 2001. EPA Document 821-R-01-030," no. April: 40.
- . 2001b. "Method 1602: Male-Specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. EPA 821-R-01-029. Office of Water, Engineering and Analysis Division, Washington, DC.," no. April.
- . 2001c. *USEPA MANUAL OF METHODS FOR VIROLOGY*. Washington, DC, USA: U.S. Environmental Protection Agency.
- . 2003a. "Results of the Interlaboratory Validation of EPA Method 1601 for Presence/Absence of Male Specific (F+) and Somatic Coliphages in Water by Two-Step Enrichment. EPA 821-R-03-015." Washington D.C.
- . 2003b. "Results of the Interlaboratory Validation of EPA Method 1602 for Enumeration of Male Specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL). EPA 821-R-03-016." Washington D.C.
- . 2006. "National Primary Drinking Water Regulations: Groundwater Rule. Final Rule; 40 CFR Parts 9, 141 and 142. Federal Register, Vol. 71." Washington D.C.
- . 2015. "Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality. EPA 820-R-15-098." Washington D.C.
- . 2016. "2016 Coliphage Experts Workshop: Discussion Topics and Findings. Office of Water. EPA 823-F-16F001," no. July: 2016–17. <https://www.epa.gov/wqc/microbial->
- . 2017. "United States - Environmental Protection Agency. Water Quality Standards Handbook: Chapter 3: Water Quality Criteria. EPA-823-B-17-001." *EPA Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC*. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-10/documents/handbook-chapter3.pdf>.
- UNESCO. 2017. *Informe Mundial de Las Naciones Unidas Sobre El Desarrollo de Los Recursos Hídricos 2017. -Aguas Residuales: El Recurso Desaprovechado*. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000247647>.
- . 2019. *Informe Mundial de Las Naciones Unidas Sobre El Desarrollo de Los Recursos Hídricos 2019: No Dejar a Nadie Atrás*. París. <https://es.unesco.org/water-security/wwap/wwdr/2019#download>.

- . 2020. *Informe Mundial de Las Naciones Unidas Sobre El Desarrollo de Los Recursos Hídricos 2020. Agua y Cambio Climático*.
<https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000373611/PDF/373611spa.pdf.multi>.
- US EPA. 2009. “The Ground Water Rule (GWR) Implementation Guidance.”
- Walker, Peter J., Stuart G. Siddell, Elliot J. Lefkowitz, Arcady R. Mushegian, Evelien M. Adriaenssens, Donald M. Dempsey, Bas E. Dutilh, et al. 2020. “Changes to Virus Taxonomy and the Statutes Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020).” *Archives of Virology* 165 (11): 2737–48.
<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04752-x>.
- Western Australian Government. 2012. “Western Australia Guidelines for Biosolids Management.” Perth. Australia.
- Westrell, T, V Dusch, S Ethelberg, J Harris, M Hjertqvist, N. Jourdan da Silva, A Koller, A. Lenglet, M. Lisby, and L. Vold. 2010. “Norovirus Outbreaks Linked to Oyster Consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010.” *Eurosurveillance* 15 (12): 7–10. <https://doi.org/10.2807/ese.15.12.19524-en>.
- Wetzel, Ronald. 1999. “Amyloids, Prions & Other Aggregates.” In *Methods in Enzymology*, edited by John N. Abelson Melvin I. Wetzel, Ronald Simon. PASADENA, CALIFORNIA.
- Wolf, Sandro, Joanne Hewitt, and Gail E. Greening. 2010. “Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination.” *Applied and Environmental Microbiology* 76 (5): 1388–94. <https://doi.org/10.1128/AEM.02249-09>.
- Woody, M. A., and D. O. Cliver. 1997. “Replication of Coliphage Q β as Affected by Host Cell Number, Nutrition, Competition from Insusceptible Cells and Non-RNA Coliphages.” *Journal of Applied Microbiology* 82 (4): 431–40.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00130.x>.
- World Health Organisation. 2017. *Guidance for Producing Safe Drinking-Water*. World Health Organization. . Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Geneva, Switzerland.
https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/potable-reuse-guidelines/en/.
- Worley-Morse, Thomas, Melanie Mann, Wendell Khunjar, Lola Olabode, and Raul Gonzalez. 2019. “Evaluating the Fate of Bacterial Indicators, Viral Indicators, and Viruses in Water

- Resource Recovery Facilities.” *Water Environment Research* 91 (9): 830–42.
<https://doi.org/10.1002/wer.1096>.
- Wu, J., S. C. Long, D. Das, and S. M. Dorner. 2011. “Are Microbial Indicators and Pathogens Correlated? A Statistical Analysis of 40 Years of Research.” *Journal of Water and Health* 9 (2): 265–78. <https://doi.org/10.2166/wh.2011.117>.
- Wyer, Mark D., A. Peter Wyn-Jones, David Kay, Ho Kong Christopher Au-Yeung, Rosina Gironés, Juan López-Pila, Ana Maria de Roda Husman, Saskia Rutjes, and Oliver Schneider. 2012. “Relationships between Human Adenoviruses and Faecal Indicator Organisms in European Recreational Waters.” *Water Research* 46 (13): 4130–41.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.008>.
- Yahya, M., F. Hmaied, S. Jebri, J. Jofre, and M. Hamdi. 2015. “Bacteriophages as Indicators of Human and Animal Faecal Contamination in Raw and Treated Wastewaters from Tunisia.” *Journal of Applied Microbiology* 118 (5): 1217–25.
<https://doi.org/10.1111/jam.12774>.
- Yang, Yongheng, and Mansel W Griffiths. 2014. “Enzyme Treatment Reverse Transcription-PCR to Differentiate Infectious and Inactivated f-Specific RNA Phages.” *Applied and Environmental Microbiology* 80 (11): 3334–40. <https://doi.org/10.1128/AEM.03964-13>.
- Yates, Marylynn V. 2019. “Persistence of Pathogenic Microorganisms in Fecal Wastes and Wastewater Matrices: An Introduction and Overview of Data Considerations.” In *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*, edited by Marylynn V. Yates. Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.50>.
- Yeo, Charleen, Sanghvi Kaushal, and Danson Yeo. 2020. “Enteric Involvement of Coronaviruses: Is Faecal–Oral Transmission of SARS-CoV-2 Possible?” *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30048-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30048-0).
- Zago, Miriam, Erika Scaltriti, Maria Emanuela Fornasari, Claudio Rivetti, Stefano Grolli, Giorgio Giraffa, Roberto Ramoni, and Domenico Carminati. 2012. “Epifluorescence and Atomic Force Microscopy: Two Innovative Applications for Studying Phage-Host Interactions in *Lactobacillus Helveticus*.” *Journal of Microbiological Methods* 88 (1): 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.10.006>.

- Zhang, Qijing, Orhan Sahin, Patrick F. McDermott, and Sophie Payot. 2006. "Fitness of Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* and *Salmonella*." *Microbes and Infection* 8 (7): 1972–78. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.031>.
- Zhou, Fei, Ting Yu, Ronghui Du, Guohui Fan, Ying Liu, Zhibo Liu, Jie Xiang, et al. 2020. "Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study." *The Lancet* 395 (10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).
- Zhu, Hongying, Ian M White, Jonathan D Suter, Mohammed Zourob, and Xudong Fan. 2008. "Opto-Fluidic Micro-Ring Resonator for Sensitive Label-Free Viral Detection." *Analyst* 133 (3): 356–60. <https://doi.org/10.1039/b716834a>.
- Zyara, Alyaa, Eila Torvinen, Anna-Maria Veijalainen, and Helvi Heinonen-Tanski. 2016. "The Effect of UV and Combined Chlorine/UV Treatment on Coliphages in Drinking Water Disinfection." *Water* 8 (4): 130. <https://doi.org/10.3390/w8040130>.



ANEXOS

Anexo 1: Otras publicaciones del doctorando



microorganisms



Article

Antibiotic Resistance Genes in Phage Particles from Antarctic and Mediterranean Seawater Ecosystems

Pedro Blanco-Picazo ¹, Gabriel Roscales ¹, Daniel Toribio-Avedillo ¹, Clara Gómez-Gómez ¹, Conxita Avila ² , Elisenda Ballesté ¹ , Maite Muniesa ^{1,*} and Lorena Rodríguez-Rubio ^{1,*}

¹ Department of Genetics, Microbiology and Statistics, University of Barcelona, Diagonal 643, Annex, Floor 0, 08028 Barcelona, Spain; p.blanco@ub.edu (P.B.-P.); gascheb@gmail.com (G.R.); d.toribio.avedillo@ub.edu (D.T.-A.); claragg1995@gmail.com (C.G.-G.); eballeste@ub.edu (E.B.)

² Department of Evolutionary Biology, Ecology and Environmental Sciences (BEECA), Faculty of Biology, and Biodiversity Research Institute (IrBIO), University of Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain; conxita.avila@ub.edu

* Correspondence: mmuniesa@ub.edu (M.M.); lorenarodriguez@ub.edu (L.R.-R.)

Received: 29 July 2020; Accepted: 19 August 2020; Published: 24 August 2020



Abstract: Anthropogenic activities are a key factor in the development of antibiotic resistance in bacteria, a growing problem worldwide. Nevertheless, antibiotics and resistances were being generated by bacterial communities long before their discovery by humankind, and might occur in areas without human influence. Bacteriophages are known to play a relevant role in the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environments. In this study, five ARGs (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *sul1* and *tetW*) were monitored in phage particles isolated from seawater of two different locations: (i) the Mediterranean coast, subjected to high anthropogenic pressure, and (ii) the Antarctic coast, where the anthropogenic impact is low. Although found in lower quantities, ARG-containing phage particles were more prevalent among the Antarctic than the Mediterranean seawater samples and Antarctic bacterial communities were confirmed as their source. In the Mediterranean area, ARG-containing phages from anthropogenic fecal pollution might allow ARG transmission through the food chain. ARGs were detected in phage particles isolated from fish (Mediterranean, Atlantic, farmed, and frozen), the most abundant being β -lactamases. Some of these particles were infectious in cultures of the fecal bacteria *Escherichia coli*. By serving as ARG reservoirs in marine environments, including those with low human activity, such as the Antarctic, phages could contribute to ARG transmission between bacterial communities.

Keywords: bacteriophages; shellfish; fish; transduction; ARG; horizontal gene transfer

1. Introduction

Antibiotic resistance is one of the biggest threats to public health this century. The growing environmental presence of antibiotics and their derivative metabolites is mainly due to anthropogenic activities, such as medicine, agriculture, and industry. Antibiotics have been overused both in clinical settings and the livestock industry, including for prophylaxis, although their use as growth supplements has been prohibited in Europe since 2006 (EC Regulation No. 1831/2003) [1–3]. Epidemiological studies have verified that antibiotic consumption is directly connected with the emergence and dissemination of resistances [2].

Depending on their transport and persistence in soil or water, antibiotics can spread to surface water and groundwater, exerting a selective pressure on aquatic bacteria and the microbiota of aquatic animals, and leading to the emergence of resistant bacteria and the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) [4,5].

Anexo 2: Medios de cultivo y tampones.

2.1 Medios de cultivo

Caldo LB (*Luria-Bertani*):

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o 4°C.

LB ss (semisólido):

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 7,5 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o 4°C.

LB agar:

- 10 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 10 g NaCl
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Verter en placas de Petri y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

Caldo MSB (*Modified Scholtens Broth*):

- 10 g Peptona
- 3 g Extracto de levadura
- 12 g Extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (4,14M)
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o 4°C. Ajustar el pH a 7,0-7,5 antes de su uso.

MSA ss (semisólido):

- 10 g Peptona
- 3 g Extracto de levadura
- 12 g Extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (4,14 M)
- 7,5 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o 4°C. Ajustar pH a 7,0-7,5 antes de su uso.

Para el proceso de detección de colifagos somáticos se añade antes de su uso además:

- 6 ml CaCl₂ (1M) por litro de medio.
- Antibióticos si corresponde en función de la cepa huésped de acuerdo con las concentraciones establecidas en el Anexo 2.3

Para el proceso de detección de colifagos F-específicos se añade antes de su uso además:

- 10 ml de una solución de Calcio-glucosa (Ca-Glu) por litro de medio (Anexo 2.2)

- Antibióticos si corresponde en función de la cepa huésped de acuerdo con las concentraciones establecidas en el Anexo 2.3

Para el proceso de detección de colifagos totales se añade antes de su uso además:

- 4 ml CaCl₂ (1M) por litro de medio.
- 10 ml de una solución de Ca-Glu por litro de medio (Anexo 2.2)
- 0,3 ml MgCl₂ (4,14M) por litro de medio.
- Antibióticos si corresponde en función de la cepa huésped de acuerdo con las concentraciones establecidas en el Anexo 2.3

MSA agar:

- 10 g Peptona
- 3 g Extracto de levadura
- 12 g Extracto de carne
- 3 g NaCl
- 5 ml Na₂CO₃ (15%)
- 0,3 ml MgCl₂ (4,14M)
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Ajustar pH a 7,0-7,5, verter en placas de Petri y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

Chromocult® (Merck):

- 26,5 g Chromocult™ agar
- 1 L H₂O destilada

Disolver con calor y suave agitación. Cuando el agua empiece a hervir, dejar enfriar hasta los 45-50°C y añadir el suplemento:

- 4 ml de suplemento selectivo *E. coli* /coliformes por litro.

Verter en placas de Petri y guardar las placas a 4°C.

SOB (*Super Optimal Broth*):

- 20 g Triptona

- 5 g Extracto de levadura
- 0,5 g NaCl
- 10 ml KCl (250 mM)
- 1 L H₂O destilada

Ajustar el pH a 7,0. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Añadir posteriormente:

- 5 ml MgCl₂ (2M) por litro

Guardar el medio a 4°C.

SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*):

- 20 g Triptona
- 5 g Extracto de levadura
- 0,5 g NaCl
- 10 ml KCl (250 mM)
- 1 L H₂O destilada

Ajustar el pH a 7,0. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Añadir posteriormente:

- 5 ml MgCl₂ (2M) por litro
- 20 ml de glucosa (1M) por litro

Guardar el medio a 4°C.

CFA agar (*Colonization Factor Antigen*)

- 10 g Casaminoácidos,
- 1,5 g Extracto de levadura,
- 20 g Agar bacteriológico europeo
- 1 ml de Solución de trazas (Anexo 2.2)
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Verter en placas de Petri y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

Agar MacConkey

- 20 g Peptona
- 10 g Lactosa
- 5 g Sales biliares
- 75 mg Rojo neutro
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Verter en placas de Petri y guardar las placas a temperatura ambiente o 4°C.

TYGA (*Tryptone Yeast Extract Glucose agar*)

- 10 g Triptona
- 1 g Extracto de levadura
- 8 g NaCl
- 15 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Añadir asépticamente y mezclar:

- 10 ml de una solución de Ca-Glu por litro de medio (Anexo 2.2)

Verter en placas de Petri y guardar las placas a 4°C.

Caldo TYGB

- 10 g Triptona
- 1 g Extracto de levadura
- 8 g NaCl
- 1 L H₂O destilada

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Añadir asépticamente y mezclar:

- 10 ml de una solución de Ca-Glu por litro de medio (Anexo 2.2)

Guardar el medio a 4°C

TYGAss (semisólido)

- 10 g Triptona
- 1 g Extracto de levadura
- 8 g NaCl
- 7,5 g Agar bacteriológico europeo
- 1 L H₂O destilada

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Guardar el medio a 4°C.

Para el proceso de detección de colifagos F-específicos se añade antes de su uso además:

- 10 ml de una solución de Ca-Glu por litro de medio (Anexo 2.2)
- Antibióticos si corresponde en función de la cepa huésped de acuerdo con las concentraciones establecidas en el Anexo 2.3

Para el proceso de detección de colifagos totales se añade antes de su uso además:

- 10 ml de una solución de Ca-Glu por litro de medio (Anexo 2.2)
- 4 ml CaCl₂ (1M) por litro de medio.
- 0,3 ml MgCl₂ (4,14M) por litro de medio.
- Antibióticos si corresponde en función de la cepa huésped de acuerdo con las concentraciones establecidas en el Anexo 2.3

BGM/BPGM (*Bluephage Growth Medium*)

La composición de este medio es una versión modificada de la composición del medio MSB descrito en este apartado en la que debe añadirse adicionalmente antes de su uso para incubar la cepa:

- 10 ml Arabinosa (5%) por litro de medio

BTM/BPTM (*Bluephage Test Medium*)

La composición de este medio es una versión modificada de la composición del medio MSB descrito en este apartado en la que debe añadirse adicionalmente antes de su uso para incubar la cepa:

- 10 ml Arabinosa (5%) por litro de medio

- 41,7 ml Glicerol (870 g/L) por litro de medio
- 4 ml CaCl₂ (1M) por litro de medio
- 83,3 ml X-Glu (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico) (1 mg/ml) por litro de medio

2.2. Tampones y disoluciones

PBS (Phosphate Buffered Saline):

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 0,2 g KH₂PO₄
- 1,15 g Na₂HPO₄ · 7 H₂O
- 1 L H₂O bidestilada

Ajustar el pH a 7,1-7,2. Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente.

Tampón de fagos:

- 3,5 g Na₂HPO₄
- 1,5 g KH₂PO₄
- 2,5 g NaCl
- 0,5 L de H₂O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min. Posteriormente tras su enfriamiento suplementar de manera aséptica con:

- 5 ml MgSO₄ (0,1M) por cada 0,5 L de tampón
- 5 ml CaCl₂ (0,01M) por cada 0,5 L de tampón

Guardar a temperatura ambiente

TBE (Tris Boric EDTA Buffer) 10X:

- 109 g Tris base
- 55,6 g Ácido bórico
- 9,2 g EDTA
- 1 L H₂O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente.

TBE 1X:

- 100 ml TBE 10X
- 900 ml H₂O bidestilada estéril

Guardar a temperatura ambiente.

Gel de agarosa 1,5%:

- 150 ml TBE 1X
- 2,25 g Agarosa

Dependiendo del tamaño del fragmento de ADN se puede variar el porcentaje de agarosa (0,8%, 1%, 2%...). Calentar en el microondas y agitar varias veces durante el calentamiento evitando la ebullición para la correcta disolución de la agarosa.

Bromuro de etidio:

- 200 µl de solución (1% en p/v) de bromuro de etidio (Merck®)
- 1 L H₂O bidestilada

Guardar a 4 °C.

Etanol 70%:

- 70 ml Etanol (100%)
- 30 ml H₂O bidestilada estéril

Guardar a temperatura ambiente sin esterilizar.

Molibdato de amonio al 2%:

- 0,2 mg de molibdato de amonio
- 10 ml H₂O bidestilada estéril

Ajustar a pH 7,0. Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Agitar y guardar a 4°C en oscuridad.

Glicerol (870 g/l)

- 69 ml Glicerol (1261 g/l)
- 31 ml H₂O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente en oscuridad.

Solución de trazas para el CFA

- 5,114 g MgSO₄·7 H₂O
- 0,393 g MnCl₂·4 H₂O
- 50 ml H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a temperatura ambiente.

Solución de cloruro de calcio CaCl₂ (1M)

- 14,6 g CaCl₂·2H₂O
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a 4°C en oscuridad.

Solución de Calcio- Glucosa (Ca-Glu)

- 3 g CaCl₂·2 H₂O
- 10 g Glucosa
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a 4°C en oscuridad.

Solución stock de Na₂CO₃ (15%):

- 15 g Na₂CO₃
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a temperatura ambiente en oscuridad.

Solución stock de Arabinosa (5%):

- 5 g Arabinosa
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a 4°C.

Solución stock de X-Glu (1 mg/ml):

- 100 mg X-Glu (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico)
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a 4°C en oscuridad.

Solución stock de MgCl₂ (4,14M):

- 39,41 g MgCl₂
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o a 4°C.

Solución stock de MgCl₂ (2M):

- 19,04 g MgCl₂
- 100 ml H₂O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar a temperatura ambiente o a 4°C.

Solución para la extracción de fagos de moluscos.

- 12 g de extracto de carne
- 400 ml de tampón de borato (0,01M)

Ajustar pH a 9,5 y esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a temperatura ambiente.

Naranja de acridina:

- 5 mg Naranja de acridina (2,8-bis-dimetilaminoacridina)
- 10 ml H₂O bidestilada

Esterilizar mediante autoclave a 121°C durante 15 min y guardar en oscuridad a -20°C.

Acetato de uranilo (2%)

- 2 g Acetato de uranilo
- 100 ml de H₂O bidestilada

Esterilizar por filtración través de filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm con alta afinidad proteica. Guardar a 4°C en oscuridad.

2.3 Antibióticos empleados en los estudios

| Antibiótico | Concentraciones finales usadas (µg/ml) |
|--------------------|---|
| Ácido nalidíxico | 400-1000 |
| Ampicilina | 100 |
| Bacitracina | 70 |
| Kanamicina | 50 |
| Tetraciclina | 10 |

Anexo 3: Protocolos realizados

3.1 Ensayo de *Bluephage* estándar en tubos de 10 ml de volumen total

- 1) Realizar un cultivo O/N a 37°C de la cepa huésped correspondiente al tipo de colifagos que se desea detectar (CB10 si son somáticos, CB12 si totales, CB14 si F-específicos) en el medio BGM.
- 2) Resuspender diluyendo 1:10 del O/N en nuevo medio de cultivo BGM para el crecimiento de la cepa huésped hasta la fase exponencial. Incubación del medio a 37°C con agitación en el caso de CB10 y CB12 o sin agitación en el caso de CB14.
- 3) Preparar tubos con el medio BTM para el análisis de muestras. Se prepararan 3 réplicas con 3 diluciones por cada muestra que se desee analizar. También se añade un control negativo con BTM y la cepa para asegurar el correcto funcionamiento del método.
- 4) Filtrar la muestra a través de filtros de membrana de baja adsorción proteica con un diámetro de poro de 0,22 µm. Dilución seriada de las muestras e inclusión en los tubos preparados con BTM (0,5 ml de muestra por tubo).
- 5) Añadir al tubo el cultivo de la cepa bacteriana huésped cuando alcance la fase exponencial (0,5 ml de bacteria por tubo de BTM)
- 6) Monitorizar el cambio de color de los tubos durante su incubación estática a 37°C durante al menos 5 horas para determinar las muestras positivas. Para comprobar que el método funciona, esperar al cambio de color del control negativo como consecuencia de la lisis espontanea de las células huéspedes.
- 7) Para mayor comprobación, realizar el test de la gota (*spot test*) con las muestras positivas al final del ensayo para comprobar que el cambio de color es debido a la presencia de colifagos en la muestra analizada.

3.2 Titulación de colifagos mediante el método de la doble capa de agar (DAL) (ISO 10705):

El método DAL nos permite obtener datos de manera rápida y sencilla respecto a la cantidad de fagos presente en una muestra. Los pasos a seguir son los siguientes:

- 1) Filtrar la muestra a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro de baja adsorción proteica.
- 2) Inocular la cepa huésped en medio de MSB. Incubar a 37°C en agitación.
- 3) Fundir, añadir los aditivos correspondientes al MSAss en función del tipo de colifago que se quiere detectar (Anexo 2.2), dispensar 2,5 ml en tubos de 10 ml (hacer tantos tubos como sea necesario) y colocarlos en el baño previamente calentado a 45°C. Rotular las placas de MSA agar y comprobar que están bien secas. Recomendable preparar material para hacer al menos 3 réplicas por cada dilución de muestra analizada.
- 4) Una vez el cultivo de la cepa se encuentre en fase exponencial de crecimiento (DO_{600nm} entre 0,3 y 0,5) proceder a la titulación.
- 5) Añadir 1 ml de la muestra y 1 ml de la cepa en cada tubo de 10 ml con los 2,5 ml de MSAss.
- 6) Agitar y verter sobre la placa de MSA agar correspondiente. Repartirlo sobre toda la placa de manera homogénea y dejar enfriar sobre una superficie fría y llana.
- 7) Realizar también un control de cepa (2,5 ml de MSAss y 1 ml del cultivo), un control del MSAss (2,5 ml de MSAss) y, en caso de haber hecho diluciones, un control del PBS o Ringer ¼ (2,5 ml de MSAss y 1 ml del tampón).
- 8) Una vez solidificadas las capas de semisólido, se incuban las placas a 37°C O/N.
- 9) Contar el número de calvas observadas por cada placa (UFP/ml).

3.3 Test de la gota para detección de colifagos (ISO 10705)

El test de la gota tiene como finalidad determinar si los fagos presentes en una muestra son infectivos. Permite una evaluación cualitativa, no permite cuantificarlos.

- 1) Crecer la cepa huésped en caldo LB a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO de 0.3-0.5, para que esté en fase de crecimiento exponencial.
- 2) Añadir en un tubo 1 ml de bacteria + 2.5 ml de LB semisólido (LBss) (previamente fundido ya a 55°C), se agita suavemente evitando la formación de burbujas y se vierte en una placa de LB agar.
- 3) Esperar hasta que el agar LBss esté solidificado y entonces se pone una gota de 10 µl de la suspensión fágica sobre éste. Se espera 10 min para que la gota se absorba y se incuba O/N a 37°C con la superficie semisólida hacia arriba.
- 4) En caso de haber infección se observará halo de lisis, en caso de que no la haya, el crecimiento confluyente del césped bacteriano.

3.4 Curva de crecimiento de cultivos bacterianos

- 1) Inocular en medio líquido la cepa de análisis. Si proviene de un stock congelado, añadir una dilución 1:100 (Ej.: 50 µl en 5 ml), si proviene de una placa, disolver un par de colonias en el volumen deseado.
- 2) Incubar a la temperatura apropiada para el crecimiento (37°C habitualmente) durante el tiempo necesario para que se observen las diferentes fases del crecimiento.
- 3) Realizar mediciones de densidad óptica (DO₆₀₀) mediante un espectrofotómetro en intervalos constantes de tiempo observando las fases de crecimiento en función de la densidad óptica y el tiempo.
- 4) En paralelo, tomar alícuotas de cada punto de medición de la densidad óptica y diluirlas de manera apropiada para su siembra por extensión en placa con el objetivo de calcular la cantidad y viabilidad de las cepas a diferentes medidas de densidades ópticas, de manera que se pueda establecer una relación fija entre ambas.

Se deben realizar múltiples réplicas del experimento para asegurar que los resultados son correctos y poder valorar de manera apropiada la velocidad de crecimiento de una cepa bacteriana.

3.5 Conjugación de plásmidos F entre cepas de *E. coli*

1. Crecer la cepa donadora que contiene el plásmido F y de la cepa receptora de *E. coli* en medio LB suplementado con los antibióticos necesarios para su selección de cada una de ella por separado. Incubación O/N del cultivo líquido de las cepas a 37°C.
2. Preparar de placas de LB agar suplementados con todos los antibióticos requeridos para el crecimiento de ambas cepas, donadora y receptora.
3. Sembrar la cepa donadora en media placa mediante estrías escocesas. Después, sembrar comenzando en la dirección opuesta con la cepa receptora en la misma placa, comenzando en el centro donde entra en contacto con la cepa donadora. Incubar a 37°C O/N.
4. Las colonias capaces de crecer en este medio suplementado con ambos antibióticos (a los cuales resisten la cepa donadora o la cepa receptora) son las colonias transconjugantes, en las que se ha producido la conjugación del plásmido F. Seleccionar varias colonias crecidas y analizar mediante PCR la presencia del plásmido F.

3.6 Método de Miles-Misra-Irwin para evaluar crecimiento bacteriano en medios con diferentes composiciones

- 1) Preparar el medio que se quiere evaluar y el medio control frente al que se quiere evaluar el crecimiento de la cepa.
- 2) Crecer hasta fase exponencial ($DO_{600} = 0,3-0,5$) la bacteria cuyo crecimiento se desea evaluar en estos medios.
- 3) Realizar diluciones seriadas decimales del cultivo bacteriano en una disolución tampón (Ej.: PBS).

- 4) Depositar una gota de 10 μ l de cada una de las diluciones del cultivo en una placa de agar del medio de ensayo. El ensayo se debe realizar con al menos 5 réplicas y con 6 diluciones (normalmente desde la -2 a la -7). Realizar lo mismo para el medio control
- 5) Incubar las placas del medio a 37°C O/N.
- 6) Contar las colonias observadas en cada gota donde es posible y calcular las UFC/ml estimadas en función de las diluciones crecidas.

3.7 Extracción de fagos de muestras de lodos

- 1) Mezclar las muestras en proporciones 1:10 (p/v) con PBS (pH=7,4) (o alternativamente en una dilución de extracto de carne al 10% (pH 7.2)) y homogeneización mediante agitación magnética durante 30 min a temperatura ambiente.
- 2) Centrifugar a una velocidad de 10000xg durante 30 min a 4°C.
- 3) Filtrar del sobrenadante a través de filtros de membrana de baja adsorción proteica con tamaños de poro de 0,22 μ m.

3.8 Extracción de fagos de muestras de marisco y pescado

- 1) Pesar 10 g mínimo de la carne de la muestra de marisco o 50 g pescado y diluirlos en 50 ml de tampón de fagos que se debe homogeneizar mediante Stomacher durante 5 min.
- 2) Eluir las partículas fágicas en 100 ml del homogenado mediante agitación magnética durante 15 min en 400 ml de tampón de borato (0,01M) con extracto de carne 3 % (pH: 9,5).
- 3) Neutralizar a pH: 7,2 y clarificar el homogenado tratado mediante centrifugación a 25000 x g durante 15 min a 4°C.

Filtrar el sobrenadante a través de filtros de membrana de baja adsorción proteica con tamaños de poro de 0,22 μ m.

3.9 Preparación de muestras bacterianas para la observación de pili en MET (Microscopio Electrónico de Transmisión)

- 1) Crecer las bacterias en placas de medio CFA para estimular la formación de fimbrias y flagelos. Crecer O/N a 37°C.
- 2) Resuspender una/ un par de las colonias crecidas en CFA en 50 µl H₂O bd.
- 3) Usar rejillas de cobre/níquel de 200 mesh recubiertas con una película de formvar al 5% con recubrimiento de carbón (preparadas en los Servicios Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona). Irradiarlas durante 15 minutos con luz ultravioleta (opcional), con la finalidad de que haya una mejor extensión de la muestra sobre la rejilla. Se utilizarán 2 rejillas por bacteria mínimo.
- 4) Depositar 10 µl de la de la resuspensión bacteriana sobre la cara recubierta con formvar de cada rejilla activada, colocadas sobre la cara limpia de un trozo de Parafilm®, Incubar durante 15 minutos. Para evitar que las gotas se evaporen es posible tapar las rejillas con una placa Petri o algo similar. Secar con papel de filtro al final del proceso de incubación.
- 5) Depositar sobre una tira de parafilm 2 gotas de H₂O bd por cada rejilla empleada. Lavar las rejillas depositando la cara recubierta con el formvar sobre una de las gotas de agua durante 1 minuto. Secar y repetir el proceso en la otra gota.
- 6) Tras el lavado, una de las rejillas se incubará bocabajo sobre una gota de acetato de uranilo 2% durante 1 minuto y la segunda rejilla durante 2 minutos sobre otra gota de acetato de uranilo 2%. Eliminar el exceso de líquido con ayuda de un trozo de papel de filtro.
- 7) Dejar secar la rejilla sobre papel filtro dentro de una placa de Petri a temperatura ambiente O/N (tiempo mínimo de secado antes de observar la rejilla en el microscopio electrónico). Es posible secar y conservar las rejillas en una cámara de desecación con humedad controlada (en el servicio de microscopia).
- 8) La observación se hace en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 (JEOL USA, Inc. Peabody, MA, USA) operando a 100 kV entre 10000-60000 X.

3.10 Preparación de muestras de fagos para microscopía electrónica (MET)

- 1) Usar rejillas de cobre/níquel de 200 mesh recubiertas con una película de formvar al 5% con recubrimiento de carbón (preparadas en los Servicios Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona). Irradiar durante 5 minutos con luz ultravioleta (opcional), con la finalidad de que haya una mejor extensión de la muestra sobre la rejilla.
- 2) Depositar 10 µl de la muestra sobre la cara limpia de un trozo de Parafilm®, 3 gotas (10 µl cada una) de agua bidestilada estéril y 1 gota (10 µl) de molibdato de amonio al 2% (p/v) a pH 7,0.
- 3) Contactar la rejilla con la muestra por la parte donde se encuentra la membrana de formvar durante 1 minuto.
- 4) Lavar pasando la rejilla sobre las 3 gotas de agua bidestilada estéril durante un tiempo total de 1 minuto.
- 5) Poner la rejilla en contacto con el agente de tinción (Molibdato de amonio al 2% pH: 6,8.) durante 1-1,5 minutos. Eliminar el exceso de líquido con ayuda de un trozo de papel de filtro.
- 6) Dejar secar la rejilla sobre papel filtro dentro de una placa de Petri a temperatura ambiente O/N (tiempo mínimo de secado antes de observar la rejilla en el microscopio electrónico). Es posible secar y conservar las rejillas en una cámara de desecación con humedad controlada (en el servicio de microscopía).
- 7) La observación se hace en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 (JEOL USA, Inc. Peabody, MA, USA) operando a 100 kv entre 60000-150000 X.

3.11 Transformación de células competentes por electroporación (*E. coli* DH5α)

El protocolo de transformación de células mediante electroporación incluye los siguientes pasos:

- 1) Inocular 2 ml de un cultivo O/N de la cepa *E. coli* DH5α en 20 ml de caldo LB e incubar a 37°C en agitación hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,3-0,5$ (fase exponencial).

- 2) Una vez alcanzada la $DO_{600}=0,3-0,5$, detener el crecimiento dejando el cultivo 10 minutos en hielo.
- 3) Centrifugar a una velocidad de $2000 \times g$ durante 10 minutos a $4^{\circ}C$.
- 4) Decantar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 500 μl de agua bidestilada estéril fría y transferir a un microtubo de 1,5 ml. A partir de este paso, mantener las células y el agua en hielo.
- 5) Hacer un pulso de centrifuga a las células, descartar el sobrenadante y volver a resuspender en 500 μl de agua bidestilada estéril fría. Repetir el paso de lavado entre 6-8 veces para remover las sales presentes en el cultivo.
- 6) Tras el último lavado, resuspender el precipitado en 100 μl de agua bidestilada estéril fría.
- 7) Añadir 10 μl del ADN que se desee incorporar y mezclar suavemente con la pipeta.
- 8) Transferir todo el volumen a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (previamente mantenida en hielo) y electroporar las células competentes a 2 kV, capacitancia 25 F y resistencia 200 Ω .
- 9) Recuperar el volumen de la cubeta e inocularlo en 3 ml de caldo LB. Incubar en estático a $37^{\circ}C$ durante 2-3 horas (mínimo de 1 hora).
- 10) Sembrar 100 μl del cultivo en placas de LB con el antibiótico correspondiente en concentración a la mitad de la normal (Por ejemplo, ampicilina (50 $\mu g/ml$) en el caso del vector pGEM®-T Easy cuyo marcador de selección es un gen de resistencia a ampicilina) e incubar O/N a $37^{\circ}C$.
- 11) Resembrar las colonias obtenidas en placas de LB con el antibiótico correspondiente a su concentración habitual (Amp 100 $\mu g/ml$ en el caso de este plásmido) e incubar O/N a $37^{\circ}C$. Las colonias que crezcan en las placas con antibióticos han incorporado potencialmente el vector con el fragmento insertado. Verificar la presencia del vector recombinante y la orientación del inserto por PCR usando los cebadores del fragmento de interés.

3.12 Recombinación génica mediante el sistema Red recombinasa de un gen en una *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pkD46

- 1) Realizar un cultivo O/N a 30°C de *E. coli* DH5 α + pkD46 en SOB suplementado con Amp100 y arabinosa 10 mM (al 0,05%) para activar la producción de recombinasa.
- 2) Diluir 1/10 del cultivo O/N en 50 mL (distribuidos en 2 falcons de 25 ml cuyos precipitados se unirán luego) de SOB + arabinosa 10 mM (0,05%) e incubar a 30° C. Se puede añadir Amp50 para favorecer la selección del pkD46.
- 3) Una vez que el cultivo llega a fase exponencial (DO: 0,5), parar el crecimiento en hielo durante 10 minutos.
- 4) Centrifugar a 2500 rpm a 4°C durante 10-15 min. Unir los precipitados de ambos falcons y resuspender el precipitado en 400 μ l de H₂O bd estéril fría. Pasar el volumen a un tubo de microcentrífuga. A partir de aquí, las células y el agua han de estar siempre en hielo.
- 5) Realizar el protocolo de electroporación. Añadir a los 100 μ l de células 30-40 μ l del inserto con el gen de resistencia apropiado (No puede ser ampicilina dado que es el marcador de selección del pkD46).
- 6) Incubar en 3 ml de SOC a 30°C en estático durante 2,5-3 horas las células con el material genético incorporado.
- 7) Sembrar 100 μ l en placas de LB + antibiótico en función del marcador de selección del inserto e incubar durante 18 h a 37°C.
- 8) Confirmar por PCR la presencia de los fragmentos introducidos en las colonias.

3.13 Clonaje en vectores pBAD-TOPO[®] (Invitrogen[™]) y transformación mediante electroporación con dicho plásmido

El protocolo descrito por la casa comercial se indica a continuación:

- 1) Preparar la siguiente mezcla de ligación de componentes para cepas de *E. coli* electrocompetentes:

| Componente | Volumen por reacción (μ l) |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Producto de PCR | 0,5-4 |
| Solución salina diluida (1:4) | 1 |
| H2O estéril | Añadir hasta volumen de 5 |
| Vector TOPO r | 1 |
| Volumen final | 6 |

- 2) Mezclar suavemente la reacción e incubarla a temperatura ambiente durante 5 min (22-23 °C). Colocar la reacción en hielo mientras se preparan el resto de materiales para la transformación.
- 3) Añadir 2 μ l de la reacción de clonaje en un tubo de microcentrífuga estéril que contiene 50 μ l de células electrocompetentes de *E. coli* y mezclar suavemente (sin pipetear, para evitar formación de burbujas). Transferir las células a una cubeta de electroporación de 0,1 cm.
- 4) Electroporar la mezcla de reacción con las células bacterianas electrocompetentes.
- 5) Añadir 250 μ l de medio SOC a temperatura ambiente. Transferir la solución a falcons de 15 ml y agitar a 37°C durante 1 hora.
- 6) Extender entre 10-50 μ l de cada transformación en placas selectivas de medio e incubar O/N a 37°C. Recomendable hacer al menos dos volúmenes diferentes para asegurar la correcta separación de las colonias. Analizar las colonias mediante PCR para comprobar la correcta inserción y orientación

3.14 Reacción de PCR convencional:

Para las reacciones de PCR se utilizó de manera habitual la siguiente mezcla:

| Componente | Volumen por reacción (μ l) |
|---|---------------------------------|
| Polimerasa (<i>Dream Taq Green PCRMaster Mix</i> , Fermentas®) | 12,5 |
| Cebador Up (30 μ M) | 0,5 |
| Cebador Lp (30 μ M) | 0,5 |
| H ₂ O bidestilada estéril | 10,5 |
| ADN | 1 |
| Volumen final | 25 |

Los tiempos y temperaturas de los programas fueron seleccionados en función de las características de los cebadores y la longitud del fragmento de ADN analizado (30s por cada 500 pares de bases). Los cebadores empleados se encuentran descritos en el Anexo 5.

3.15 Secuenciación Sanger de muestras “premixed”:

Para este protocolo de secuenciación han de llevarse a cabo los siguientes pasos:

- 1) Mezclar el ADN que se desea analizar (100 ng por 1 kb de ADN molde) con el cebador (3,2 - 5 pmoles, siendo μ M equivalente a pmol/ μ l) en un tubo de PCR.
- 2) Dejar el tubo abierto y secar en un termociclador a 80°C hasta la total evaporación de la muestra.
- 3) Tapar las muestras desecadas y guardar a 4°C hasta su procesamiento por el servicio científico técnico de la UB (CCIT UB).

3.16 Extracción y purificación de plásmidos (PureLink® Hipure Plasmid Midiprep kit, Invitrogen)

Para la extracción y purificación del plásmido se siguieron las instrucciones del fabricante del kit que se indican a continuación:

- 1) Añadir 10 ml del tampón EQ1 (“*Equilibration Buffer*”) a la columna Midi. Dejar que el tampón atraviese la columna por gravedad.
- 2) Centrifugar 50 ml del cultivo en fase estacionaria (tras el crecimiento *overnight* (O/N) en agitación a 37°C o a 30°C en el caso del vector pKD46) a una velocidad de 3000xg durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
- 3) Añadir 4 ml del tampón R3 (“*Resuspension Buffer*”) al precipitado bacteriano y resuspender adecuadamente.
- 4) Añadir 4 ml del tampón L7 (“*Lysis Buffer*”) y mezclar invirtiendo el tubo 5 veces. No agitar. Dejar el tubo a temperatura ambiente 5 minutos.
- 5) Añadir 4 ml del tampón N3 (“*Precipitation Buffer*”). Invertir el tubo hasta que la mezcla sea homogénea. No agitar.
- 6) Centrifugar el lisado a una velocidad de 12000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Echar el sobrenadante en la columna equilibrada anteriormente. Dejar que atraviese la columna por gravedad.
- 8) Añadir 10 ml del tampón W8 (“*Wash Buffer*”). Descartar todo el tampón que atraviese la columna. Realizar el proceso 2 veces en la columna. Cambiar la columna a un nuevo tubo estéril.
- 9) Añadir 5 ml del tampón E4 (“*Elution Buffer*”) a la columna. La solución que atraviese la columna por gravedad llevará el ADN del plásmido que estamos extrayendo.
- 10) Descartar la columna y añadir 3,5 ml de isopropanol a la solución con el ADN plasmídico. Mezclar bien.
- 11) Centrifugar a una velocidad de 12000xg durante 30 minutos a 4°C.
- 12) Descartar el sobrenadante y añadir 3 ml de etanol 70% al precipitado.

- 13) Volver a centrifugar a una velocidad de 12000xg 5 minutos a 4°C. Descartar con cuidado el sobrenadante.
- 14) Dejar secar el precipitado de ADN y resuspender bien con 100 o 200 µl de tampón TE “*Elution Buffer*”. Conservar el ADN plasmídico a -20°C. Es posible cuantificar la concentración del plásmido extraído usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies. Thermo Scientific, Wilmington, USA).

3.17 Purificación de amplímeros de PCR a partir de una banda visualizada en el gel de agarosa (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen):

Recomendado cuando en el gel de agarosa se observa, además de la banda que se quiere amplificar, otras bandas tenues inespecíficas. Las instrucciones descritas en el kit se indican a continuación:

- 1) Recortar el fragmento de gel donde se localiza la banda que queremos purificar, con ayuda de una lámpara de emisión de luz UV y usando un bisturí estéril.
- 2) Pesar el fragmento y añadir 3 volúmenes de tampón QG por cada volumen de gel (100 mg gel ~ 100 µl).
- 3) Incubar a 55°C hasta que se disuelva el gel (10-15 min), agitar con suavidad cada 3-4 minutos para facilitar la disolución. Comprobar que el color de la solución es amarillo. Si el color observado es morado o naranja, añadir 10 µl de acetato sódico 3M (pH=5,0).
- 4) Preparar la columna QIAquick.
- 5) Añadir la muestra en la columna y centrifugar 1 min a 11000xg. Nota: el volumen máximo de la columna son 700 µl. Si hay más muestra, ir descartando el sobrenadante, e ir centrifugando de nuevo más muestra hasta que se acabe (no usar la misma columna más de 3 veces, el filtro podría saturarse).
- 6) Descartar el sobrenadante y volver a colocar la columna en el mismo tubo.
 - a. Opcional: si el objetivo es la secuenciación de la muestra, añadir 500 µl de tampón QG y centrifugar 1 min a 11000xg, eliminando así las trazas de agarosa que pudieran haber permanecido.

- 7) Para lavar la muestra, añadir 750 µl de tampón PE, incubar 2-5 min y centrifugar 1 min a 11000 x g.
- 8) Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna 1 min adicional para descartar el tampón residual.
- 9) Poner la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga, descartando el tubo anterior y añadir 30-50 µl de tampón EB y centrifugar 1 min a 11000 x g. El ADN se encuentra ahora en el tubo de microcentrífuga. Guardar a -20°C.

3.18 Purificación de amplímeros de PCR a partir del tubo de reacción (QIAquick® PCR Purification Kit, QIAGEN):

Recomendado para purificar amplímeros de PCR cuando en el gel de agarosa se ha observado una única banda de amplificación. Las instrucciones descritas en el kit se indican a continuación:

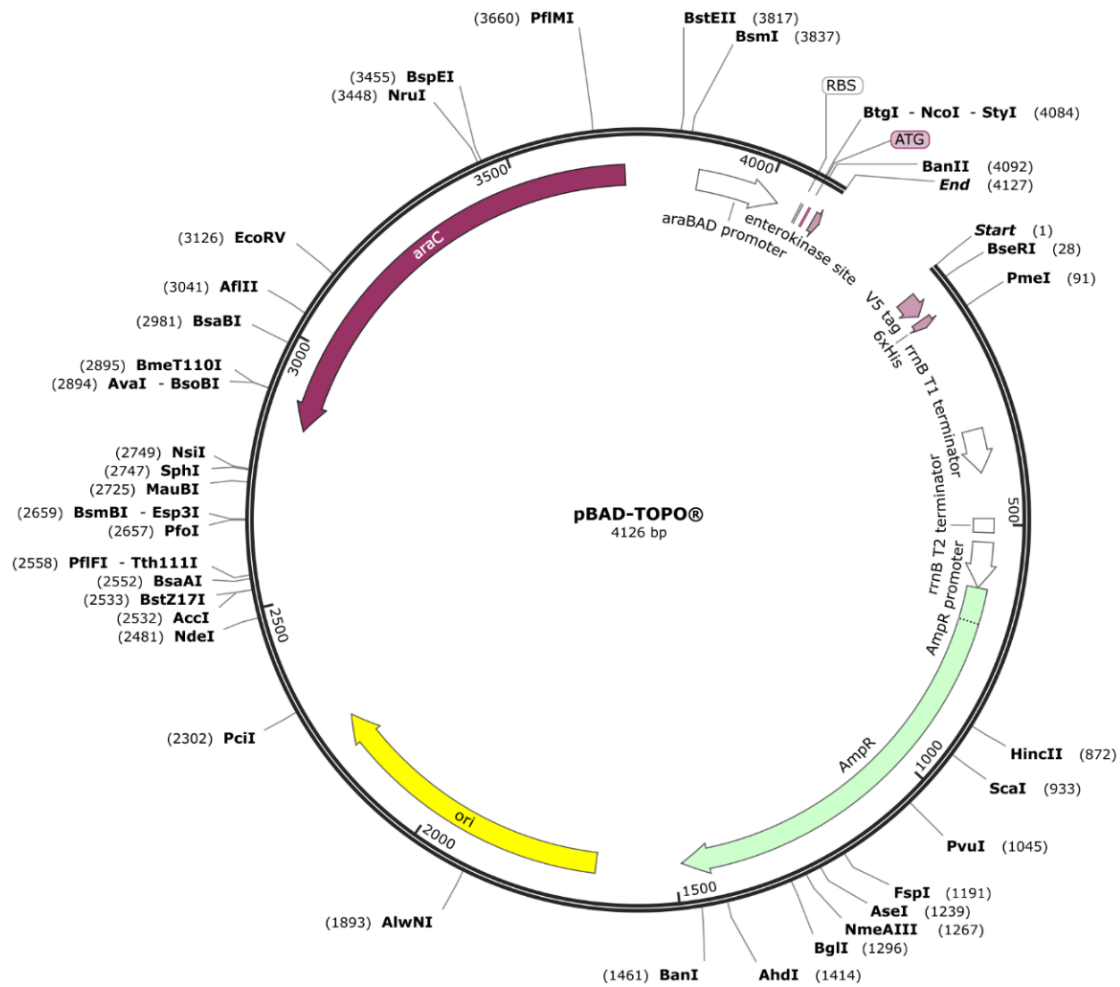
- 1) Mezclar 5 volúmenes de tampón PB en 1 volumen de la mezcla de reacción de PCR conteniendo el amplímero y añadir la mezcla en la columna QIAquick. A partir de este punto, se sigue el mismo protocolo que para la purificación de bandas de geles.
- 2) Añadir la muestra en la columna y centrifugar 1 min a 11000xg. Nota: el volumen máximo de la columna son 700 µl. Si hay más muestra, ir descartando el sobrenadante, e ir centrifugando de nuevo más muestra hasta que se acabe (no usar la misma columna más de 3 veces, el filtro podría saturarse).
- 3) Descartar el sobrenadante y volver a colocar la columna en el mismo tubo.
- 4) Opcional: si el objetivo es la secuenciación de la muestra, añadir 500 µl de tampón QG y centrifugar 1 min a 11000xg, eliminando así las trazas de agarosa.
- 5) Para lavar la muestra, añadir 750 µl de tampón PE, incubar durante 2-5 min y centrifugar 1 min a 11000xg.
- 6) Descartar el sobrenadante y centrifugar la columna 1 min adicional para descartar el tampón residual.

- 7) Poner la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga, descartando el tubo anterior y añadir 30-50 μ l de EB y centrifugar 1 min a 11000xg. El ADN se encuentra ahora en el tubo de microcentrífuga. Guardar a -20°C.

Anexo 4: Plásmidos

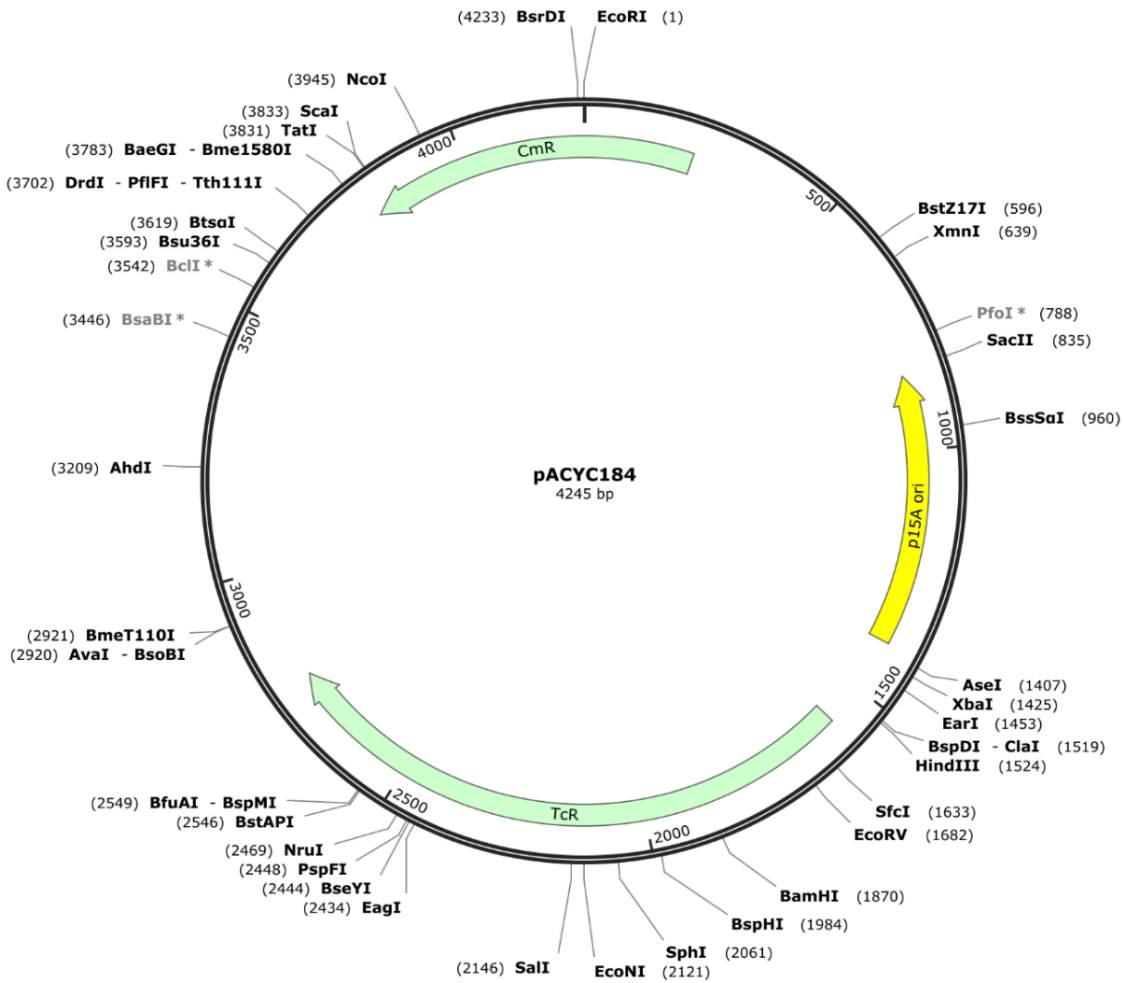
- Plásmido pBAD-TOPO:

Empleado para la sobreexpresión del gen uidA, codificante de la β -glucuronidasa, introducido en las cepas desarrolladas para el método Bluephage.



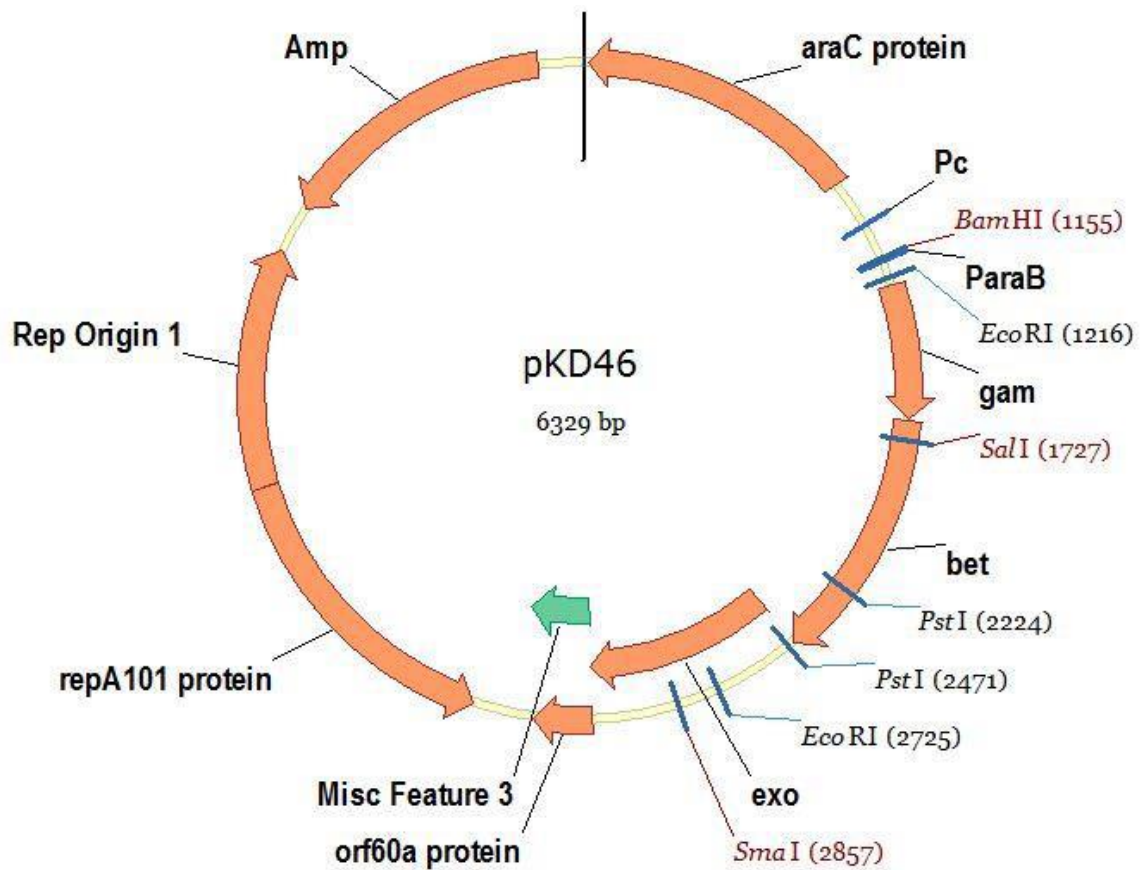
- Plásmido pACYC184

Utilizado para la obtención del gen de resistencia a tetraciclina empleado en la construcción *uidB-tetR-uidC* para la sustitución de los genes codificantes de transportadores de glucurónidos al interior celular de las cepas huéspedes desarrolladas para el método *Bluephage*.



- Plásmido pkD46

Utilizado para la recombinación en el cromosoma bacteriano de la construcción *uidB-tetR-uidC* para la sustitución de los genes codificantes de transportadores de glucurónidos al interior celular de las cepas huéspedes desarrolladas para el método *Bluephage*.



Anexo 5: Cebadores de PCR

| Gen | Cebador | Secuencia (5' a 3') | Tamaño (pb) | Referencia |
|---|------------------------|---|----------------|--------------------------------------|
| pKD46 (Red recombinasa) | RR46Up RR46Lp | GAGCTCTAAGGAGGTTAT GTGCAGTACTCATTCGTT | 458 | Serra- Moreno et al., 2008 |
| <i>tet</i> | Tc-5 Tc-3 | TCAGCCCCATACGATATAAG TGGAGTGGTGAATCCGTTAG | 1200 | Serra- Moreno et al., 2006 |
| <i>kan</i> | Kana-5 Kana-3 | GTCAGCGTAATGCTCTGC GTCTGCTTACATAAACAG | 1000 | Serra- Moreno et al., 2008 |
| <i>uidA</i> | uidA-For2 uidA-Rev2 | CTTAATGAGGAGTCCCTT CCAGGAGAGTTGTTGATT | 2000 | Muniesa et al. 2018 |
| Región de <i>uidB</i> y <i>uidC</i> (sin interrumpir/ interrumpida por <i>tetR</i>) | uidB-up uidC-lp | CTGGACTGGCATGAACTTC ACTTCAGCATAAAGTCATACT | 2700/1800 | Muniesa et al. 2018 |
| Solapamiento de la región <i>uidBC</i> con <i>tet</i> | uidB-Tc5 uidC-Tc3 | <u>CTTATATCGTATGGGGCTGACAC</u> <u>TGTCCACCACTCGTCCG</u> <u>CTAACGGATTCACCACTCCAACG</u> CTGACATTTGCACCGAT | 1800 | Muniesa et al. 2018 |
| Plásmido pBAD con <i>uidA</i> /sin <i>uidA</i> | pBADf pBADr | ATGCCATAGCATTTTTTATCC GATTTAATCTGTATCAGG | 2300/300 | Invitrogen |
| Derivado del plásmido F pOX38Km | Fkm-up Fkm-lp | AACATGCGAAACGCTATGCC AGCCGTTTTTCGTGTGTGTTG | 425 | Toribio - Avedillo et al. 2019 |

Referencias

- Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J. P., Jofre, J., & Muniesa, M. (2006). Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC molecular biology*, 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-31>
- Serra-Moreno, R., Jofre, J., & Muniesa, M. (2008). The CI repressors of Shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of Shiga toxin 2. *Journal of bacteriology*, 190(13), 4722–4735. <https://doi.org/10.1128/JB.00069-08>

- Muniesa, M., Ballesté, E., Imamovic, L., Pascual-Benito, M., Toribio-Avedillo, D., Lucena, F., Blanch, A. R., & Jofre, J. (2018). Bluephage: A rapid method for the detection of somatic coliphages used as indicators of fecal pollution in water. *Water research*, 128, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.030>
- Toribio-Avedillo, D., Martín-Díaz, J., 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. *The Science of the total environment*, 655, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.198>