



Evaluación de la cepa huésped *E. coli* CB390 para la detección simultánea de colifagos somáticos y F+ totales como herramienta para evidenciar contaminación viral en agua potable en Ciudad Bolívar

Eliana Lizeth Riaño Chavez

**Directora:
María Claudia Campos Pinilla. Ph. D**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito para optar por el título de**

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.**

Evaluación de la cepa huésped *E. coli* CB390 para la detección simultánea de colifagos somáticos y F+ totales como herramienta para evidenciar contaminación viral en agua potable en Ciudad Bolívar

Eliana Lizeth Riaño Chavez

**Claudia Campos Pinilla Ph. D.
Directora**

**Carolina Guzmán Ph.D
Jurado**

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Carrera de Microbiología Industrial
Bogotá D.C.**

Evaluación de la cepa huésped *E. coli* CB390 para la detección simultánea de colifagos somáticos y F+ totales como herramienta para evidenciar contaminación viral en agua potable en Ciudad Bolívar

Eliana Lizeth Riaño Chavez

Concepcion Puerta B, Ph. D.
Decana de Facultad
Facultad de Ciencias

Marcela Franco Correa, Ph. D.
Directora de Carrera
Facultad de Ciencias

**Facultad de Ciencias
Carrera de Microbiología Industrial
Bogotá D.C.**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. MARCO CONCEPTUAL	
4.1 Contaminación en agua potable.....	10
4.2 Enfermedades de origen hídrico.....	10
4.3 Evaluación de la calidad microbiológica del agua.....	11
4.4 Bacteriófagos	
4.4.1 Fagos somáticos.....	12
4.4.2 Fagos F+.....	12
4.4.3 Fagos que infectan <i>Bacteroides fragilis</i>	13
4.4.4 Fagos CB390.....	13
5. OBJETIVO GENERAL.....	14
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Selección de la muestra.....	15
7.2 Toma de la muestra.....	15
7.3 Protocolo para el análisis de colifagos	
7.3.1 Protocolo para el análisis de fagos somáticos.....	15
7.3.2 Protocolo para el análisis de fagos F+	16
7.3.3 Protocolo para el análisis de fagos CB390.....	17
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
9. CONCLUSIONES.....	26
10. BIBLIOGRAFIA.....	27
ANEXO.....	30

Tabla 1. Cepas y fagos de referencia y medios utilizados para el análisis de fagos somáticos, fagos F+ y colifagos CB390.....	19
Tabla 2. Tabla 2. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y colifagos CB390 en agua potable en el barrio Potosí de la localidad de Ciudad Bolívar.....	20
Tabla 3. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y colifagos CB390 en agua potable en el barrio Caracolí de la localidad de Ciudad Bolívar.....	20
Tabla 4. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y colifagos CB390 en agua potable en el barrio Arborizadora baja de la localidad de Ciudad Bolívar.....	20
Tabla 5. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y colifagos CB390 en agua potable en el barrio Candelaria la nueva de la localidad de Ciudad Bolívar.....	21
Tabla 6. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y colifagos CB390 en agua potable en el barrio Robles de la localidad de Ciudad Bolívar.....	21
Tabla 7. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y colifagos CB390 en agua potable en el barrio Arborizadora alta de la localidad de Ciudad Bolívar.....	21
Tabla 8. Frecuencia y porcentaje de muestras positivas para fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390.....	23

RESUMEN

La evaluación de la calidad del agua potable debe incluir el análisis de la presencia de microorganismos patógenos, los cuales podrían poner en riesgo la salud de la población que la consume, ya que pueden causar enfermedades de origen hídrico. La detección de estos microorganismos patógenos en los laboratorios de rutina, podría llegar a ser difícil y es por ello que se propone el uso de microorganismos indicadores de contaminación fecal debido a que estos se pueden detectar de manera fácil, rápida y económica. Actualmente, los indicadores virales utilizados para la evaluación de la calidad del agua, son los fagos somáticos, fagos F+ y fagos que infectan *Bacteroides fragilis*, lo cual implica realizar tres protocolos diferentes y un mayor costo en la evaluación. Por esta razón, se ha propuesto el uso de una cepa que evalúe de manera simultánea fagos somáticos y F+. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de la cepa *E. coli* CB390 para la detección simultánea de fagos somáticos y F+ totales en muestras de agua potable de la localidad Ciudad Bolívar. En el presente estudio se evaluaron tres fagos para determinar la presencia de contaminación viral en agua potable mediante técnicas estandarizadas según el tipo de fago; para fagos somáticos se utilizó ISO 10705-2 (2000), para fagos F+ totales se empleó ISO 10705-1 (1999) y finalmente para fagos CB390 ISO 10705-2 (2000) modificada por Guzmán *et al* (2008). El uso de estos fagos en el estudio, permitió evaluar la calidad del agua potable en la localidad Ciudad Bolívar, en relación a la posible presencia de virus patógenos, encontrando bajas concentraciones de F+ y ausencia de fagos somáticos. Las concentraciones de fagos que se detectaron en los análisis realizados no permiten determinar si la cepa *E. coli* CB390 es capaz de detectar de manera simultánea fagos somáticos y fagos F+ totales en este tipo de aguas.

1. INTRODUCCIÓN

La urbanización no controlada, la industrialización, la pobreza y la eliminación inadecuada de las excretas son actividades que afectan de manera directa e indirecta la calidad del agua ya que llevan al incremento de las concentraciones de distintos microorganismos patógenos entéricos que afectan la salud de los consumidores. Con el fin de evitar brotes epidémicos en las distintas comunidades causados por microorganismos patógenos, se realiza una vigilancia rigurosa de la calidad del agua destinada para el consumo humano.

Para ello se usan diferentes herramientas microbiológicas que permiten identificar la presencia de microorganismos patógenos que se pueden encontrar en la fuente de captación o en la planta de tratamiento. En la evaluación de la calidad microbiológica se analiza la presencia de bacterias, parásitos y virus patógenos ya que representan un alto riesgo para la salud pública. Para el análisis de virus patógenos se requieren técnicas moleculares o técnicas por cultivo que exigen reactivos costosos o demandan tiempo dificultando su identificación; por ello se propone el uso de bacteriófagos como indicador de virus patógenos en agua ya que indican la posible presencia de estos.

Los fagos somáticos, fagos F+ y fagos que infectan *Bacteroides fragilis* han sido empleados para evaluar la calidad del agua ya que han demostrado ser buenos indicadores de la presencia de virus patógenos en diferentes tipos de agua, debido a que presentan características y comportamiento similares a estos. En el caso de los fagos somáticos y F+ se requiere de tiempo y recursos económicos que se podrían disminuir con la implementación de la cepa *E. coli* CB390. En la actualidad se propone esta cepa modificada por Guzmán *et al.*, 2008 ya que esta permite detectar fagos somáticos y fagos F+ de manera simultánea reduciendo costos y tiempos en la evaluación de la calidad del agua **(1)**.

Estudios previos realizados en el laboratorio de indicadores de calidad de aguas y lodos realizados en las localidades de Ciudad Bolívar y Soacha mostraron la presencia de indicadores bacterianos y virales en agua potable, por lo que para el presente estudio fueron seleccionadas estas localidades con el fin de determinar si esta cepa modificada es útil para determinar contaminación viral en agua potable y demostrar que la suma de las concentraciones de los fagos somáticos y fagos F+ corresponde a las concentraciones de los colifagos CB390.

Se analizaron 46 muestras en casas donde previamente se había detectado la presencia de indicadores virales mediante los protocolos: ISO 10705-2 (2000) para fagos somáticos, ISO 10705-1 (1999) para fagos F+ y para fagos CB390 ISO 10705-2 (2000) modificada por Guzmán *et al.*, 2008 esperando obtener resultados que permitieran determinar si la cepa en estudio es capaz de detectar de manera simultánea concentraciones de fagos somáticos y fagos F+ totales. Con los resultados obtenidos no fue posible evidenciar si las concentraciones de los fagos somáticos y fagos F+ corresponden a las concentraciones de los colifagos CB390 debido a que solo cuatro de las cuarenta y ocho muestras analizadas resultaron positivas para fagos F+ y fagos CB390.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evaluación de virus patógenos en las distintas fuentes hídricas es complicada ya que además de demandar mucho tiempo y dinero, también requiere de laboratorios especializados para la detección de dichos microorganismos de contaminación de origen fecal **(1, 2, 3, 4, 5)**. Es por ello que se proponen microorganismos indicadores para realizar una estimación acerca de la calidad del agua ya que presentan un comportamiento similar a los virus patógenos y son fáciles, rápidos y económicos a la hora de su identificación **(2)**.

El uso de la cepa huésped *E. coli* WG5 para la identificación de fagos somáticos, la cepa huésped *Salmonella* WG49 para la identificación de fagos F+ y la cepa huésped de *B. fragilis* RYC 2056, han demostrado ser efectivas para evidenciar la posible presencia de virus patógenos en agua potable y residual. Aun cuando es posible indicar la presencia de virus patógenos mediante estas tres cepas, ayudaría contar con una cepa que sea capaz de detectar fagos somáticos y fagos F+ de manera simultánea, ya que son los más utilizados, con el fin de disminuir costos y tiempo a la hora de evaluar la calidad del agua. La cepa propuesta es la CB390, la cual es una cepa de *E. coli* modificada capaz de medir los dos fagos de manera simultánea **(1)**.

En Estados Unidos y Europa esta cepa ha demostrado tener la capacidad de detectar simultáneamente el mismo número de fagos somáticos y F+ totales cuando se evalúan de manera individual **(1,3,4)**, pero no se cuenta con estudios realizados en condiciones ambientales diferentes como las de Colombia.

3. JUSTIFICACIÓN

Evaluar el comportamiento de la cepa *E. coli* CB390 en Colombia permitiría confirmar si el uso de esta cepa puede reemplazar el uso de las dos cepas que se utilizan en la actualidad, permitiendo disminuir los costos y tiempo en la evaluación de la calidad del agua. De igual manera es importante comparar los datos que se obtendrán en este estudio con los datos ya obtenido previamente en otro tipo de aguas en Estados Unidos y en España. Implementar esta nueva herramienta en la normativa, a nivel de control de calidad del agua permitiría evaluar el riesgo de transmisión de enfermedades de origen hídrico en la población, animando a propiciar cambios en las políticas internacionales, nacionales y locales con enfoques y prioridades en investigación, que proporcionen herramientas para mejorar la calidad del ambiente y la salud.

4. MARCO CONCEPTUAL

4.1 Contaminación en agua potable

El acceso al agua potable por parte de la población además de brindarle bienestar, es un elemento esencial cuando se trata de la salud pública. La evaluación de la calidad del agua es un aspecto de gran importancia a la hora de evaluar los riesgos que implica en la salud humana, más aún cuando se trata de agua de consumo humano, ya que la presencia de microorganismos patógenos en agua potable aumenta el riesgo de enfermedades de transmisión de origen hídrico (6).

La presencia de microorganismos en el agua potable, como bacterias, virus o parásitos presentan un riesgo para la población ya que estos pueden causar diferentes enfermedades. La Organización Mundial de la Salud establece cifras en donde se estima que cada año hay cuatro millones de casos de diarreas y demás enfermedades que se encuentran relacionadas al acceso de agua potable (7). La presencia de microorganismos patógenos en el agua genera un riesgo importante en las comunidades pobres de países en desarrollo, tal y como sucede en Colombia. Por ejemplo, en este tipo de comunidades los niños, las personas inmuno comprometidas y los ancianos son los más vulnerables frente a las enfermedades transmitidas por el consumo de aguas contaminadas (8).

Según la Organización Mundial de la Salud y la UNESCO, si el abastecimiento de agua potable y el saneamiento básico fueran ampliados a todas las comunidades más pobres, las enfermedades gastrointestinales se reducirían en un gran porcentaje, puesto que se sabe que el 90% de los casos de diarrea se deben al consumo de agua contaminada con heces fecales. Esto indica que existe un amplio espectro de microorganismos patógenos en los cuerpos de agua (7). En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la calidad microbiológica del agua potable y es por ello que los entes encargados deben garantizar que el agua potable que llega a todos los hogares se encuentra libre de agentes patógenos.

4.2 Enfermedades de origen hídrico

Las enfermedades de origen hídrico se dividen en diferentes grupos: aquellas que se transmiten por el agua, se refieren a que el patógeno es ingerido de manera directa a través del agua; en el segundo grupo se encuentran las enfermedades que se transmiten de persona a persona y por último existen enfermedades que se transmiten por vectores que se encuentran relacionados con el agua (9).

Los microorganismos que se encuentran contaminando los diferentes cuerpos de agua generalmente causan epidemias en países en desarrollo. Las enfermedades de origen hídrico pueden ser causadas por agentes bacterianos como *Campylobacter* sp., *E. coli* entero hemorrágica *E. coli* enteroinvasiva, *Salmonella* sp., *Y. enterocolítica*, *H. pylori*, *L. pneumophila*, *P. aureginosa* y *Aeromonas*. También pueden ser causadas por agentes virales como virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis E, virus del Polio, Rotavirus, Enterovirus, Adenovirus y agentes parasitarios como *G. intestinalis*, *T. gondii*, *E. histolytica*, *Acanthamoeba* spp y *Cryptosporidium* spp entre otros (6).

4.3 Evaluación de la calidad microbiológica del agua

La presencia de microorganismos patógenos en el agua potable está relacionada directamente con la presencia de contaminación fecal. La evaluación de la calidad microbiológica del agua se basa en la detección de grupos de microorganismos indicadores de contaminación fecal que por lo general no son patógenos (10). El uso de indicadores a la hora de realizar el análisis de calidad microbiológica al agua resulta aún más sencillo ya que un microorganismo indicador es aquel que

presenta un comportamiento similar al microorganismo patógeno en cuanto a la concentración y estabilidad; el microorganismo patógeno suele estar en concentraciones más bajas que las del indicador, este además presenta estabilidad frente a factores ambientales del mismo modo que el microorganismo patógeno. Estas características hacen que la identificación de estos sea más fácil, segura, económica y rápida **(10)**.

La presencia de diferentes tipos de microorganismos en el agua, los cuales presentan características propias de cada grupo, requiere el análisis de forma separada de bacterias, virus y parásitos. Las bacterias han sido ampliamente aceptadas para la evaluación microbiológica del agua puesto que estas se presentan en mayor concentración cuando se evalúa contaminación fecal. Los indicadores para evaluar la contaminación fecal por bacterias por excelencia son los coliformes totales, coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* **(11)**.

Los coliformes totales incluyen microorganismos aerobios y anaerobios facultativos; su microscopía corresponde a bacilos Gram negativos, no forman esporas y su principal característica de diferenciación en los medios de cultivo es la fermentación de la lactosa a 35°C. La mayoría de los géneros que pertenecen a este grupo tienen una amplia distribución en la naturaleza, por lo que no son considerados buenos indicadores a la hora de determinar si la contaminación es o no de origen fecal. Por otro lado *Escherichia coli* se encuentra de manera natural en el tracto gastrointestinal lo que quiere decir que se excreta al medio ambiente vía fecal; esto permite categorizar por excelencia a *E. coli* como indicador de contaminación fecal; además se puede detectar por métodos simples, rápidos y económicos **(12)**.

La Resolución 2115 de 2007 incluye la evaluación de las características físico químicas y microbiológicas del agua para consumo humano y debe enmarcarse dentro de los valores máximos aceptables, los cuales son establecidos teniendo en cuenta los límites de confianza del 95%, para las técnicas con habilidad de detección desde 1 Unidad Formadora de Colonia (UFC) o 1 microorganismo en 100 cm³ de muestra. En esta norma se realiza la cuantificación de coliformes totales y *E. coli* usando sustratos definidos, presencia-ausencia o filtración por membrana, en donde los valores máximos permitidos deben ser de 0 UFC/100 mL. Por otro lado, en la resolución también se especifica que el valor aceptable para *Giardia* y *Cryptosporidium* debe ser cero **(13)**.

La normativa colombiana no reglamenta la detección de virus en el análisis microbiológico de la calidad del agua potable aún cuando la presencia de virus patógenos en bajas concentraciones pueden causar infecciones como es el caso del virus de la hepatitis A, hepatitis E, enterovirus, rotavirus, norovirus, poliovirus, adenovirus entre otros virus patógenos. Esto se debe a que la evaluación de estos microorganismos es dispendiosa en los laboratorios de rutina. Es por ello que los bacteriófagos se proponen como indicadores virales ya que presentan características similares a los virus patógenos tales como: el tamaño, el comportamiento, la concentración y la permanencia en el medio ambiente **(14, 15)**.

4.4 Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan especialmente a bacterias, y se encuentran de manera natural en el medio ambiente; están conformados por una capa de proteínas, denominada cápside que rodea la molécula de ácido nucleico, la que a su vez está conformada por subunidades denominadas capsómeros **(16)**. Se caracterizan por coexistir y evolucionar junto a las bacterias; esto quiere decir que pueden infectar a las bacterias y replicarse en el huésped bacteriano **(17, 18)**

Los fagos que infectan *E. coli* se denominan colifagos y al igual que el grupo de los coliformes y el grupo de los estreptococos y enterococos fecales, los colifagos son diversos, lo que quiere decir

que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos y difieren en aspectos como el tamaño, forma, composición y organización estructural. De igual manera también se diferencian por la manera en la que infectan las células huésped de *E. coli*. Se dividen en dos grupos principales, los colifagos somáticos que se unen directamente a la capa celular externa de la bacterias mientras que los fagos F⁺ específicos se unen directamente a los apéndices de la superficie de las bacterias denominado pili. El uso de fagos somáticos y fagos F⁺ totales como indicadores de contaminación fecal en agua potable se debe a que presentan un comportamiento similar al de los virus causantes de enfermedades de origen hídrico (19).

4.4.1 Fagos somáticos

En este grupo se encuentran miembros líticos de las familias Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae y Microviridae que infectan *E. coli*, *Salmonella* y *Bacteroides*, presentan diferentes morfologías y genomas de ADN (cadena sencilla o cadena doble) e inician la infección uniéndose a receptores específicos de la pared celular del huésped bacteriano. Cuando se realizan los recuentos de fagos en aguas potables, residuales o de uso agrícola los fagos somáticos son fácilmente detectables ya que se encuentran en una concentración de 10^7 - 10^8 UFP/mL (15,16).

Por las razones mencionadas anteriormente, los fagos somáticos son indicadores útiles para evaluar la presencia de virus entéricos en agua potable, agua residual o de uso agrícola, y por lo tanto también funciona como un modelo para evaluar el comportamiento de los virus en los procesos de desinfección y tratamiento de agua potable. Los métodos para detectar fagos somáticos en aguas se realizan mediante ensayos de placa, en las cuales se evidencia una lisis sobre el agar, lo que resulta fácil, rápido y económico (15).

4.4.2 Fagos F⁺

Estos fagos representan un modelo conveniente para evaluar y observar eventos biológicos tales como adsorción y penetración viral, la replicación y traducción del genoma viral, el ensamblaje y la liberación viral, ya que representan los fagos más simples. También son ampliamente estudiados debido a la similitud que presentan frente a virus patógenos entericos como enterovirus (EV), calicivirus, adenovirus (ADV), HAV y virus de la hepatitis E. A diferencia de los fagos somáticos, los fagos F⁺ son capaces de replicarse en el tracto gastrointestinal de mamíferos, pero la probabilidad de que se repliquen en medios acuáticos es baja ya que las condiciones de crecimiento no son las adecuadas (16).

Los fagos F⁺ se unen mediante el pili sexual de la cepa huésped, estos pilis solo las pueden producir aquellas cepas bacterianas Gram negativas como *Salmonella typhimurium* que llevan el plásmido que codifica para este factor y además solo lo producen cuando las bacterias se encuentran en la fase exponencial a temperaturas superiores a 30°C (16). A diferencia de los fagos somáticos, estos fagos se encuentran en menor concentración 10^4 - 10^5 UFP/mL. Con el fin de evaluar y analizar el comportamiento de estos bacteriófagos frente a factores de estrés ambiental, procesos de desinfección y evaluación de calidad se utiliza el fago MS2 (19).

4.4.3 Fagos que infectan *Bacteroides fragilis*

Existen fagos que infectan bacterias anaerobias obligadas; entre estos se encuentran los *Bacteroides fragilis*, los cuales se encuentran generalmente en el tracto gastrointestinal de los mamíferos en grandes cantidades. Los fagos que infectan *Bacteroides fragilis* pertenecen a la familia Siphoviridae, los

cuales se caracterizan por tener colas largas y contráctiles, además de esto poseen genomas dsDNA **(16)**. Se sabe que la cepa *B. fragilis* HSP40 es específica de humanos y es por ello que es útil para distinguir entre la contaminación fecal de origen humano y la contaminación fecal de origen animal. A diferencia de los fagos somáticos y los fagos F+, la detección de *Bacteroides fragilis* requiere de más trabajo, ya que los ensayos de placa requieren de medios de cultivo complejos suplementados con antibióticos, además de esto placas deben incubarse en anaerobiosis **(14)**. Los fagos B40-8 y B56-3 son utilizados para evaluar la resistencia a factores ambientales, procesos de desinfección y/o el comportamiento en los métodos de recuperación **(19)**.

4.4.4 Fago CB390

Con el fin de evaluar la presencia de virus patógenos, se han propuesto varias cepas huésped que puedan ser capaces de detectar bacteriófagos presentes en distintos tipos de agua como agua potable, agua residual y de riego agrícola. Sin embargo, con el propósito de reducir costos se ha buscado una cepa que permita identificar fagos somáticos y F+ de manera simultánea. Es por ello que en el 2008 Guzmán, *et al.*, realizaron una modificación genética a la cepa *E. coli* WG5; recomendada por la International Organization of Standardization (ISO) para detectar colifagos somáticos, a la que le introdujeron el plásmido Famp, el cual le confirió a esta cepa la capacidad de producir pili. Esta cepa modificada *E. coli* CB390 es capaz de detectar de manera simultánea fagos somáticos y específicos (F+), debido a que puede infectar la cepa huésped por medio de la pared y/o el pili sexual. **(1)**

Esta transformación se evaluó en varios ensayos en los cuales se demostró la especificidad de esta cepa para ser infectada por los dos fagos de referencia MS2 y Φ -X174. De igual forma, se realizaron varios ensayos en los que se evaluó la capacidad de detectar de manera simultánea fagos somáticos y específicos (F+) en aguas residuales, aguas de efluentes terciarios y agua de río demostrando también que la sumatoria de las cepas huésped establecidas en los métodos estandarizados por ISO correspondían al número de fagos que detectaba la cepa *E. coli* CB390 con una diferencia significativa no mayor a 0.05 ($p > 0.05$) **(1,3,4)**.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de la cepa *E. coli* CB390 para la detección simultánea de colifagos somáticos y F+ totales como herramienta para evidenciar contaminación viral en muestras de agua potable de la localidad Ciudad Bolívar.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la presencia y concentración de colifagos somáticos y F+ totales en aguas potables.
- Evaluar la presencia y concentración del colifagos CB390 en aguas potables.
- Determinar si la concentración del colifagos CB390 equivale a la suma de la concentración de los fagos somáticos y F+ totales.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Selección de la muestra

El número de muestras se determinó por conveniencia económica con base en los recursos destinados para el proyecto y el tiempo del estudio. Por otro lado para escoger las casas a muestrear se tuvieron en cuenta dos estudios realizados en el laboratorio de indicadores de calidad de aguas y lodos de la Pontificia Universidad Javeriana en donde se evaluó la presencia de microorganismos indicadores como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, coliformes totales y fagos somáticos en agua proveniente de barrios de la localidad de Ciudad Bolívar y Soacha. En el trabajo de grado titulado “Evaluación de la calidad microbiológica del agua potable y residual del barrio Robles y su relación con la salud de la población. Concientización de su uso por medio de talleres a los estudiantes del colegio Amigos de la Naturaleza” se observó la presencia de indicadores de origen fecal en 14 de las 36 casas analizadas debido a la forma de almacenamiento del agua potable y prácticas de higiene dentro de los hogares del barrio Robles (20). Por otro lado, en los barrios Potosí y Caracolí se encontró presencia de indicadores de origen fecal en 9 de las 19 casas evaluadas en estos dos barrios según el trabajo de grado titulado “Evaluación de la calidad microbiológica del agua de consumo en los barrios Caracolí y Potosí de la ciudad de Bogotá y su implicación en la salud de la población” (21). Estos datos permitieron seleccionar las casas a evaluar ya que en años anteriores habían presentado contaminación microbiana.

7.2 Toma de la muestra

Para realizar la toma de la muestra se completó la cadena de custodia en donde se registraron datos acerca de la toma de muestra como fecha y hora de muestreo, número de muestra, lugar de la toma de muestra, y demás datos (Anexo 1). Además de esto, también se registró en la cadena de custodia, la presencia o ausencia de tanques de reserva y dispositivos en los grifos según el punto de muestra. El duplicado de cada una de las muestras se tomó con una diferencia de una semana. Posterior a este paso y antes de realizar la toma de la muestra, se desinfectó el grifo con hipoclorito de sodio (10 mg/L) y se dejó fluir el agua durante 3 minutos para recolectar tres litros de agua en recipientes plásticos previamente esterilizados. Las muestras se refrigeraron a 8°C y se analizaron antes de las 24 horas después de la toma de muestra.

7.3 Protocolos para el análisis de bacteriófagos

7.3.1 Protocolo para el análisis de fagos somáticos

Se realizó la detección de fagos somáticos mediante el método de doble capa de agar, según el método ISO 10705- 2(2000) (22), el cual se describe a continuación:

Previamente se inocularon 50 mL del caldo MSB con 1 mL de cepa huésped *E. coli* WG5 (Tabla 1.) y se incubó a 36°C hasta obtener una absorbancia de 0.3-0.5 (10^8 UFC/mL), ya que en este intervalo las cepa se encuentran en fase exponencial, de acuerdo con la curva de calibración realizada en el laboratorio de indicadores de calidad de aguas y lodos de la Pontificia Universidad Javeriana permitiéndole detectar el fago Φ - x 174 de manera adecuada.

Previo a la filtración de las muestras se añadió a cada frasco 15 mL de $MgCl_2$; con el fin de cambiar la polaridad de la membrana y lograr retener las partículas infecciosas que posea la muestra. Se homogenizó la muestra y se dejó reposar durante 2 minutos. Se filtró el volumen completo (1 L)

de cada recipiente a través de la rampa de filtración haciendo uso de una membrana de celulosa de 0.22 μm . Finalizada la filtración se cortó la membrana en 8 partes iguales y se introdujo en un beaker de 25 mL con 5 mL de buffer eluyente para llevarlo al baño ultrasonido durante 3 minutos.

En condiciones asépticas se pasó 1 mL del eluyente a 5 tubos 13*150 hasta distribuir los 5 mL del beaker. En el mismo tubo se adicionó 1 mL del inóculo de la cepa y 2.5 mL del medio MSAss, el cual previamente se aditivó con solución de cloruro de calcio y ácido nalidíxico. Previo a introducir la mezcla en la caja de petri con una capa de agar MSA se mezcla en vortex con el fin de homogenizar y poder agregar la segunda capa de agar MSA. Por otro lado se preparó un sexto tubo 13*150 el cual contiene 1 mL del inóculo de la cepa *E. coli* WG5 y 2.5 mL de medio MSAss. Esta mezcla se adicionó a una caja de petri con una capa de agar MSA en la cual se sembraron los 8 pedazos de la membrana con la cual se realizó la filtración de la muestra. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C durante 18 horas para reportar el número de UFP por volumen de muestra.

La prueba iba acompañada de un control positivo y un control negativo, para verificar que los resultados eran correctos.

Control positivo: en un tubo 13*150 estéril se adicionó 1 mL de la cepa huésped *E. coli* WG5 junto con 1 mL de fago de referencia Φ - x 174; posteriormente se adicionaron 2.5 mL de agar MSAss, se homogenizó en el vortex y se vierte sobre la caja de agar. Después de solidificado se incuban las placas boca abajo a 37°C durante 18 horas. Luego de esto se deben verificar las placas de lisis sobre el césped bacteriano, las cuales deben corresponder al título de referencia de control realizado en el laboratorio de indicadores de calidad de aguas y lodos de la Pontificia Universidad Javeriana.

Control negativo: Este control se realiza con el fin de verificar el crecimiento bacteriano y se realiza mediante la misma técnica de doble capa de agar, el cual consiste en verter sobre la caja de petri con agar MSA la mezcla de cultivo de *E.coli* WG5 y agar semisólido. Se incubaron las placas boca abajo a 37°C durante 18 horas. Luego de esto se deben verificar las cajas de agar observando el césped bacteriano sin ningún tipo de contaminación.

$$UFP/L = N1 + N2 + N4 + N5 + Nf$$

- UFP/1000 mL: Unidades formadoras de placa/1 L.

Nf : Número total de placas contadas en la caja donde se colocaron los fragmentos

Si no se observa ningún tipo de crecimiento se informa el límite de cuantificación del protocolo <1 UFP/L.

7.3.2 Protocolo para el análisis de fagos F+ totales

Se realizó la detección de fagos F+ totales mediante el método de doble capa de agar, según el método ISO 10705-1 (1995) (23) el cual se describe a continuación:

Previamente se inocularon 50 mL del caldo TYGB con 1 mL de cepa huésped *Salmonella* WG49 (Tabla 1.) y se incubaron a 37°C hasta obtener una absorbancia de 0.3-0.5 (10^8 UFC/mL), ya que en este intervalo la cepa se encuentran en fase exponencial permitiéndole detectar el fago MS2 de manera adecuada.

Previo a la filtración de las muestras se añadió a cada frasco 15 mL de MgCl_2 ; con el fin de cambiar la polaridad de la membrana y lograr retener las partículas infecciosas que posea la muestra. Se

homogenizó la muestra y se dejó reposar durante 2 minutos. Se filtró el volumen completo (1 L) de cada recipiente en la rampa de filtración haciendo uso de una membrana de celulosa de 0.22 um. Finalizada la filtración se cortó la membrana en 8 partes iguales y se introdujo en un beaker de 25 mL con 5 mL de buffer eluyente para llevarlo al baño ultrasonido durante 3 minutos.

En condiciones asépticas se pasó 1 mL del eluyente a 5 tubos 13*150 hasta distribuir los 5 mL del beaker. En el mismo tubo se adicionó 1 mL del inóculo de la cepa y 2.5 mL del medio TYGAss, el cual previamente se aditivó con solución Ca-Glucosa y ácido nalidíxico. Previo a introducir la mezcla en la caja de petri con una capa de agar TYGA, se homogenizó en vortex para poder agregar la segunda capa de agar TYGAss. Por otro lado se prepara un sexto tubo 13*150 el cual contenía 1 mL del inóculo de la cepa *Salmonella* WG49 y 2.5 mL de medio TYGAss. Esta mezcla se adicionó a una caja de petri con una capa de agar TYGA en la cual se sembraron los 8 pedazos de la membrana con la cual se realizó la filtración de la muestra. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C durante 18 horas para reportar el número de UFP por volumen de muestra.

La prueba iba acompañada de un control positivo y un control negativo, para verificar que los resultados eran correctos.

Control positivo: En un tubo 13*150 estéril se adicionó 1 mL de la cepa huésped *Salmonella* WG49 junto con 1mL de fago de referencia MS2, posteriormente se adicionó 2.5 mL de agar TYGAss, se homogenizó en el vortex y se sirvió sobre la caja de agar. Después de solidificado se incubaron las placas boca abajo a 37°C durante 18 horas. Luego de esto se observaron las placas de lisis sobre el césped bacteriano, las cuales deben corresponder al título de referencia de control realizado en el laboratorio de indicadores de calidad de aguas y lodos de la Pontificia Universidad Javeriana.

Control negativo: Este control se realiza con el fin de verificar el crecimiento bacteriano y se realiza mediante la misma técnica de doble capa de agar, el cual consiste en servir sobre la caja de petri con agar TYGA la mezcla de cultivo de *Salmonella* WG49 y agar semisólido. Se incubaron las placas boca abajo a 37°C durante 18 horas. Luego de esto se observó el césped bacteriano sin ningún tipo de contaminación.

$$UFP/L = N1 + N2 + N4 + N5 + Nf$$

- UFP/1000 mL: Número de unidades formadoras de placa/1 L.

Nf : Número total de placas contadas en caja donde se colocaron los fragmentos

Si no se observa ningún tipo de crecimiento se informó el límite de cuantificación del protocolo <1 UFP/L.

7.3.3 Protocolo para el análisis de fagos CB390

Se realizó la detección de fagos somáticos y fagos F+ totales de manera simultánea mediante el método de doble capa de agar, según el método ISO 10705- 2 modificado por Guzmán *et al.*(2008), el cual se describe a continuación:

Previamente se inocularon 50 mL del caldo MSB con 1 mL de cepa huésped *E. coli* CB390 (**Tabla 1.**) y se incubó a 37°C hasta obtener una absorbancia de 0.3-0.5 (10⁸ UFC/mL), ya que en este intervalo las cepa se encuentran en fase exponencial permitiéndole detectar los fagos de referencia de manera adecuada (MS2 y Φ- x 174)

Previo a la filtración de las muestras se añadió a cada frasco 15 mL de MgCl₂; con el fin de cambiar la polaridad de la membrana y lograr retener las partículas infecciosas que posea la muestra. Se homogenizó la muestra y se dejó reposar durante 2 minutos. Se filtró el volumen completo (1 L) de cada recipiente a través de la rampa de filtración haciendo uso de una membrana de celulosa de 0.22 µm. Finalizada la filtración se cortó la membrana en 8 partes iguales y se introdujo en un beaker de 25 mL con 5 mL de buffer eluyente para llevarlo al baño ultrasonido durante 3 minutos.

En condiciones asépticas se pasó 1 mL del eluyente a 5 tubos 13*150 hasta distribuir los 5 mL del beaker, en el mismo tubo se adicionó 1 mL del inóculo de la cepa y 2.5 mL del medio TYGAss, el cual previamente se aditivó con solución CaCl₂, Ca-glucosa, ampicilina y MgCl₂. Previo a introducir la mezcla en la caja de petri con una capa de agar TYGA se mezcló en vortex con el fin de homogenizar y poder agregar la segunda capa de agar MSAss. Por otro lado se preparó un sexto tubo 13*150 el cual contiene 1 mL del inóculo de la cepa *E. coli* CB390 y 2.5 mL de medio MSAss. Esta mezcla se adiciona a una caja de petri con una capa de agar TYGA para luego sembrar los 8 pedazos de la membrana con la cual se realizó la filtración de la muestra. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C durante 18 horas para reportar el número de UFP por volumen de muestra.

La prueba iba acompañada de un control positivo y un control negativo, para verificar que los resultados eran correctos.

Control positivo: en dos tubos 13*150 estériles de manera independiente se adicionó 1 mL de la cepa huésped *E. coli* CB390 junto con 1 mL de fago de referencia Φ- x 174 y MS2; posteriormente se adicionaron 2.5 mL de agar TYGAss, se homogenizó en el vortex y se sirvió sobre la caja de agar, después de solidificado se incubaron las placas boca abajo a 37°C durante 18 horas. Luego de esto se verificaron placas de lisis sobre el césped bacteriano, las cuales deben corresponder al título de referencia del protocolo realizado en el laboratorio de indicadores de calidad de aguas y lodos de la Pontificia Universidad Javeriana.

Control negativo: este control se realiza con el fin de verificar el crecimiento bacteriano y se realiza mediante la misma técnica de doble capa de agar, el cual consiste en verter sobre la caja de petri con agar TYGA la mezcla de cultivo de *E. coli* CB390 y agar semisólido. Se incubaron las placas boca abajo a 37°C durante 18 horas. Luego de esto se verificó el césped bacteriano sin ningún tipo de contaminación.

$$UFP/1000mL = N1 + N2 + N4 + N5 + Nf$$

- UFP/L: Número de unidades formadoras de placa/1 L.

Nf: Número total de placas contadas en caja donde se colocaron los fragmento.

Si no se observa ningún tipo de crecimiento se informa el límite de cuantificación del protocolo <1 UFP/L.

En la **Tabla 1.** se encuentra de manera resumida la cepa huésped, el fago de referencia y los medios de cultivo empleados según el tipo de fago a determinar.

Tabla 1. Cepas y fagos de referencia y medios utilizados para el análisis de fagos somáticos, fagos F+ y colifagos CB390

Fago a determinar	Cepa huésped	Fago de referencia	Medio de cultivo
Somático	<i>E. coli</i> WG5	Φ-X174	MSB, MSAss, MSA
F+	<i>Salmonella</i> WG 49	MS2	TYGB, TYGAss, TYGA
Somático y F+	<i>E. coli</i> CB390	Φ- X 174 y MS2	MSB, TYGAss, TYGA

*MSB: Caldo Scholtens modificado

*MSA: Agar Scholtens modificado

*MSAss: Agar semisólido Scholtens modificado

*TYGB: Caldo triptona, extracto de levadura y glucosa

*TYGA: Agar triptona, extracto de levadura y glucosa

*TYGAss: Agar semisólido triptona, extracto de levadura y glucosa

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las siguientes Tablas se presenta el resultado del recuento de los colifagos somáticos, fagos F+ totales y colifagos CB390 obtenidos a partir de los análisis realizados en el agua potable de la localidad de Ciudad Bolívar y Soacha. Primero se realizará un análisis en relación a la calidad del agua potable que reciben los habitantes de dicha localidad y el posible riesgo por contaminación de virus que esta pueda tener. Segundo, se realiza el análisis para saber si la concentración de colifagos CB390 equivale a la sumatoria de la concentración de los colifagos somáticos y fagos F+ totales.

Tabla 2. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390 en agua potable en el barrio Potosí de la localidad de Ciudad Bolívar.

Casa	Fagos somáticos UFP/L		Fagos F+ Totales UFP/L		Fagos CB390 UFP/L		Descripción estación de muestreo
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	
1	<1*	<1*	<1*	<1*	2	<1*	LCD
2	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD

*Límite de cuantificación del protocolo

UFP/L: Unidades formadoras de placa por un litro de agua analizada

LCD: llave con dispositivo (regulador de caudal, trapo o manguera)

LSD: llave sin dispositivo

Tabla 3. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390 en agua potable en el barrio Caracolí de la localidad de Ciudad Bolívar

Casa	Fagos somáticos UFP/L		Fagos F+ Totales UFP/L		Fagos CB390 UFP/L		Descripción estación de muestreo
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	
3	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
4	<1*	<1*	2	<1*	<1*	<1*	LCD
5	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
6	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
7	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD

*Límite de cuantificación del protocolo

UFP/L: Unidades formadoras de placa por un litro de agua analizada

LCD: llave con dispositivo (regulador de caudal, trapo o manguera)

LSD: llave sin dispositivo

Tabla 4. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390 en agua potable en el barrio Arborizadora baja de la localidad de Ciudad Bolívar.

Casa	Fagos somáticos UFP/L		Fagos F+ Totales UFP/L		Fagos CB390 UFP/L		Descripción estación de muestreo
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	
8	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
9	<1*	<1*	1	<1*	<1*	<1*	LSD

*Límite de cuantificación del protocolo

UFP/L: Unidades formadoras de placa por un litro de agua analizada
 LSD: llave sin dispositivo

Tabla 5. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390 en agua potable en el barrio Candelaria la nueva de la localidad de Ciudad Bolívar

Casa	Fagos somáticos UFP/L		Fagos F+ Totales UFP/L		Fagos CB390 UFP/L		Descripción estación de muestreo
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	
10	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
11	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
12	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
13	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD

*Límite de cuantificación del protocolo

UFP/L: Unidades formadoras de placa por un litro de agua analizada

LSD: llave sin dispositivo

Tabla 6. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390 en agua potable en el barrio Robles de la localidad de Ciudad Bolívar

Casa	Fagos somáticos UFP/L		Fagos F+ Totales UFP/L		Fagos CB390 UFP/L		Descripción estación de muestreo
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	
14	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
15	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
16	<1*	<1*	5	<1*	<1*	<1*	LCD
17	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
18	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LCD
19	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD

*Límite de cuantificación del protocolo

UFP/L: Unidades formadoras de placa por un litro de agua analizada

LCD: llave con dispositivo (regulador de caudal, trapo o manguera)

LSD: llave sin dispositivo

Tabla 7. Resultados del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390 en agua potable en el barrio Arborizadora alta de la localidad de Ciudad Bolívar

Casa	Fagos somáticos UFP/L		Fagos F+ Totales UFP/L		Fagos CB390 UFP/L		Descripción estación de muestreo
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	
20	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LCD
21	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LCD
22	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LSD
23	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	<1*	LCD

*Límite de cuantificación del protocolo

UFP/L: Unidades formadoras de placa por un litro de agua analizada

LCD: llave con dispositivo (regulador de caudal, trapo o manguera)

LSD: llave sin dispositivo

Según los datos registrados en las cadenas de custodia de las muestras analizadas, se observa que en el caso de la casa 1 (**Tabla 2.**) y la casa 4 (**Tabla 3.**) la contaminación puede estar relacionada con la presencia del artefacto adherido al grifo. A diferencia de estas dos muestras, en la casa 9 (**Tabla 4.**) y la casa 16 (**Tabla 6.**), según los datos consignados en las cadenas de custodia, estas casas no contaban con la presencia de un artefacto adherido al grifo, pero sí presentaban tanque de reserva el cual no había sido lavado por más de seis meses; esto podría ser la causa de la presencia de contaminación viral.

La calidad del agua que es suministrada en las casas puede deteriorarse por la infraestructura que presentan los sistemas de abastecimiento de agua, ya que puede verse afectada por la corrosión o los taponamientos de los ductos debido a la formación de biopelículas formadas a causa de los procesos bioquímicos realizados por los microorganismos que se dan a partir de las trazas de materia orgánica que se encuentran en las redes de conducción (**24**).

Estas condiciones de alguna manera pueden explicar la presencia de microorganismos indicadores como Coliformes totales y *E. coli* (datos no publicados) que se detectaron en los análisis realizados en el agua, en donde el intervalo de concentraciones de Coliformes totales se encuentra entre <1 UFC/100 mL y $3,1 \times 10^2$ UFC/100 mL y el intervalo de concentraciones de *E. coli* entre 1 UFC/mL y 1×10^2 UFC/mL. En 15 de las 23 casas muestreadas, se encontró la presencia de alguno de estos dos indicadores. En las casas 1, 2, 3, 4, 20 se observó la presencia de ambos indicadores microbiológicos. Por otro lado también se observó que las casas en las que se detectaron fagos coinciden con la presencia de Coliformes totales y *E. coli*.

Existen varias razones que puedan explicar la contaminación viral y bacteriana detectada en los análisis realizados. En algunos casos, las condiciones de almacenamiento descritas en las cadenas de custodia revelaban que las condiciones de los grifos por donde pasaba el agua no era adecuada ya que presentaban objetos que podían generar o aumentar la contaminación microbiana. Las muestras de agua potable se tomaron directamente del grifo de donde los habitantes tomaban el agua para consumo y preparación de alimentos. Además los habitantes mencionaron que ya contaban con sistema de acueducto y en algunas de las casas presentaban tanques de reserva, los cuales no habían sido lavados en los últimos 6 meses en todas las casas muestreadas para realizar los análisis correspondientes.

De otra parte, se sabe que por las redes de distribución, la concentración de cloro que es añadida; en el caso de la ciudad de Bogotá, disminuye a medida que el agua llega a los distintos puntos de distribución. Esto podría favorecer el aumento de la concentración de microorganismos, debido a que el cloro se inactiva una vez este entra en contacto con compuestos orgánicos e inorgánicos que se encuentren presentes en las tuberías de distribución (**25**).

Oswald *et al.*, 2007, observaron que las prácticas de almacenamiento del agua dentro de los hogares es determinante en la presencia de microorganismos en el agua, ya que se demostró que en los hogares en los que el agua presentaba concentraciones bajas pero adecuadas de cloro y que se encontraba almacenada de manera adecuada no presentaba altas concentraciones de contaminación por microorganismos (**26**). También se puede atribuir el grado de contaminación a la calidad del agua según el punto de captación, ya que se ha demostrado que la disminución de la calidad del agua entre el punto de captación y las condiciones de almacenamiento del hogar es proporcionalmente mayor cuando el agua proveniente del punto de captación presenta algún grado de contaminación (**27**).

Lo anterior puede ser una de las posibles razones por las cuales en cuatro casas se evidenció contaminación microbiológica. Además de esto, también se le puede atribuir la contaminación a la presencia de dispositivos adheridos directamente al grifo ya que se observa que en tres de las cuatro casas en las que se evidenció contaminación había presencia de dispositivos o mangueras en bajas condiciones de limpieza, aún cuando previo a la recolección de la muestra se realizó la desinfección con hipoclorito de sodio (NaClO 100mg/L). Se presume que estos dispositivos influyen de manera negativa en la calidad de agua que consumen las personas que habitan estas casas.

Tabla 8. Frecuencia y porcentaje de muestras positivas para fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390

Variable	Frecuencia	Porcentaje (%)
Fagos Somáticos	0	0
Fagos F+ totales	3	6,52
Fagos CB390	1	2,17
Muestras negativas	42	91,3
TOTAL	46	100

En la **Tabla 8.** se muestran los resultados que se obtuvieron a partir del análisis de fagos somáticos, fagos F+ totales y fagos CB390 en agua potable, en donde se observa que el número de muestras negativas fue mayor (con un porcentaje de 91,3%) al número de muestras en las que se evidenció presencia de fagos. Se evidenció que de las muestras positivas, había mayor presencia de fagos F+ totales (6,52%) seguidos por los fagos CB390 (2,17%).

Tal y como se muestra en la **Tabla 8.** se evidencia que la concentración de los fagos F+ totales es superior a la concentración de colifagos somáticos. **Esto se debe a que los fagos F+ totales son más resistentes a los tratamientos con cloro que se emplean para disminuir la carga microbiana.** La investigación realizada por Duran *et al.* 2003 apoyan esta afirmación ya que se han obtenido resultados en los que se evidencia que después de la desinfección con cloro para fagos somáticos hay una disminución de 1,35 log₁₀/L mientras que para fagos F+ la reducción es de 0,67 log₁₀/L (28).

Esta resistencia al cloro por parte de los fagos F+ totales se puede deber, según explica Sigstam *et al.* 2014 a que como se corrobora en sus resultados, la proteína de la cápside es una característica importante que controla la inactivación de MS2 por el dióxido de cloro ya que el daño a la proteína de la cápside durante la exposición al dióxido de cloro es directamente proporcional a la inactivación del virus (29, 30). Esto podría explicar el porqué la concentración de fagos F+ totales en agua potable de la localidad de Ciudad Bolívar es superior a la concentración de fagos somáticos.

En los resultados presentados anteriormente, se observa que las casas en las que se evidenció presencia de contaminación viral solo se detecta la presencia de un tipo de fago, es decir que en tres muestras positivas (casas 4, 9, 16) solo hubo presencia de fagos F+ totales y en la muestra positiva restante (casa 1) sólo hubo presencia de colifagos CB390.

Los resultados que se obtuvieron permiten determinar la presencia de fagos F+ totales y fagos CB390 en las muestras de agua potable, los cuales pueden estar asociados a los procesos de potabilización o los sistemas que se utilizan para la distribución del agua desde el punto de captación hasta las casas de las localidades analizadas. La presencia de microorganismos indicadores de origen fecal en 4 de las 23 casas analizadas también puede estar asociada con las condiciones de vida ya que se trata de una población vulnerable y en algunos casos las prácticas de higiene que se llevan a cabo en los distintos hogares no son las adecuadas.

En cuanto al segundo objetivo el cual consiste en determinar si la sumatoria de los colifagos somáticos y fagos F+ corresponde a la concentración encontrada de los fagos CB390, no se puede hacer un análisis estadístico que dé respuesta a esta pregunta debido a que en muy pocos de los resultados obtenidos se evidenció la presencia de estos fagos y en muy bajas concentraciones. Sin embargo, si bien solo se cuenta con algunas publicaciones en relación a la evaluación de la cepa CB390 en agua potable **(1,3)**, si se encuentran otros estudios en otros tipos de agua en donde se ha demostrado la efectividad de la cepa CB390 para la detección simultánea de fagos somáticos y fagos F+ totales. (Bailey)

El primer estudio que demostró que la cepa CB390 era capaz de detectar simultáneamente fagos somáticos y fagos F+ fue realizado en la ciudad de Barcelona, España por Guzmán *et al.* 2008. En este estudio se analizaron aguas residuales sin tratar, agua residuales provenientes de plantas de beneficio, agua de río, aguas tratadas con irradiación UV y cloradas y agua potable proveniente de dos plantas de tratamiento de agua. En este último tipo de muestra se evidenció que los fagos somáticos presentaban un mayor porcentaje de prevalencia con un 2,3%, seguido por el porcentaje de prevalencia de 1,3% por parte de los fagos CB390, y no se detectaban los fagos F- específicos **(1)**.

Así mismo, el estudio realizado por Argulló *et al.*, 2016, reporta que en las muestras de agua que fueron analizadas; aún cuando no se trataba de agua potable sino de agua recuperada, después de procesos de tratamiento de agua como la filtración por arena, irradiación UV y cloración, la presencia de fagos RNA F- específicos fue significativamente más abundante que la de fagos somáticos. Estos resultados fueron similares a los que se obtuvieron en el presente estudio tal y como se evidencia en la **Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 6** en donde solo se evidencia presencia de fagos F+ totales **(3)**.

Por otro lado, en este mismo estudio, se analizaron 287 muestras de agua provenientes de grifo en las que se demostró que la mayoría de estas muestras fueron negativas para los tres tipos de análisis de fagos (fagos somáticos, fagos RNA específicos y fagos CB390), pero en aquellas muestras que arrojaron un resultado positivo la presencia de fagos somáticos (2.1 NMP/L) superaba la concentración de los fagos RNA específicos (<1-6 UFP/L). Teniendo en cuenta el número de muestras que fueron analizadas por Agullo *et al.*, 2016 se esperaría que las concentraciones de fagos detectados fueran superiores a las detectadas en el presente estudio, sin embargo, se evidenció que el rango de concentración, el cual se encuentra entre <1 – 6 UFP/L en el estudio realizado por Agullo *et al.* 2016, no es significativamente superior al rango de concentración detectado en las 46 muestras analizadas el cual se encuentra entre <1 – 5 UFP/L **(3)**.

Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo no permiten concluir el comportamiento de la cepa *E. coli* CB390 por el hecho de tratarse de aguas potables en las cuales la concentración microbiana es muy baja, si se puede evidenciar que en otro tipo de aguas la cepa *E. coli* CB390 es útil para la detección simultánea de colifagos somáticos y fagos F+ tal y como se muestra en los artículos ya mencionados y en el estudio que realizó Leiton (2018), de manera simultánea al presente estudio, en donde se observó que la cepa a evaluar es capaz de recuperar las concentraciones de fagos somáticos y fagos F+ totales sin diferencias significativas en dos distintos tipos de agua. En la cuenca del río Bogotá en donde se analizaron un total de 30 muestras, la media en unidades logarítmicas (UL) para fagos somáticos fue de 3.2, para F+ totales de 2.8 y para CB390 fue de 3.1. Por otro lado, para el caso de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en donde se analizaron 30 muestras, la media en UL para fagos somáticos de 5.2, para F+ totales de 3.8, y por último para CB390 de 5.1. A partir de estos resultados se logró concluir que no existen diferencias significativas entre la suma de fagos somáticos y F+ totales y el fago CB390. Por otro

lado y basados en los resultados obtenidos en el estudio mencionado, la cepa evaluada *E. coli* CB390 puede ser propuesta como una alternativa frente al uso de fagos somáticos y fagos F+ totales para ahorrar tiempo y dinero en los análisis de calidad del agua **(31, 32)**.

9. CONCLUSIONES

- Las concentraciones de fagos F+ totales detectadas en el estudio se encuentran entre 1 y 5 UFP/L. Por el contrario, no fue posible detectar la presencia de fagos somáticos.
- Solo fue posible detectar la presencia de fagos CB390 en una de las 23 casas muestreadas, con una concentración de 2 UFP/L.
- El uso de estos fagos en el estudio permitió evaluar la calidad del agua potable en la localidad de Ciudad Bolívar. Sin embargo, las concentraciones de fagos que se detectaron en los análisis realizados, no permiten determinar si la cepa *E. coli* CB390 es capaz de detectar de manera simultánea los fagos somáticos y fagos F+ totales en concentraciones similares.


10. BIBLIOGRAFÍA

1. Guzman C, Mocé L, Lucena F, Jofre J. Evaluation of *Escherichia coli* Host Strain CB390 for Simultaneous Detection of Somatic and F-Specific Coliphages, *Applied and environmental microbiology*, 74(2): 531-534, 2008. DOI: 10.1128/AEM.01710-07.
2. Ríos S, Agudelo R, Gutierrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad de agua para consumo humano, *Rev. Fac. Salud pública*, 35(2): 236 - 247, 2017. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.
3. Argulló M, Galofre B, Sala L, García C, Lucena F, Jofre J. Simultaneous detection of somatic and F specific coliphages in different settings by *Escherichia coli* strain CB390, *FEMS. Microbiology Letters*, 363: 1-5, 2016. DOI: 10.1093/femsle/fnw180.
4. Bailey E, Price M, Casanova L, Sobsey M. *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: 25-28, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.016>
5. Sobsey M, Bailey D, Witsil T, Karon A. Methods to detect fecal indicator viruses and protozoan surrogates in NC reclaimed water: Optimization, performance evaluation, protocol development, validation, collaborative testing, and outreach. Department of Environmental Sciences and Engineering. University of North Carolina at Chapel Hill, Report No. 448. 2014.
6. Tobón S, Agudelo R, Guitierrez L. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para el consumo humano. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 35(2):236-247. 2017. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.
7. World Health Organization and the United Nations Children's Fund (2000) Global water supply and sanitation assessment, 2000 report. Available: http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/globalassessment/en/.
8. World Health Organization and United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (2017) World Water Assessment Programme. Available: <http://unesdoc.unesco.org/images/0012/001295/129556s.pdf>.
9. Ruiz M, Mora G, Salgado G, Alario A, Gomez D. Analysis of Health Indicators in Two Rural Communities on the Colombian Caribbean Coast: Poor Water Supply and Education Level Are Associated with Water-Related Diseases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 97(5): 1378-1392. 2017. doi:10.4269/ajtmh.16-0305.
10. Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Tin K. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective, *Water, air and soil pollution*. 166: 139- 166. 2005.
11. Larrea J, Rojas M, Romeu B, Rojas N y Heydrich M. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44 (3): 24-34, 2013.
12. Paruch A, Mahlum T. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment, *Ecological Indicators* 23: 140–142, 2012.
13. Resolución 2115 de 2007. Características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Recurso web: <http://www.sui.gov.co/suibase/formatosEstratificacion/normatividad/Res.%202115%20de%2002007.pdf>. Consultado: 25 de febrero de 2015.
14. Gantzer C, Maul J, Audic M and Schwartzbrod L. Detection of infectious enteroviruses, enterovirus genomes, somatic coliphages, and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater, *Applied And Environmental Microbiology*, 64(11): 4307–4312, 1998. Disponible en: 0099-2240/98/\$04.00+0

15. Grabow W. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water, *Water SA*, 27(2): 251-268, 2001.
16. Hodgson K, Torok V, Turnbull A. Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management, *Food Microbiology*, 65: 284-293, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.003>
17. Brüssow H, Canchaya C, Hardt W. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68:560-602, 2004. DOI: 10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004
18. Russel D, Walling J. Waterborne pathogens in urban watersheds, *Journal Of Water and Health*, 5(1):149-162, 2007. DOI: [0.2166/wh.2006.001](https://doi.org/10.2166/wh.2006.001).
19. Lucena F, Jofre J. Potential use of bacteriophages as indicators of water quality, wastewater treatment processes, *Bacteriophages In The Control Of Food- & Waterborne Pathogens*, 6: 103-118, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/9781555816629.ch6>
20. Venegas C. “Evaluación de la calidad microbiológica del agua potable y residual del barrio Robles y su relación con la salud de la población. Concientización de su uso por medio de talleres a los estudiantes del colegio Amigos de la Naturaleza.” Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2010.
21. Torres M. “Evaluación de la calidad microbiológica del agua de consumo en los barrios Caracolí y Potosí de la ciudad de Bogotá y su implicación en la salud de la población ” tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2015.
22. **ISO 10705- 2: 2000.** Water Quality- Detection and Enumeration of Bacteriophages- Part 1: Enumeration of Somatic Phages.
23. **ISO 10705- 1: 1995.** Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages- Part 1: Enumeration of F- specific RNA bacteriophages.
24. Momba M , Kaleni P. Regrowth and survival of indicator microorganisms on the surfaces of household containers used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa, *Water Research*, 36: 3023-3028, 2002.
25. Latorre R. Efecto hidráulico de las biopelículas en tuberías de agua potable. Bogotá: Universidad de Los Andes, 2005. Recurso web: http://dspace.uniandes.edu.co/xmlui/bitstream/handle/1992/699/MI_ICYA_2004_016.pdf?sequence=1.
26. Oswaldo W, Lescano A, Bern C, Calderon M, Cabrera L, Gilman R. Fecal Contamination of Drinking Water within Peri-Urban Households, Lima, Peru, *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (4): 699-704, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.699>
27. Wright J, Gundry S, Conroy R. Household drinking water in developing countries: a systematic review of microbiological contamination between source and point-of-use, *Trop Med Int Health*, 9 : 106-117, 2004.
28. Duran A, Muniesa M, Mocé-Livina L, Campos C, Jofre J y Lucena F. Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination, *Journal of Applied Microbiology*, 95: 29-37, 2003.
29. Sigstam T, Rohatschek A, Zhong Q, Brennecke M, Kohn T. On the cause of the tailing phenomenon during virus disinfection by chlorine dioxide, *Water Res.* 48: 82-89, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.023>.
30. Sigstam T, Gannon G, Cascella M, Pecson B, Wigginton K, Kohn T. Subtle differences in virus composition affect disinfection kinetics and mechanisms, *Appl. Environ. Microbiol*, 79: 3455-3467, 2013. <https://doi.org/10.1128/AEM.00663-13>.
31. Leiton N. Evaluación de la cepa huésped *E. coli* (CB390) para la detección simultánea de fagos somáticos y F+ totales como herramienta para evidenciar contaminación viral en agua superficial y residual. Trabajo de grado (Microbióloga). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, 2018.

32. Campos C, Venegas C, Riaño L, Castaño P, Leiton N, Riaño E. Aptness of strain CB390 of *E. coli* to detect total coliphages in Colombia. Artículo en publicación.

ANEXO 1.

 <p>Pontificia Universidad JAVERIANA Bogotá</p> <p>LABORATORIO DE INDICADORES DE CALIDAD DE AGUAS Y LODOS</p>		<p>CADENA DE CUSTODIA</p>				CODIGO: <i>DM-LIAL-F 024</i>	
						VERSIÓN: 07	
						VIGENTE: 2017-04-25	
ZONA DE MUESTREO		DIRECCION TOMA MUESTRA		CODIGO DE MUESTRA		CODIGO INTERNO	
NOMBRE SOLICITANTE		EMPRESA		E-MAIL EMPRESA			
INFORMACIÓN DE LA MUESTRA							
TIPO DE MUESTRA:	Agua Potable	Agua Residual	Lodo	Biosólido	Suelo	Vegetales	
	Agua superficial	Otro	Cual				
Fecha:		Hora:		Muestra:	Puntual	Compuesta	
Numero de recipientes:		Contramuestra:	Si	No			
Dosificaciones: (Cantidad y frecuencia de aplicación de reactivos que se utilicen para la potabilización o mantenimiento del agua de piscina o tratamiento de aguas residuales. Se deben informar en unidades de masa (g, mg, kg etc.) o volumen (L, mL, µl etc.)							
El análisis lo solicita directamente la empresa o un tercero. Cuál?							
Descripción climática: (Hace referencia a la temperatura, al registro o no de precipitaciones (lluvia) y a la radiación solar en el lugar de muestreo. Cuando aplica)							
Responsable Toma de Muestra: (En caso de que la cadena de custodia sea enviada vía mail, la firma debe ser electrónica o escaneada)							
Nombre:		Cédula:		Teléfono:		Móvil:	
Entidad:							
Cargo:							
Firma e identificación:							
Recepción de la muestra							
Nombre:		Hora:		Temperatura de Conservación:			
Fecha:				Muestra Conforme:			
Firma e identificación							
ANÁLISIS A REALIZAR							
Microbiológicos							
Coliformes Fecales				Salmonella spp.			
Numero Mas Probable NMP		Filtración por Membrana		Numero Mas Probable NMP			
<i>Escherichia coli</i> y <i>Coliformes totales</i>		<i>Enterococos</i>		<i>Clostridium</i>			
Filtración por Membrana		Filtración por Membrana		Filtración por Membrana			
Fagos Somaticos		Fagos F Especificos		Fagos <i>Bacteroides fragilis</i>			
Recuento de <i>Giardia</i> spp y <i>Cryptosporidium</i> spp		Huevos de Helminto					
Bioensayos							
<i>Hydra attenuata</i>		<i>Daphnia magna</i>		<i>Eisenia foetida</i>			
<i>Lactuca sativa</i>		<i>Selenastrum</i> spp		<i>Vibrio fischeri</i>			
Observaciones:							
<p>NOTA: Favor diligenciar todos los espacios del presente formato. En caso excepcional coloque la palabra NO APLICA</p>							
La cadena de custodia debe llegar con la muestra o ser enviada al laboratorio antes que ésta llegue, de lo contrario NO SE RECIBIRÁ LA MUESTRA							
Carrera 7ª 43-82, Edificio Angel Valtierra S.J. (51), Laboratorio 235. Telefono 3208320 ext. 4156 ó 4165, Bogotá D.C –Colombia							
Autorización de Uso		N° Consecutivo		204			
Realizó		Camilo Venegas B		Revisó y Aprobó		Claudia Campos	