

ELS BACTERIÒFAGS COM A EINA EN LA MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

JOAN JOFRE

Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: Joan Jofre. Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.
Adreça electrònica: jjofre@ub.edu.

RESUM

Molta informació adquirida sobre bacteriòfags en els períodes inicials de desenvolupament de la genètica molecular és utilitzada actualment per a aspectes aplicats, sense cap relació amb els objectius dels estudis inicials. Per exemple, alguns bacteriòfags que infecten bacteris comensals al tub digestiu són emprats en aspectes relacionats amb la determinació de la qualitat de l'aigua. D'una banda, els bacteriòfags que infecten *Escherichia coli* a través de la paret cel·lular (colífags somàtics), els bacteriòfags que infecten *E. coli* a través dels pèls sexuals (bacteriòfags RNA *F*-específics) i els bacteriòfags que infecten *Bacteroides* spp., que són utilitzats com a indicadors de virus humans en l'aigua; d'una altra banda, els bacteriòfags que infecten diferents soques de *Bacteroides* són una eina molt útil per detectar l'origen de la contaminació fecal.

Paraules clau: aigua, bacteriòfag, contaminació, fecal, indicador.

BACTERIOPHAGES AS A TOOL IN ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY

SUMMARY

It is described how information on bacteriophages accumulated during the early studies of molecular genetics are now applied for purposes without any relationship with the objectives pursued in those first studies. It is portrayed how some bacteriophages that infect bacteria that live in the gut are used for different purposes related to water quality determination. In one side, the bacteriophages infecting *Escherichia coli* through the cell wall (somatic coliphages; the bacteriophages infecting *E. coli* through the sexual pili (*F*-specific RNA bacteriophages) and bacteriophages infecting *Bacteroides* spp. are used as indicators of human viruses in water. In the other side, bacteriophages infecting different strains of *Bacteroides* are being proved to be very useful tools for faecal source tracking.

Key words: water, bacteriophage, pollution, faecal, indicator.

INTRODUCCIÓ

La intenció d'aquest treball és exemplificar com els coneixements fonamentals en biologia permeten aplicacions dels mateixos en aspectes d'interès immediat per a la societat. Sovint les aplicacions de la recerca bàsica són insospitades en el moment en què aquesta s'està fent. En aquest text es mostrarà com alguns dels coneixements desenvolupats sobre bacteriòfags que infecten *Escherichia coli* en estudis realitzats en els inicis de la biologia molecular, en els anys quaranta i cinquanta del segle passat, estan tenint aplicació en la determinació de la qualitat microbiològica de l'aigua, que és alhora un aspecte de la microbiologia ambiental que es començà a desenvolupar a començaments del segle xx.

LA MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

La microbiologia ambiental i l'ecologia microbiana són dues disciplines que se solen confondre, però són diferents. L'ecologia microbiana es pot definir com l'estudi de les interaccions entre els microorganismes i els components biòtics i abiòtics del medi ambient. En canvi, la microbiologia ambiental és una disciplina aplicada en què la pregunta conductora és de quina manera podem utilitzar el coneixement dels microbis en el medi ambient en benefici de la societat, en definitiva, sobre l'activitat, la salut i el benestar humà, ja sigui pels seus efectes sobre els homes mateixos, sobre altres éssers vius o sobre objectes. Els efectes dels microorganismes poden ser beneficiosos, per exemple en els casos de la fixació de nitrogen o la degradació de contaminants recalcitrants, o perjudicials, per exemple en els casos de la corrosió de les clavegueres

de ciment o en la transmissió de patògens a l'home, animals i plantes a través de l'aigua o l'aire. En ambdós casos, els efectes dels microorganismes poden ser incrementats o bé disminuïts, o fins i tot eliminats per la intervenció humana. En conseqüència, els coneixements generats per l'ecologia microbiana són essencials per a la microbiologia ambiental, encara que les dues disciplines siguin diferents.

La microbiologia ambiental està molt relacionada amb diverses subespecialitats. Aquestes són, entre altres, la microbiologia d'aigües, de sòl i d'aire, la bioremediació, la salut ocupacional, el control d'infeccions, la seguretat alimentària i la microbiologia industrial, ja que els microbis poden afectar molts aspectes de la vida en el medi ambient i són fàcilment transportables entre ambients diferents.

En el camp de la microbiologia ambiental, el focus d'atenció inicial es va centrar, a finals del segle xix i començaments del xx, en la qualitat de l'aigua i el destí dels patògens que hi són alliberats en el context de la protecció de la salut pública, quan la potabilització de l'aigua per filtració i desinfecció amb clor va disminuir dràsticament la incidència del còlera i la febre tifoide, vulgarment mal anomenada *tifus*. L'aplicació d'aquests processos en tot el món desenvolupat va eliminar pràcticament l'amenaça de malalties transmeses per l'aigua, excepte en cas que es donessin errors en el tractament. Fins a la dècada dels seixanta, es pensava que les amenaces pels patògens que es transmeten a través de l'aigua havien estat eliminades. Altrament, va començar a acumular-se informació que suggeria que altres agents infecciosos com els virus i els protozous eren més difícils d'eliminar de l'aigua que els bacteris. Aquesta preocupació va augmentar quan, gràcies a la millora

en els mètodes de diagnòstic, va ser possible associar agents causals a brots infecciosos lligats a aigua amb els quals fins aleshores no era possible fer-ho. Després de més de cent anys des dels inicis de la microbiologia ambiental, la qualitat de l'aigua segueix sent un dels principals focus d'atenció, ja que sovint es descobreixen patògens nous que s'hi transmeten (vegeu la taula 1).

Gairebé tothom en el món de la biologia sap que per estudiar la qualitat microbiològica de les aigües destinades a diferents usos s'utilitzen els bacteris. Els conceptes *coliformes totals*, *coliformes fecals* i *estreptococs* (o *enterococs*) *fecals* són ben coneguts. Amb l'augment dels coneixements sobre els microorganismes patògens de transmissió per l'aigua, ara sabem que podem avaluar millor la presència directa dels patògens i també sabem que tenim possibilitat d'utilitzar alguns indicadors alternatius. Aquests ens poden oferir una informació millor sobre els problemes nous mencionats en el paràgraf anterior. Les serioses mancances d'aigua en molts llocs del món han fet que avui dia calgui reutilitzar aigua regenerada (aigua residual depurada) i també utilitzar recursos tradicionals de mala qualitat, com per exemple aigües superficials contaminades, que en circumstàncies d'abundor no caldria utilitzar. Aquests fets, junt amb altres, com per exemple les restriccions en la desinfecció química de l'aigua com a conseqüència de la formació de subproductes, han fet que calgui anar prenent algunes precaucions addicionals per garantir-ne la qualitat. Molts experts pensen que per determinar la qualitat microbiològica de l'aigua cal, a més d'avaluar la presència i quantitats dels indicadors bacterians convencionals, determinar la presència d'algun patògen (per exemple el protozou *Cryptosporidium*, que ja és obligatori al Regne Unit) o bé d'algun indicador alternatiu. Entre els indicadors alternatius que s'estan estudiant trobem els bacteriòfags de bacteris entèrics

(Maier *et al.*, 1999). A finals de 2006 ha estat publicada la normativa referent a qualitat d'aigües subterrànies als Estats Units d'Amèrica, que inclou els bacteriòfags com a indicadors. Aquesta és una àrea en la qual el nostre grup de la Universitat de Barcelona ha desenvolupat una activitat reconeguda.

ELS BACTERIÒFAGS

Reben aquest nom els virus que infecten els bacteris i que en general són coneguts per haver estat utilitzats en un bon nombre de descobriments que varen marcar fites molt importants en el desenvolupament de la genètica molecular durant els anys quaranta i cinquanta del segle passat. Alguns exemples ben coneguts són les aportacions de Hershey i Chase sobre les característiques químiques del material genètic, la primera demostració convincent que l'herència als bacteris segueix els principis darwinians o que la recombinació es dona també dins dels gens. Els bacteriòfags varen tenir un paper fonamental en el desenvolupament de la genètica molecular (Cairns *et al.*, 1966); més tard, als anys setanta, també varen ser decisius en el desenvolupament d'eines (enzims i vectors) emprats en enginyeria genètica (Cohen *et al.*, 1973). Malgrat aquest paper important, els bacteriòfags han estat sovint vistos com una curiositat interessant que havia estat molt útil en uns moments determinats.

En els darrers deu anys, s'han obtingut informacions que demostren que els bacteriòfags no tenen un paper marginal en els cicles biològics globals. Són extraordinàriament abundants, fins al punt que ara es considera que són els éssers més nombrosos al planeta, amb una estimació només en els oceans d'uns 4×10^{30} bacteriòfags, i que tenen un paper molt important en la dinàmica de les poblacions bacterianes (Suttle, 2005). La bioinformàtica ha permès deter-

TAULA 1. Patògens transmesos per aigua més freqüents

Bacteris	Virus	Protozoos
<i>Salmonella typhi</i> i <i>no-typhi</i>	Virus de l'hepatitis A	<i>Giardia duodenalis</i>
<i>Yersinia</i>	Poliovirus	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	Coxsackievirus	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	Adenovirus	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Shigella</i>	Norovirus	
<i>Escherichia coli</i> enteropatògeniques	Virus de l'hepatitis E	
<i>Aeromonas</i>	Rotavirus	
<i>Plesiomonas</i>	Astrovirus	

minar que fragments de genomes de bacteriòfags són una part important en el genoma dels bacteris. Això permet concloure que han tingut un paper important en l'evolució dels bacteris (Hendrix *et al.*, 1999). Alhora, és indiscutible la seva importància en la variabilitat bacteriana a curt termini com a conseqüència de la transferència horitzontal de gens i d'illes de gens (Little, 2005). També, recentment s'han descrit alguns fenòmens, encara no ben entesos, que donarien als bacteriòfags rellevància fins i tot en els cicles biogeoquímics. Exemple d'això és la presència de gens que codifiquen proteïnes relacionades amb la fotosíntesi en el genoma d'alguns bacteriòfags de cianobacteris (Mann *et al.*, 2003).

Alhora, també hi ha un *boom* en les aplicacions pràctiques dels bacteriòfags. Hi ha diverses aplicacions biotecnològiques (Clark i March, 2006) i també algunes de relacionades amb la microbiologia ambiental. Entre aquestes darreres destacariem les següents: a) control de poblacions bacterianes en diferents ambients i situacions (Mann, 2003), b) producció d'enzims de bacteriòfags per al control de biopel·lícules (Hughes *et al.*, 1998) i c) la utilització potencial de bacteriòfags com a indicadors (Jofre, 2002) en diferents aspectes d'interès en microbiologia aplicada. A continuació, es desenvoluparan alguns apartats sobre aquest darrer aspecte, en el qual, com s'ha assenyalat en l'apartat anterior, el nostre grup de la Universitat de

Barcelona desenvolupa una part de la recerca.

ELS BACTERIÒFAGS COM A INDICADORS

En els darrers anys, els bacteriòfags han estat investigats com a indicadors potencials per a diferents propòsits, alguns en el camp de la microbiologia ambiental. El més àmpliament utilitzat és l'ús dels bacteriòfags per infectar bacteris entèrics com a models en el control de la qualitat de les aigües. Altres exemples serien la utilització de bacteriòfags de *Serratia marcescens* o *Staphylococcus aureus* com a traçadors de moviments d'aigües subterrànies, o els bacteriòfags de *Vibrio parahaemolyticus* com a indicadors d'eutrofització d'aigües de mar.

En qualsevol cas, aquí ens centrarem en alguns aspectes de l'ús dels bacteriòfags que infecten bacteris entèrics com a models en el control de la qualitat de les aigües. Els bacteriòfags, que només es multipliquen dins de bacteris, solen ser força específics pel que fa als bacteris en els quals es multipliquen. Per tant, n'hi ha d'específics dels bacteris entèrics, és a dir, dels bacteris que habiten al tub digestiu. A més, tenen una composició i estructura de virus i, per tant, cal pensar que en el medi ambient es comporten com a tals. D'aquestes dues observacions simples podem treure les dues apli-

cacions que es descriuen a continuació: la primera és l'ús dels bacteriòfags de bacteris entèrics com a indicadors de virus humans en el medi aquàtic, i la segona és l'ús d'un determinat tipus de bacteriòfags en la determinació de l'origen de la contaminació fecal.

Els bacteriòfags com a indicadors de virus que es transmeten a través de l'aigua

Entre el nombrosos microorganismes responsables d'infeccions que es transmeten per l'aigua, els virus tenen un paper força important. Fins fa poc, no ha estat possible detectar la majoria de virus en mostres d'aigua, ja que molts no són cultivables. Actualment, amb l'arribada de les tècniques genòmiques, és possible detectar en mostres d'aigua la presència de genomes o de fraccions de genomes de molts virus. De totes maneres, aquestes tècniques no permeten distingir si els virus presumptament detectats són infecciosos o no. A més, freqüentment el virus estan en concentracions tan baixes que fan necessària una etapa de concentració a través de procediments complexos per poder-los detectar. Així doncs, la detecció directa de virus, encara que possible, no sembla realista des del punt de vista del control rutinari de la qualitat de l'aigua. Altrament, aquestes tècniques genòmiques són imprescindibles per a alguns tipus d'estudis com, per exemple, els de tipus epidemiològic o els referents a la determinació de la persistència dels virus en el medi ambient. Però per a molts aspectes relacionats amb el control de la qualitat virològica de l'aigua molts experts pensen que cal emprar indicadors. La qüestió és quins.

Com s'ha assenyalat anteriorment, els indicadors bacterians han estat emprats des de començaments del segle passat. Malgrat tot, la comunitat científica implicada en la

microbiologia d'aigües ha expressat dubtes sobre la capacitat dels indicadors bacterians per predir la contaminació de l'aigua per virus. Aquesta inquietud s'ha produït com a conseqüència de tres tipus d'observacions. La primera és una falta de correlació freqüent entre els nombres d'indicadors bacterians i virus en mostres d'aigua. La segona, i al meu entendre la més important, és que els virus són molt més persistents que els bacteris en el medi ambient i també molt més resistents a processos de desinfecció; la tercera és que les dosis infeccioses dels virus són sempre molt més baixes que les dels bacteris.

Alguns virus entèrics humans i bacteriòfags que infecten alguns bacteris entèrics han estat recomanats pels experts. Entre els primers, trobem principalment els enterovirus, entre els quals es troba el virus de la poliomielitis, que sí que són cultivables. Les poques regulacions de qualitat d'aigua que inclouen virus inclouen els enterovirus. Factors com els nombres baixos, la complexitat metodològica, una certa estacionalitat en la seva presència i diferències significatives en les concentracions trobades en aigües residuals de diferents parts del món fan difícil l'acceptació generalitzada d'aquests virus com a indicadors.

Els bacteriòfags que infecten alguns bacteris entèrics, bacteris que habiten el tub digestiu, semblen bons candidats. S'originen en el tub digestiu de les espècies animals en què es troben els bacteris hostes i, per tant, apareixen en el medi ambient a través de les femtes.

Ja l'any 1943, Guelin va recomanar utilitzar els bacteriòfags que infecten *Escherichia coli* com a indicadors de microorganismes entèrics.

Actualment, podem dir que els bacteriòfags de bacteris entèrics, almenys els estudiats fins ara, no són perfectes com a indicadors de contaminació per virus, ja que no sempre hi ha una correlació inequívoca en-

tre la presència de virus i de bacteriòfags en mostres d'aigua. Altrament, la informació disponible diu que la presència d'un nombre determinat de bacteriòfags en una mostra d'aigua indica una presència probable de virus i també diu que l'eliminació d'una determinada quantitat de bacteriòfags després d'un tractament d'una aigua garanteix l'eliminació dels virus. Per tant, se segueixen fent molts estudis de qualitat d'aigua o de validació de processos de tractament amb bacteriòfags. Només per donar un exemple, quasi totes les avaluacions fetes sobre la retenció de virus per membranes estan fetes amb bacteriòfags. La filtració per membranes està esdevenint una de les tecnologies més importants en els tractaments d'aigua. Per descomptat, l'enorme quantitat d'informació bàsica que ha aparegut des de la recomanació de Guélin ha permès tractar actualment el tema d'una manera molt més lògica i considerar diferents tipus de bacteriòfags com a indicadors potencials de virus en el medi ambient, sobretot en aigua, però també en sòls i biosòlids.

Grups de bacteriòfags proposats com a indicadors de virus que es transmeten a través de l'aigua

Parlem de grups de bacteriòfags i no d'un bacteriòfag determinat, ja que les metodologies de detecció disponibles impliquen l'ús de soques bacterianes hostes, ja que els bacteriòfags només es multipliquen dins de bacteris, que detecten diversos bacteriòfags. Els colífags somàtics, els bacteriòfags RNA *F*-específics i els bacteriòfags que infecten *Bacteroides fragilis* han estat recomanats com a indicadors potencials per a aspectes diversos del control de la qualitat de l'aigua (IAWPRC Study Group, 1991).

Colífags somàtics. El terme *colífags somàtics* s'utilitza per definir els bacteriòfags que infecten *E. coli* a través de la paret cel·lular.

La gran majoria dels colífags somàtics coneguts pertanyen a les famílies següents: Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae i Microviridae (vegeu la taula 2). Tots els tipus es troben en les aigües residuals. La metodologia per detectar-los i comptar-los és molt simple i permet l'obtenció de resultats en quatre hores.

A més d'*E. coli*, alguns colífags somàtics es poden multiplicar en espècies bacterianes relacionades, com *Klebsiella* o *Shigella*. Com que algunes *Klebsiella* spp. es poden multiplicar en sòls i aigües netes, excepcionalment alguns colífags somàtics es podrien multiplicar en el medi ambient. Aquesta possibilitat ha constituït l'argument principal d'alguns detractors de la idea d'emprar colífags somàtics com a indicadors de contaminació d'origen fecal i, per tant, de virus humans. Estudis sobre les densitats de bacteriòfags i els bacteris hostes necessaris perquè es doni la multiplicació dels bacteriòfags i els factors que afecten la multiplicació suggereixen que la contribució de la multiplicació fora del tub digestiu en el nombre de colífags somàtics en ambients aquàtics és negligible.

Diferents soques d'*E. coli* i diferents medis d'assaig detecten nombres diferents de bacteriòfags, que són reportats com a colífags somàtics. Això ha produït molt soroll de fons, ja que hi ha dades molt contradictòries sobre la presència i densitat de colífags somàtics en diferents entorns aquàtics contaminats fecalment. Per això, ha estat necessari escometre l'estandardització del mètode per part de la International Standardisation Organisation (ISO), procés en el qual hem participat activament, i que defineix els colífags somàtics com aquells detectats per la soca *E. coli* WG5 o similars, i els procediments estipulats en el mètode estandarditzat. Això permetrà que la informació que es generi arreu del món sigui equivalent i no generi dades confuses.

Com a conseqüència de les crítiques d'al-

TAULA 2. Bacteriòfags d'interès com a indicadors

Família	Característiques	Fags representatius (hoste)
Myoviridae	DNA de doble cadena Cua llarga contràtil Càpsides de fins a 100 nm Càpsides isomètriques o allargades	T2, T4 (<i>E. coli</i>)
Siphoviridae	DNA de doble cadena Cua llarga no contràtil Càpsides de fins a 60 nm Càpsides isomètriques	λ (<i>E. coli</i>) B40-8 (<i>B. fragilis</i>)
Podoviridae	DNA de doble cadena Cua curta Càpsides de fins a 65 nm Càpsides isomètriques	T7, P22 (<i>E. coli</i>)
Microviridae	DNA de cadena senzilla Sense cua Càpsides de fins a 30 nm Càpsides isomètriques	Φ X174 (<i>E. coli</i>)
Leviviridae	RNA de cadena senzilla Sense cua Càpsides de fins a 25 nm Càpsides isomètriques	ϕ 2, MS2, GA, Q β , F1 (bacteris amb el plasmidi F)
Inoviridae	DNA de doble cadena Càpsides de 800 $\times$ 6 nm Barres llargues i flexibles	ϕ d, M13 (bacteris amb el plasmidi F)

guns científics a la utilització dels colífags somàtics com a indicadors, per la possibilitat que es multipliquin fora del tub digestiu, es va començar a estudiar si altres grups de bacteriòfags eren més idonis per ser emprats com a indicadors, concretament els bacteriòfags RNA *F*-específics i els bacteriòfags de *Bacteroides fragilis*.

Bacteriòfags RNA *F*-específics. Els bacteriòfags *F*-específics són aquells que infecten els bacteris hostes a través dels pèls sexuals, que són codificats pel plasmidi *F*. Es coneix com a *factor F* i ha estat molt estudiat com a model de conjugació en bacteris. Els bacteriòfags *F*-específics més abundants en les femtes i aigües residuals tenen un genoma constituït per una sola molècula de RNA de cadena senzilla, i per això es denominen RNA *F*-específics. Pertanyen a la família Leviviridae.

Els pèls sexuals no són sintetitzats per sota dels 32 °C. Això fa improbable la multi-

plicació dels bacteriòfags RNA *F*-específics en el medi ambient en els països de clima temperat.

El procés infecció dels RNA *F*-específics és interromput per la presència de la RNasa, que és un enzim que degrada RNA. Aquest fet ens permet diferenciar els bacteriòfags RNA *F*-específics d'altres bacteriòfags que infecten a través dels pèls sexuals, els Inoviridae, i dels bacteriòfags somàtics del bacteri hoste. La inactivació dels bacteriòfags RNA *F*-específics mitjançant la RNasa i la disponibilitat d'una soca de *Salmonella typhimurium*, WG49, dissenyada per detectar bacteriòfags *F*-específics, han permès desenvolupar un mètode relativament simple de detecció de quatre bacteriòfags RNA *F*-específics. Aquest, ja estandarditzat, dona resultats en unes dotze hores.

Bacteriòfags que infecten *Bacteroides fragilis*. Els bacteriòfags de *Bacteroides* predominants són Siphoviridae amb cua flexible i,

en general, corba. Solen tenir un espectre d'hostes (bacteris que poden infectar) molt restringit. Com es veurà amb més detall més endavant, alguns hostes només detecten bacteriòfags en les femtes d'algunes espècies animals.

Els requeriments especials de *Bacteroides* d'anòxia i un medi de cultiu complex, juntament amb les densitats de bacteriòfag i hoste necessàries perquè es doni la multiplicació, fan pràcticament impossible la multiplicació d'aquests bacteriòfags en el medi ambient. Per tant, els bacteriòfags de *Bacteroides* presents en mostres ambientals tenen el seu origen en el tub digestiu.

La ISO, en un procés que hem dirigit, ha elaborat un mètode estandarditzat per a la detecció i enumeració de bacteriòfags que infecten *Bacteroides*. Aquest mètode dona resultats en divuit hores i és més complex que els dels altres grups de bacteriòfags, atesa la necessitat de generar condicions anòxiques per al creixement de *Bacteroides*.

Mètodes de detecció i enumeració de bacteriòfags en mostres ambientals

Els bacteriòfags es detecten pels seus efectes sobre els bacteris hostes que són capaços d'infectar. Hi ha dos procediments bàsics per detectar-los (vegeu les figures 1 i 2). El mètode de la formació de clapes de lisi sobre una monocapa de bacteris hoste (vegeu la figura 1) és un mètode quantitatiu directe. Cada clapa de lisi es considera formada per un bacteriòfag infecciós i rep el nom de *unitat formadora de clapa*, s'abrevia UFP (la *P* correspon al terme anglès *plaque*) i no s'ha de confondre amb UPC, que és l'abreviació de *unitat formadora de colònia*, emprada per als bacteris. El segon mètode permet detectar la presència o absència de bacteriòfags en un volum determinat de mostra (vegeu la figura 2). Aquest segon procediment, adaptat a un format de nom-

bre més probable, també permet quantificar els bacteriòfags infecciosos en una mostra.

Per als tres grups de bacteriòfags considerats en la secció anterior, ambdós procediments estan perfectament desenvolupats en els mètodes estandarditzats ISO. Tots, com és preceptiu per a l'acceptació d'un mètode com a propi per la ISO, han estat validats en estudis en què han participat laboratoris d'arreu. Cal destacar que el mètode de la doble capa permet obtenir resultats de colífags somàtics en quatre hores, que avui dia és el mètode més ràpid de detecció de microorganismes vius, i que, segons l'Agència de Protecció del Medi Ambient (EPA) dels Estats Units d'Amèrica, es considera temps real. Tenim esperances fonamentades, i en això estem treballant, que aquest temps es pot escurçar. Aquesta promptitud en l'obtenció de resultats pot ser molt útil des del punt de vista de l'explotació de plantes de potabilització i de depuració d'aigües.

Els mètodes esmentats estan a l'abast de qualsevol laboratori de bacteriologia sense necessitat d'equipament especial i amb un entrenament mínim del personal. Assaigs multilaboratori efectuats a Europa i també a Espanya (Mendez *et al.*, 2004) amb laboratoris sense experiència prèvia en bacteriòfags així ho demostren. És un mètode que els nostres alumnes de la Facultat de Biologia realitzen com una pràctica elemental. A Espanya hi ha diversos laboratoris municipals i de salut pública de comunitats autònomes que han participat en aquests estudis i que tenen els mètodes incorporats als seus protocols normalitzats de treball (Mendez *et al.*, 2004). Pel que fa al cost, una anàlisi de colífags somàtics costa igual o menys que una anàlisi de coliformes fecals, mentre que el cost d'una anàlisi dels altres grups de bacteriòfags els doblaria.

També existeixen mètodes relativament simples i molt eficaços de concentració de bacteriòfags de mostres d'aigua (Mendez *et al.*, 2004) i d'extracció de bacteriòfags de bi-

osòlids (fangs de depuradora, compost, etc.) (vegeu <http://www.ecn.nl/horizontal>).

Presència i comportament dels bacteriòfags en diferents matrius mediambientals contaminades fecalment

Hi ha una important literatura sobre la presència i comportament dels bacteriòfags dels tres grups proposats com a indicadors de diferents matrius mediambientals. Una part important d'aquesta informació ha estat recollida en algunes revisions (IAWPRC, 1991; Grabow, 2001; Jofre, 2002, 2007).

Els colífags somàtics i el bacteriòfag RNA *F*-específics determinats segons els mètodes estandarditzats es troben en els residus fecals (femtes, aigües residuals municipals, aigües residuals d'escorxadors i purins) d'arreu del món en concentracions semblants. Com a exemple, en les aigües residuals de diverses poblacions de Catalunya en què la concentració de bacteris coliformes fecals està entre 7×10^4 i 3×10^5 UPC per ml, la concentració de colífags somàtics està entre 5×10^4 i 1×10^5 UFP per ml, i la dels RNA *F*-específics entre 5×10^3 i 10^4 . En canvi, les concentracions de bacteriòfags de *Bacteroides* són variables en funció de grans àrees geogràfiques. Per exemple, a tota la Mediterrània la situació és semblant, però a la Gran Bretanya és diferent. Cal cercar bacteris hostes d'abast regional (grans àrees geogràfiques). Encara no se sap la raó d'aquestes diferències, que han cridat molt l'atenció dels investigadors en temes bàsics de la biologia de *Bacteroides* en una seqüència de fets que seria invertida respecte al que s'ha comentat en la introducció.

A mesura que ens anem allunyant de la font de contaminació, ja sigui perquè hi ha hagut dilució i inactivació natural en el medi ambient o perquè s'han sotmès les matrius (aigua i biosòlids) contaminades a

tractament, s'observa que els bacteriòfags són més persistents que els bacteris. Tornant a l'exemple de Catalunya, a les platges de Barcelona, on molts microbis presents en les aigües residuals han estat eliminats pel tractament de depuració i aquells que arriben al mar són desactivats per factors naturals (irradiació solar, temperatura, factors biològics, etc.), la concentració de colífags somàtics supera en un factor de deu les concentracions de bacteris coliformes fecals.

L'esdevenir dels bacteriòfags en els ambients naturals, així com en els tractaments d'aigua i biosòlids, s'assembla molt a l'esdevenir dels virus. En canvi, hi ha alguns informes en què s'assenyala una falta de correlació entre la presència de virus i bacteriòfags. De totes maneres, cal assenyalar que aquests estudis són difícils de realitzar, atesa la dificultat de detecció de virus patògens en les mostres ambientals, i els resultats d'interpretació difícil. En el futur caldrà millorar la interpretació estadística d'aquests tipus d'estudis, molt probablement aplicant mètodes estadístics inductius.

En conclusió, avui es pot afirmar que els bacteriòfags de bacteris entèrics no són perfectes com a indicadors de virus humans, però són millors que les altres alternatives disponibles.

ELS BACTERIÒFAGS EN LA DETERMINACIÓ DE L'ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓ FECAL

Hi ha diferents raons per les quals interessa poder determinar l'origen de la contaminació fecal, és a dir, determinar si aquesta és humana o animal, i si és possible precisar de quina espècie animal (Malakoff, 2002). Els indicadors bacterians convencionals no donen aquesta informació.

A priori, hi ha diferents procediments

possibles per distingir l'origen de la contaminació fecal, incloent-hi la detecció de DNA de l'hoste, productes químics i microbis, però a l'hora de la veritat no resulta tan senzill com sembla. Entre els traçadors microbians que s'estan assajant trobem: a) microorganismes patògens, que són al·lòctons i transitoris en el tub digestiu i la presència dels quals depèn de l'estat sanitari i epidèmic de la població, b) els bacteris comensals i c) els bacteriòfags que infecten bacteris comensals.

Bacteroides spp. és un bacteri anaeròbic, i és el bacteri comensal majoritari en les femtes de l'home i dels animals homeotermes estudiats. En l'home, per exemple, se'n troben 10^{11} per gram de contingut del còlon, mentre que d'*E. coli* n'hi ha només 10^8 . Alhora, s'ha trobat que *Bacteroides* interacciona molt amb l'hoste, i condiciona fins i tot la secreció d'alguns enzims per part de l'hoste i alguns processos del desenvolupament, com l'angiogènesi en l'intestí (Xu *et al.*, 2003). Això fa pensar que els *Bacteroides* podrien ser relativament específics, és a dir, que hi hauria diferència entre els *Bacteroides* trobats en les diferents espècies hostes. Hi ha indicis que això és d'aquesta manera. Si això és així, i atesa l'especificitat que solen presentar els bacteriòfags, caldria esperar que els bacteriòfags que infecten *Bacteroides* també podrien servir per determinar l'origen de la contaminació fecal de la mostra. Per què els bacteriòfags i no directament el bacteri? Aquest és anaerobi i la seva persistència fora de l'intestí és curta; en canvi, pel que se sap, els bacteriòfags persisteixen bé en el medi ambient.

De fet, anys enrere, força abans d'aquests descobriments, nosaltres havíem observat que algunes soques de *B. fragilis*, que s'havien obtingut de mostres clíniques, detectaven bacteriòfags només en les restes fecals humanes i no en les d'altres animals. Però aquestes soques no eren prou satisfactòries per al propòsit de detectar

l'origen de la contaminació, ja que detectaven nombres massa baixos de bacteriòfags en algunes àrees geogràfiques. Posteriorment, vàrem dissenyar un procediment simple, ràpid i barat per aïllar soques de *Bacteroides* directament d'aigües residuals que poguessin discriminar fags originats al digestiu de l'home, i en vàrem aïllar algunes de molt prometedores, tant a Barcelona com en altres àrees geogràfiques, per exemple, Anglaterra i Colòmbia. Aplicada una soca, que hem anomenat GA17, de *B. tethaiaomicon* en un estudi per avaluar diferents procediments de determinació de l'origen de la contaminació fecal, realitzat en cooperació amb laboratoris de França, el Regne Unit, Suècia i Xipre, ha resultat donar la millor capacitat de discriminació entre un ventall d'indicadors microbiològics i químics analitzats (Blanch *et al.*, 2006). Caldria encara determinar molts aspectes del procediment, com fins quin nivell de dilució de la contaminació ens avalua, quina és la persistència dels bacteriòfags detectats per la soca GA17 en el medi ambient i com s'eliminen aquests en els tractaments de depuració. Però de moment els bacteriòfags que infecten la soca GA17 es mostren com un dels millors traçadors de l'origen de la contaminació fecal humana disponibles.

Aplicant el mètode d'aïllament de soques hostes esmentat abans, un estudiant de doctorat colombià del nostre laboratori, Andrey Payan, ha aïllat una soca hoste de *B. fragilis* d'aigua residual d'un escorxador de porcs. S'ha detectat un bon nombre de bacteriòfags (10^3 - 10^4 per ml) en aigües residuals de diferents escorxadors de porcs, i nombres tres o quatre logaritmes decimals inferiors en aigües residuals municipals o d'escorxadors de remugadors i aus (dades no publicades). Aquestes dades ens fan pensar, i en això estem treballant, que podríem disposar d'una bateria d'hostes pertanyents al gènere *Bacteroides* que amb un test molt

simple ens permetria determinar l'origen de la contaminació fecal.

BIBLIOGRAFIA

- ARMON, R.; KOTT, Y. (1996). «Bacteriophages as indicators of pollution». *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 26: 299-335.
- BENZER, S. (1961). «On the topography of genetic fine structure». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 47: 403-415.
- BLANCH A. R.; BELANCHE-MUÑOZ, L. L.; BONJOCH, X.; EBDON, J.; GANTZER, C.; LUCENA, F.; OTTOSON, J.; KOURTIS, C.; IVERSEN, A.; KÜHN, I.; MOCÉ, L.; MUNIESA, M.; SCHWARTZBROD, J.; SKRABER, S.; PAPAGEORGIOU, G.; TAYLOR, H.; WALLIS, J.; JOFRE, J. (2006). «Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking». *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 5915-5926.
- CAIRNS, J.; STENT G. S.; WATSON, J. D. (1966). *Phage and the origins of molecular biology*. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- CLARK, J. R.; MARCH, J. B. (2006). «Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials». *Trends Biotech.*, 24: 212-218.
- COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; BOYER, R. B.; HELLING, R. B. (1973). «Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 3240-3244.
- EEC (1976). *The Council of European Economic Communities Directive of 8 December, 1975 concerning the quality of bathing waters. Official Journal of the European Communities, Directive num. 76/160/EEC*. Bruxelles: European Communities.
- FAUQUET, C.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (2005). *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Londres: Elsevier: Academic Press.
- FIELD, K. G.; BERNHARD, A. E.; BRODEUR, T. J. (2003). «Molecular approaches to microbial monitoring: fecal source tracking». *Environ. Monit. Asses.*, 81: 313-326.
- GRABOW, W. O. K. (2001). «Bacteriophages: update on replication as models for viruses in water». *Water SA*, 27: 251-268.
- GUELIN, A. (1948). «Etude quantitative de bacteriophages de la mer». *Ann. Inst. Pasteur*, 74: 104-112.
- HENDRIX, R. W.; SMITH, M. C. M.; BURNS, R. N.; FORD, M. E.; HATFULL, G. F. (1999). «Evolutionary relationship among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 2192-2197.
- HERSEY, A. D.; CHASE, M. (1952). «Independent functions of viral protein and nucleic acids in growth of bacteriophage». *J. Gen. Physiol.*, 36: 393.
- HUGHES, K. A.; SUTHERLAND, I. W.; JONES, M. V. (1998). «Biofilm susceptibility to bacteriophages attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase». *Microbiol.*, 144: 3039-3047.
- IAWPRC STUDY GROUP ON HEALTH RELATED WATER MICROBIOLOGY. (1991). «Bacteriophages as model viruses in water quality control». *Wat. Res.*, 25: 529-545.
- ISO (1995). *ISO 10705-1: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages*. Gènova: ISO.
- (2000). *ISO 10705-2: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages*. Gènova: ISO.
- (2001). *ISO 10705-4: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis*. Gènova: ISO.
- JOFRE, J. (2002). «Bacteriophages as indicators». A: BRITTON, G. [ed.]. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Vol. 1. Nova York: John Wiley and Sons, 354-363.
- JOFRE, J., LUCENA, F.; MOOIJMAN, K.; PIERZO, V.; ARAUJO, R.; BAHAR, M.; HAVELAAR, A. (2000). *Determination of bacteriophages in bathing waters. EUR report EN 19506*. Luxemburg: Office for Official Publications of the European Communities.
- (2007). «Indicators of waterborne enteric viruses». A: BOSCH, A. [ed.]. *Human viruses in water (de la sèrie Perspectives in medical virology)*. Londres: Elsevier.
- LITTLE, J. W. (2005). «Lysogeny, prophage induction, and lysogenic conversion». A: WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA, S. L. [ed.]. *Phages. Their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. Washington: ASM Press, 37-55.
- LUCENA, F.; MENDEZ, X.; MORÓN, A.; CALDERÓN, E.; CAMPOS, C.; GUERRERO, A.; CÁRDENAS, M.; GANTZER, C.; SCHWARTZBROD, L.; SKRABER, S.; JOFRE, J. (2003). «Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South». *America. J. Appl. Microbiol.*, 94: 808-815.
- LURIA, S.; DELBRÜCK, M. (1943). «Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance». *Genetics*, 28: 491-511.
- MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. (1999). *Environmental microbiology*. Londres: Academic Press.
- MALAKOFF, D. (2002). «Microbiologists on the trail of polluting bacteria». *Science*, 295: 2352-2353.
- MANN, N. H. (2003). «Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton». *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 17-34.

- MANN, N. H.; COOK, A.; MILLARD, A.; BAILEY, S.; CLOKIE, D. M. (2003). «Marine ecosystems: Bacterial photosynthesis genes in a virus». *Nature*, 424: 741.
- MENDEZ, J.; AUDICANA, A.; ISERN, A.; LLANEZA, J.; TARANCON, M. L.; JOFRE, J.; LUCENA, F. (2004). «Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water». *J. Virol. Meth.*, 117: 19-25.
- MOCÉ-LLIVINA, L.; LUCENA, F.; JOFRE, J. (2005). «Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters». *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 6838-6844.
- MUNIESA, M.; JOFRE, J. (2004). «Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment». *Antoine van Leeuwenhoek*, 86: 65-76.
- PAYAN, A.; EBDON, J.; TAYLOR, H.; GANTZER, C.; OTTOSON, J.; PAPAGEORGIOU, G.; BLANCH, A. R.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. (2005). «Method for isolation of *Bacteroides* bacteriophages host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water». *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 5659-5662.
- ROY, B.; ACKERMANN, H.-W.; PANDIAN, S.; PICARD, G.; GOULET, J. (1993). «Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by *Listeria* phages and a quaternary ammonium compound». *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 2914-2917.
- RUZIN, A.; LINDSAY J.; NOVICK, R. P. (2001). «Molecular genetics of SaP11, a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*». *Mol. Microbiol.*, 41: 365-377.
- SCOTT, T. M.; ROSE, J. B.; JENKIN, T.; FARRAH, S. R.; LUKASIK, J. (2002). «Microbial source tracking: current methodology and future directions». *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5796-5803.
- SUTTLE, C. A. (2005). «Viruses in the sea». *Nature*, 437: 356-361.
- TARTERA, C.; LUCENA, F.; JOFRE, J. (1989). «Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment». *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2696-2701.
- USEPA (1992). *Technical support document for land application of sewage sludge, VI*. EPA/822/R-093900/9. Washington DC: Environmental Protection Agency.
- VAUGHN, J. M.; METCALF, T. C. (1975). «Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and selfish raising estuarine waters». *Wat. Res.*, 9: 613-616.
- WIGINS B. A.; ALEXANDER, M. (1985). «Minimum bacterial density for bacteriophages replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems». *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 19-23.
- WOODY, M. A.; CLIVER, D. O. (1997). «Replication of coliphages Q β as affected by host cell number, nutrition, competition from insusceptible cells and non-FRNA coliphages». *J. Appl. Microbiol.*, 82: 431-440.
- XU, J.; BJURSELL, M. K.; HIMROD, J.; DENG, S.; CARMICHEL, L. K.; HIANG, H. C.; HOOPER, L. V.; GORDON, J. J. (2003). «A genomic view of the human *Bacteroides thetaiaomicron* symbiosis». *Science*, 299: 2074-2076.