



Universidad de Barcelona
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

Bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 en aguas

Vº Bº del Director de la tesis

Dr. Joan Jofre Torroella

Memoria presentada por
M^a Teresa Muniesa Pérez
para optar al grado de
Doctor en Biología

Barcelona, Julio de 1998

Programa de doctorado: Microbiología Ambiental y Biotecnología
Bienio: 94-96

Capítulo 3

3.3.- Resultados

3.3.1. Estudio de persistencia de bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2

3.3.1.1.- Persistencia de los fagos portadores del gen de la Stx 2 ante procesos de inactivación natural

3.3.1.1.1.- Presencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en agua de río

Las muestras provenientes del río Llobregat se escogieron como ecosistema natural para estudiar la influencia de los factores de inactivación natural sobre los fagos portadores del gen de la Stx 2. A continuación se presentan los resultados obtenidos para las tres muestras provenientes del río Llobregat analizadas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.- Valores de coliformes fecales (ufc/ml) y de colifagos somáticos y de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7 (ufp/ml). Resultados de la presencia/ausencia de fagos portadores del gen de la Stx 2 en el agua de río.

Muestra	Coliformes fecales ^(a)	Colifagos somáticos	Fagos O157:H7	Presencia/ausencia de fagos portadores de Stx 2 ^(b)			
				Volumen de enriquecimiento			
				100	10	1	0,1
1	5,0.10 ²	4,5.10 ²	1,1.10 ¹	+	+	-	-
2	6,3.10 ²	9,2.10 ¹	2,5.10 ¹	+	+	-	-
3	5,2.10 ²	5,4.10 ¹	8,3.10 ⁰	+	-	-	-

(a) Datos obtenidos y cedidos por Jordi Dellundé

(b)+ Presencia en el volumen indicado
 - Ausencia en el volumen indicado

Se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para *E. coli* O157:H7 en los sobrenadantes de cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados de 100 y 10 ml de agua de río en dos de las muestras analizadas y de 100 ml en la tercera de las muestras.

3.3.1.1.2.- Experimentos de inactivación natural "*in situ*"

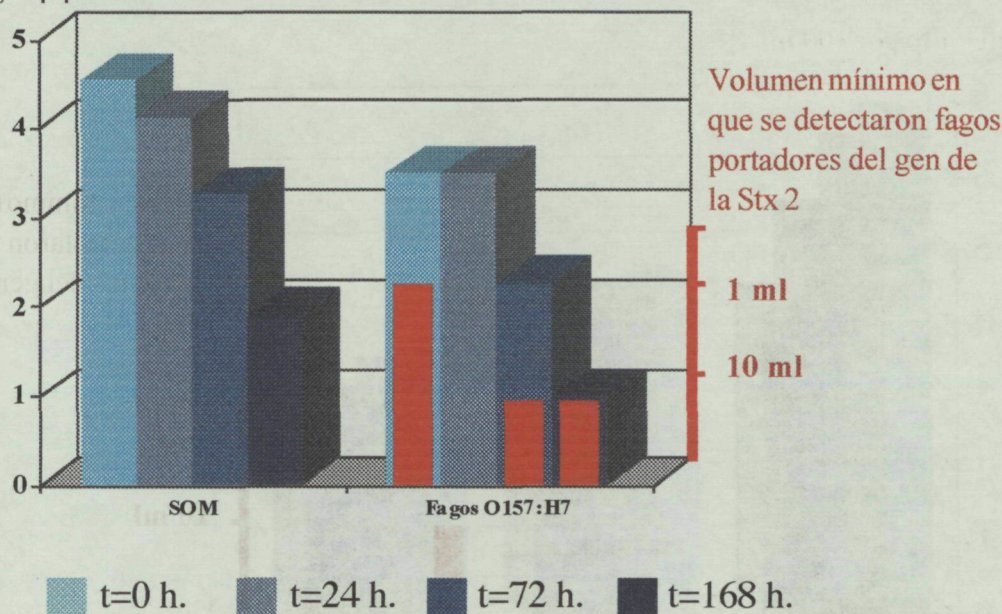
Los resultados obtenidos en los experimentos de simulación de inactivación natural muestran que los bacteriófagos, tanto colifagos somáticos como fagos infecciosos para O157:H7, presentaron tasas de inactivación muy inferiores a *E. coli* O157:H7.

En la gráfica 3.1 se puede observar este efecto mediante la expresión logarítmica de los valores obtenidos de cada uno de los parámetros estudiados (*E. coli* O157:H7, colifagos somáticos y fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7) en cada uno de los tres experimentos realizados y a los diferentes tiempos de estudio.

Gráfica 3.1.- Resultados de los experimentos de inactivación natural "*in situ*". Expresión gráfica de los valores obtenidos para los *E. coli* O157:H7 (log ufc/100 ml), colifagos somáticos y bacteriófagos infecciosos para O157:H7 (log ufp/100ml). Asimismo se indica el volumen mínimo de agua residual utilizada para infectar enriquecimientos en los que se detectaron fagos infecciosos para O157:H7 portadores del gen de la Stx 2.

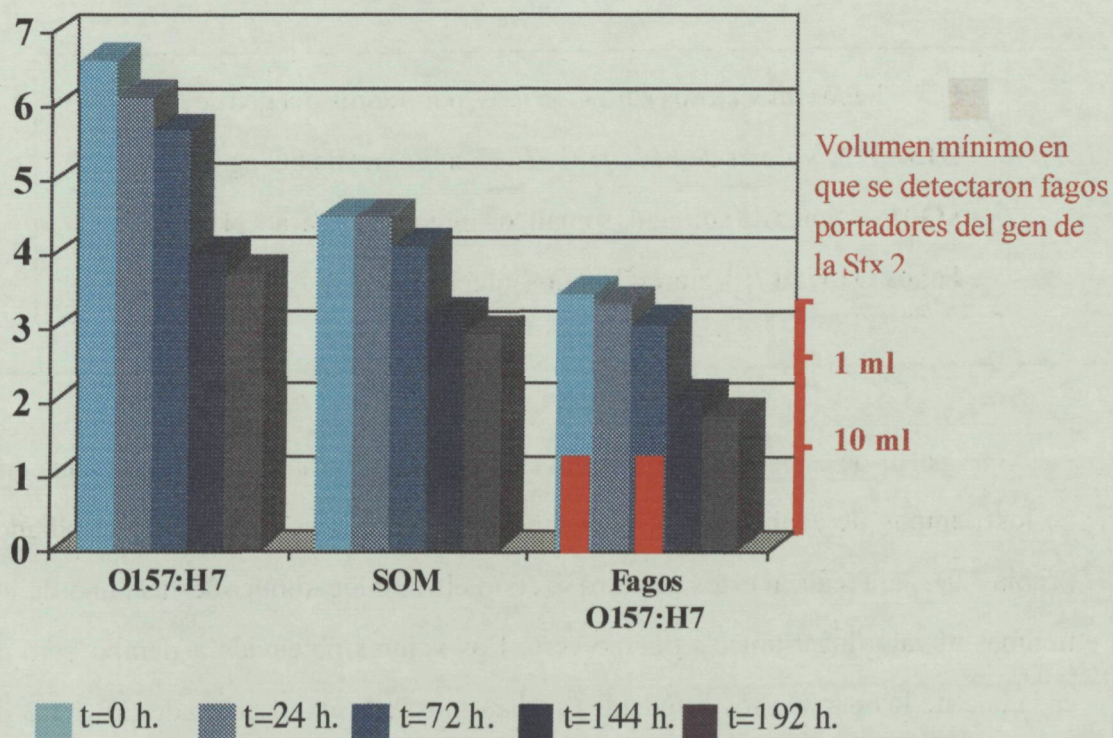
Experimento A

log ufp por 100ml



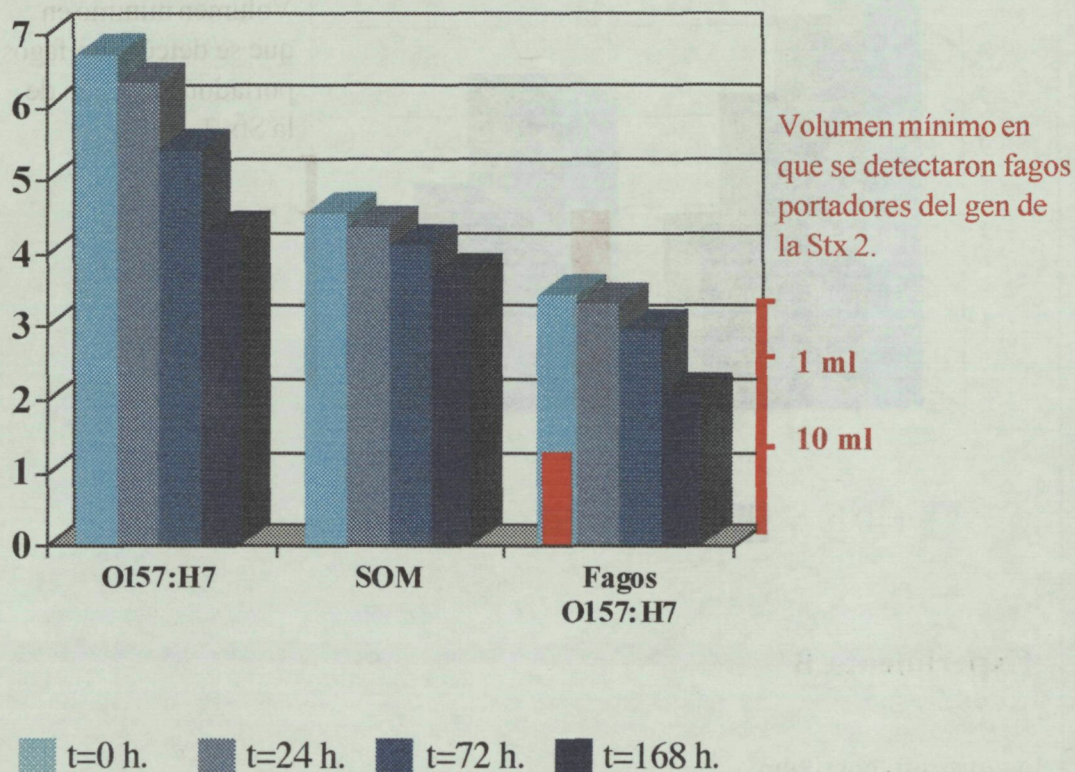
Experimento B

log ufc / ufp por 100 ml



Experimento C

log ufc / ufp por 100 ml



■ Fagos infecciosos para O157:H7 portadores del gen de la Stx 2

- **O157:H7**: Valores de *E. coli* O157:H7 sobre medio FC-agar a 37 °C
- **SOM**: Valores de colifagos somáticos infecciosos para CN13
- **Fagos O157:H7**: Valores de fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7

A partir de estos datos, se calculó la reducción decimal producida en cada uno de los tiempos de análisis desde el tiempo 0, para los tres parámetros estudiados (Tabla 3.2). Para realizar estos cálculos se restó el valor logarítmico de cada uno de los tiempos al valor logarítmico a tiempo cero. Los valores obtenidos a tiempo cero de cada uno de los parámetros estudiados se han mostrado en el apartado 3.2.1.1.2 de Materiales y Métodos de este capítulo.

Tabla 3.2.- Reducción decimal^(a) para los parámetros estudiados a los diferentes tiempos de análisis. Volumen mínimo con que se infectaron los cultivos de enriquecimiento en que se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2.

	Tiempo	CF (O157:H7)	Colifagos somáticos	Fagos O157:H7	Fagos portadores del gen de la Stx 2 (b)
Experimento	0 h.	-	-	-	1 ml
A	24 h	-	0,4	0	- (c)
	72 h	-	1,3	1,1 ^(d)	10 ml
	168 h	-	2,6	2,4 ^(d)	10 ml
Experimento	0 h.	-	-	-	10 ml
B	24 h	0,5	0	0,1	-
	72 h	1,0	0,4	0,4	-
	144 h	2,6	1,4	1,4 ^(d)	10 ml
	192 h	2,9	1,6	1,7	No Detectados (e)
Experimento	0 h.	-	-	-	10 ml
C	24 h	0,4	0,2	0,1	-
	72 h	1,3	0,5	0,4 ^(d)	-
	168 h	2,4	0,8	1,3 ^(d)	No Detectados

(a) Resultados calculados de sustraer el valor logarítmico de titulación en cada tiempo y para cada parámetro de su respectivo valor logarítmico a tiempo cero.

(b) Volumen mínimo de muestra, utilizado para infectar el cultivo de enriquecimiento, donde se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2.

(c) No se analizaron fagos portadores del gen de la Stx 2 en estos tiempos (ver apartado Materiales y Métodos de este capítulo).

(d) El error cometido en el cálculo de estos valores puede ser superior al resto debido al bajo número de ufp contados (aproximadamente 10 ufp/10 ml).

(e) No se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2.

En el experimento A, se observó que los colifagos somáticos y los fagos que infectan a O157:H7 presentaron una inactivación muy similar. Este hecho se confirmó en los experimentos B y C. Asimismo en estos dos experimentos (B y C) *E. coli*

O157:H7 presentó una inactivación claramente superior a la de los dos grupos de bacteriófagos.

En cuanto a los fagos infecciosos para O157:H7 portadores del gen de la Stx 2 se observó también una inactivación inferior a la de *E. coli* O157:H7 y aparentemente también inferior a la del conjunto de los fagos que infectan a O157:H7 y a los colifagos somáticos, en los tres experimentos realizados.

La reducción decimal de los fagos infecciosos para O157:H7 puede presentar mayor margen de error que los otros parámetros analizados, sobretodo a los tiempos finales de cada experimento, debido a la baja cantidad de ufp contados (aproximadamente 10 ufp/10 ml).

(*)NOTA

3.3.1.2. Experimentos de inactivación por tratamiento con cloro

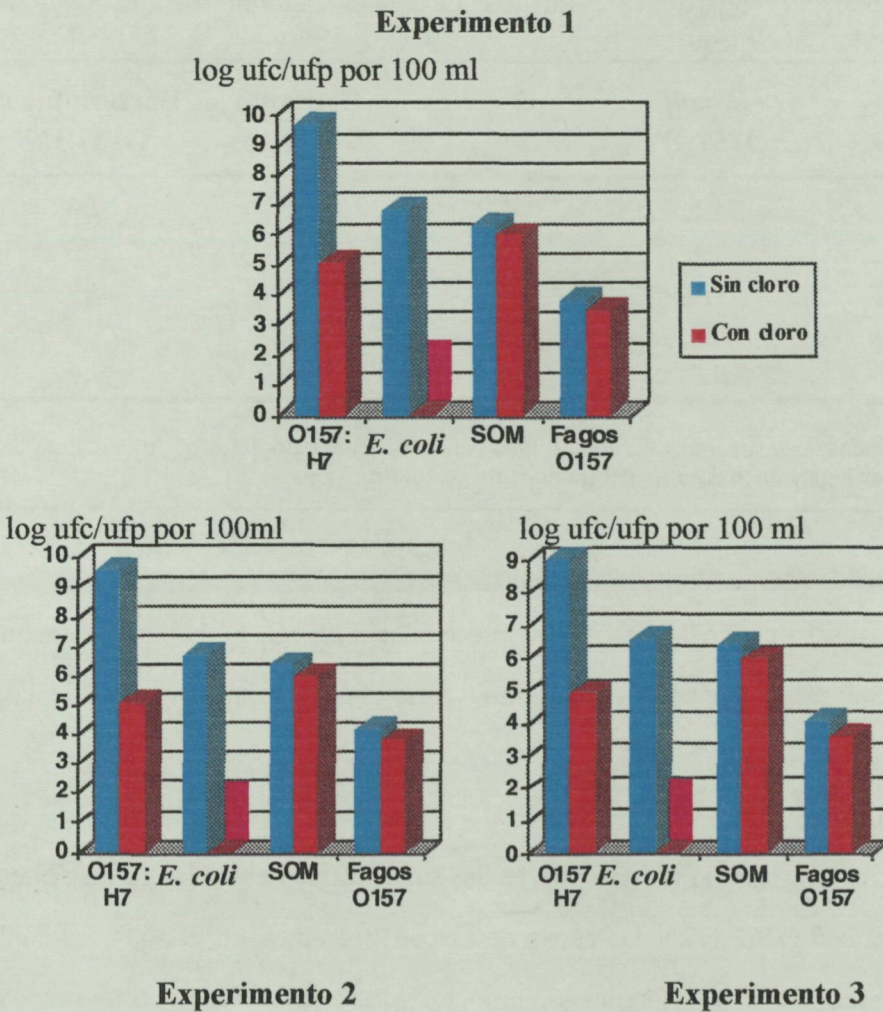
3.3.1.2.1.- Experimentos de inactivación de *E. coli* O157:H7 y de los bacteriófagos que la infectan por tratamiento con cloro

En la gráfica 3.2 se presentan los resultados que se obtuvieron en los tres experimentos de tratamiento con cloro en los que se estudió la diferente inactivación que tuvo lugar por acción del cloro en *E. coli* O157:H7 y los bacteriófagos que la infectan.

NOTA:

Estos experimentos fueron usados para estimar la inactivación diferencial de los diferentes morfotipos de colifagos somáticos. Los resultados se presentan posteriormente en el apartado 3.3.2.5.2 de este capítulo.

Gráfica 3.2.- Representación gráfica de los valores logarítmicos de los recuentos realizados para *E. coli* O157:H7, *E. coli*, colifagos somáticos (SOM) y bacteriófagos infecciosos para O157:H7 en los tres experimentos de tratamiento con cloro.



■ ufc no detectadas en el análisis debido a las diluciones utilizadas
(la banda señala el límite de detección).

Se puede observar una inactivación superior de las bacterias respecto a los bacteriófagos. En concreto *E. coli* O157:H7, detectada con FC-agar, se inactivó muchísimo más que los bacteriófagos que la infectan.

A partir de estos datos, se pueden calcular las reducciones logarítmicas de cada parámetro producidas por efecto del tratamiento con cloro (Tabla 3.3).

Tabla 3.3.- Reducción logarítmica^(a) de los diferentes parámetros estudiados producida por acción del cloro.

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i>	Colifagos somáticos	Bacteriófagos O157:H7
Experimento 1	4,5	4,9	0,3	0,4
Experimento 2	4,0	4,6	0,4	0,6
Experimento 3	4,4	4,7	0,4	0,4

(a) Resultados calculados de sustraer el valor logarítmico para cada parámetro antes del tratamiento de su respectivo valor logarítmico después del tratamiento con cloro.

Los colifagos somáticos y los fagos infecciosos para O157:H7 presentaron inactivaciones similares, y en ambos casos muy inferiores a la inactivación de las bacterias.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las reducciones logarítmicas de *E. coli* O157:H7 y las cepas de *E. coli* presentes en el agua residual analizada. Tampoco mostró diferencias entre los dos grupos de bacteriófagos (Colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7). Sin embargo sí mostró diferencias significativas entre los grupos de bacterias respecto a los grupos de bacteriófagos (T-student test. $p < 0,05$).

NOTA:

Estos experimentos fueron usados para estimar la inactivación diferencial de los diferentes morfotipos de fagos infecciosos para O157:H7. Los resultados se presentan posteriormente en el apartado 3.3.2.5.3 de este capítulo.

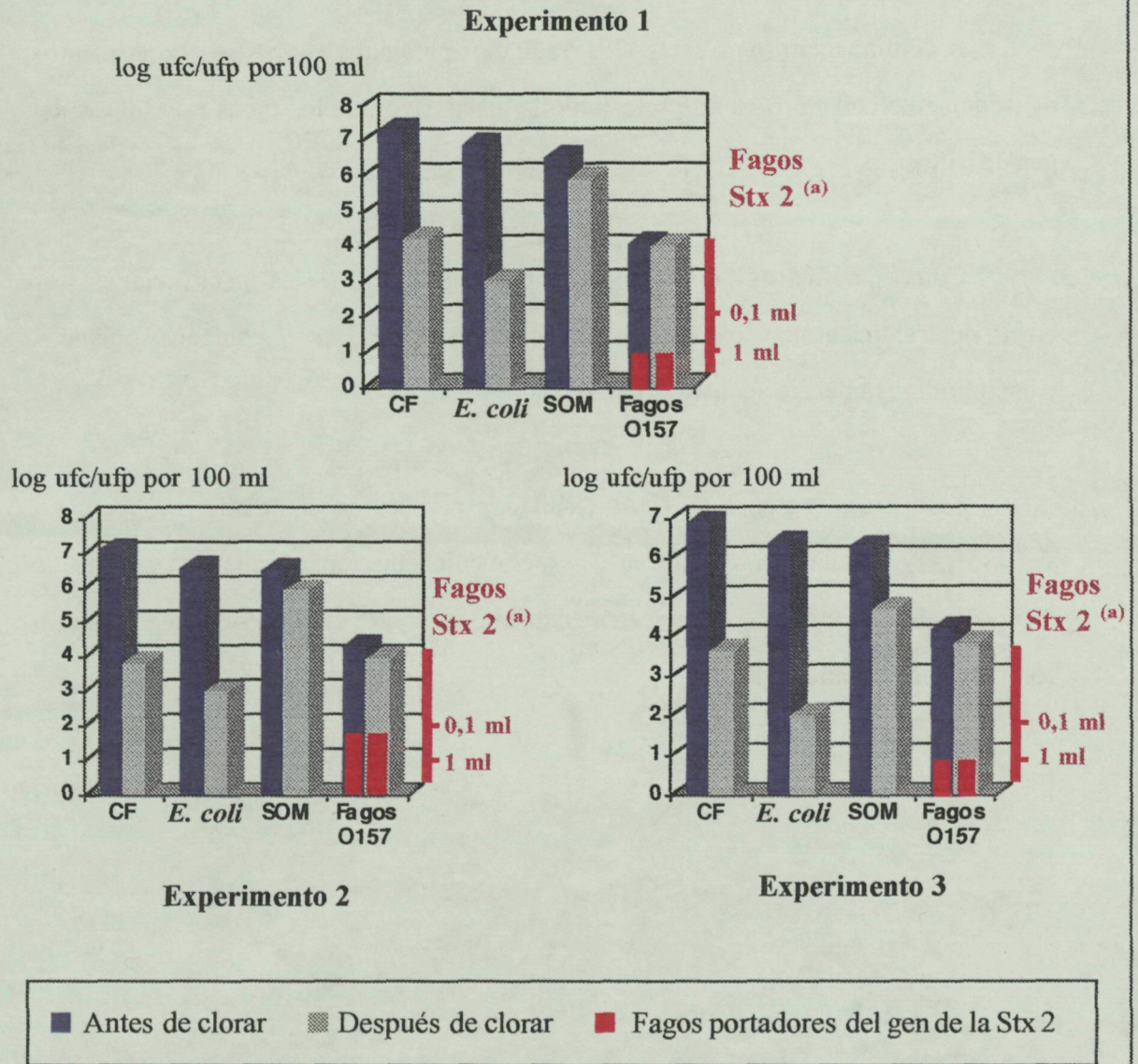
3.3.1.2.2.- Experimentos de inactivación de los fagos portadores del gen de la Stx 2 por tratamiento con cloro.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los tres experimentos de tratamiento con cloro en que se estudió la inactivación de los fagos portadores del gen de la Stx 2.

Como parámetros de referencia se estudiaron además las inactivaciones por efecto del tratamiento con cloro de coliformes fecales (CF), *E. coli*, colifagos somáticos y bacteriófagos infecciosos para O157:H7.

La expresión gráfica de estos resultados permite observar que presentan un aspecto muy similar al obtenido en el experimento anterior, aunque con niveles de coliformes fecales evidentemente menores, dado que en este caso no se realizó inóculo con O157:H7 (Gráfica 3.3).

Gráfica 3.3.- Representación gráfica de los valores logarítmicos de los recuentos realizados para coliformes fecales, *E. coli*, colifagos somáticos (SOM) y bacteriófagos infecciosos para O157:H7 en 100 ml de agua analizada en los tres experimentos en que se aplicó el tratamiento con cloro.



(a) Volumen mínimo de muestra de donde se purificaron fagos con los que se infectó el cultivo de enriquecimiento en que se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2.

La inactivación producida por acción del cloro en los parámetros bacteriológicos en los tres experimentos fue, como ya sucedió en el apartado anterior, muy superior a la inactivación que presentaron los colifagos somáticos y los fagos infecciosos para *E. coli* O157:H7.

Dentro del conjunto de fagos que infectan a O157:H7 los fagos portadores del gen de la Stx 2 se detectaron antes y después del tratamiento con cloro en los mismos volúmenes de muestra de donde se purificaron los fagos con los que se infectaron los cultivos de enriquecimiento.

Con estos datos se calculó la reducción logarítmica producida por efecto del tratamiento con cloro. (Tabla 3.4).

Tabla 3.4.- Reducción logarítmica^(a) de los parámetros estudiados por efecto del tratamiento con cloro. Volumen mínimo utilizado para infectar los cultivos de enriquecimiento donde se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 antes y después del tratamiento por cloro.

	CF	<i>E. coli</i>	Colifagos somáticos	Fagos O157:H7	Fagos portadores del gen de la Stx 2 ^(b)	
					Antes de clorar	Después de clorar
Exp. 1	3,2	3,9	0,6	0,1	1 ml	1 ml
Exp. 2	3,3	3,6	0,6	0,3	0,1 ml	0,1 ml
Exp. 3	3,3	4,4	0,5	0,3	1 ml	1 ml

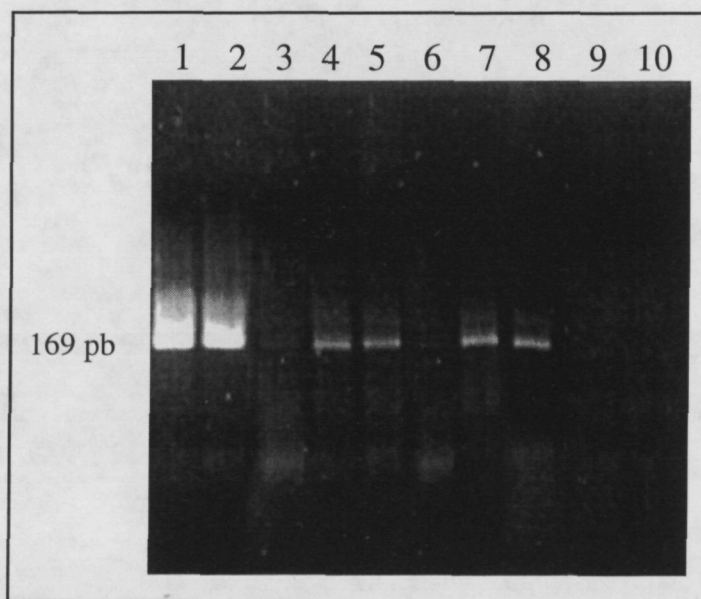
(a) Resultados calculados de sustraer el valor logarítmico para cada parámetro antes del tratamiento de su respectivo valor logarítmico después del tratamiento con cloro.

(b) Volumen mínimo de fagos purificados utilizado para infectar los cultivos de enriquecimiento, donde se detectaron bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2.

Las reducciones logarítmicas de las bacterias fueron significativamente superiores a las de los dos grupos de bacteriófagos estudiados. De éstos los fagos infecciosos para O157:H7 presentaron reducciones sensiblemente menores a las presentadas por los colifagos somáticos y estadísticamente diferentes (T-student test. $p < 0,05$).

Los fagos infecciosos para O157:H7 portadores del gen de la Stx 2 se detectaron en los mismos volúmenes antes y después del tratamiento con cloro, aunque en los experimentos 1 y 3 el volumen mínimo donde se detectaron fue de 1 ml. (Figura 3.1), mientras que en el experimento 2 fue de 0,1 ml.

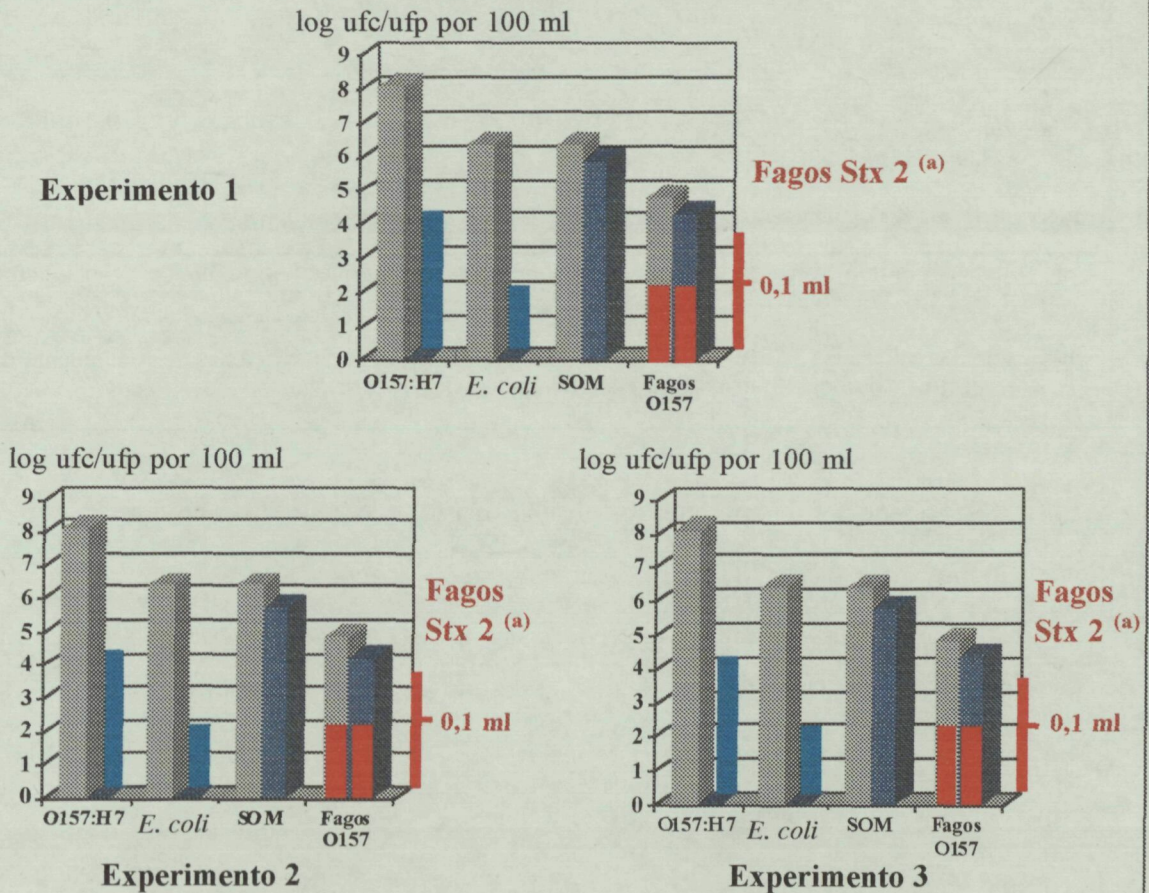
Figura 3.1.- Amplímeros obtenidos por PCR anidada del gen de la Stx 2 en el experimento 1. Carriles 1 y 2 correspondientes al ADN amplificado de *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 (portadora del gen de la toxina) y el fago 933 W respectivamente. Carril 3 correspondiente al ADN amplificado de *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 (no portadora del gen de la toxina) Carriles 4-6 amplificación realizada con el ADN extraído de fagos purificados de cultivos de enriquecimiento infectados con fagos purificados a partir de 10, 1 y 0,1 ml de agua residual, antes del tratamiento con cloro. Carriles 7-9 igual que carriles 4-6 después del tratamiento con cloro. Carril 10 control de amplificación realizado sin incorporación de ADN molde



3.3.1.3.- Experimentos de inactivación por un tratamiento de Pasteurización

En los tres experimentos de pasteurización realizados, se comparó la inactivación de los bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2 con las inactivaciones de *E. coli* O157:H7, *E. coli*, colifagos somáticos y bacteriófagos infecciosos para O157:H7. En la gráfica 3.4 se expresan los valores de los diferentes parámetros antes y después de la pasteurización en tres experimentos independientes.

Gráfica 3.4.- Representación gráfica de los valores logarítmicos de los recuentos realizados para *E. coli* O157:H7, *E. coli*, colifagos somáticos (SOM) y bacteriófagos infecciosos para O157:H7 en los tres experimentos de pasteurización.



■ Antes de pasterizar ■ Después de pasterizar ■ Fagos portadores del gen de la Stx 2
 ■ ufc no detectadas en el análisis debido a las diluciones utilizadas (la banda señala el límite de detección).

(a) Volumen mínimo de muestra de donde se purificaron fagos con los que se infectó el cultivo de enriquecimiento en que se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2.

Con los datos de la gráfica 3.4 se calculó la reducción decimal producida por efecto de la pasteurización en cada uno de los parámetros estudiados (Tabla 3.5).

Tabla 3.5.- Reducción logarítmica de los parámetros estudiados por acción de la pasteurización. Volumen mínimo utilizado para infectar los cultivos de enriquecimiento donde se detectaron fagos portadores del gen de la Stx 2 antes y después del tratamiento de pasteurización

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i>	Colifagos somáticos	Fagos O157:H7	Fagos portadores del gen de la Stx 2 ^(a)	
					Antes de Pasteurizar	Después de Pasteurizar
Exp. 1	>4,0 ^(b)	>4,	0,5	0,3	0,1 ml	0,1 ml
Exp. 2	>4,0	>4,4	0,7	0,6	0,1 ml	0,1 ml
Exp. 3	>4,0	>4,4	0,6	0,4	0,1 ml	0,1 ml

(a) Volumen mínimo utilizado para infectar los cultivos de enriquecimiento donde se detectaron bacteriófagos portadores del gen de la Stx 2.

(b) Resultados calculados de sustraer el valor logarítmico para cada parámetro antes del tratamiento de su respectivo valor logarítmico después del tratamiento de pasteurización.

Se puede observar que los bacteriófagos (colifagos somáticos y fagos infecciosos para O157:H7) presentaron una inactivación muy similar y estadísticamente no presentaron diferencias significativas (T-student test. $p > 0,05$). En ambos casos muy inferior y significativamente diferente (T-student test. $p < 0,05$) a la inactivación presentada por las bacterias (*E. coli* y *E. coli* O157:H7), la cual fue superior en 4 logaritmos a la de los bacteriófagos.

El conjunto de fagos infecciosos para O157:H7 sufrió una inactivación menor a un logaritmo. Aunque no se puede cuantificar exactamente por el procedimiento utilizado, los resultados obtenidos indican que los fagos que transportan el gen de la Stx 2, infecciosos para O157:H7, se inactivaron igualmente menos de 1 logaritmo.

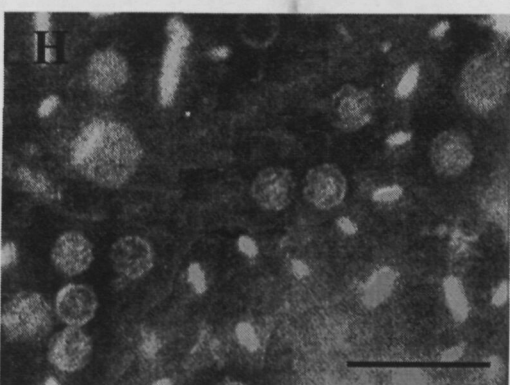
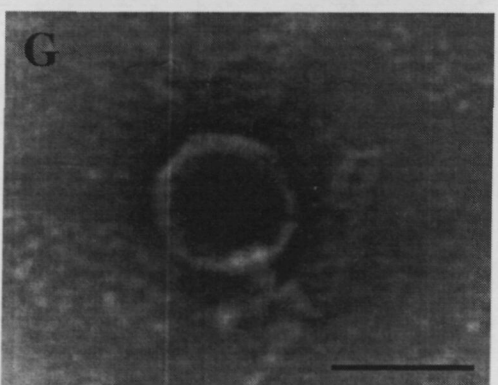
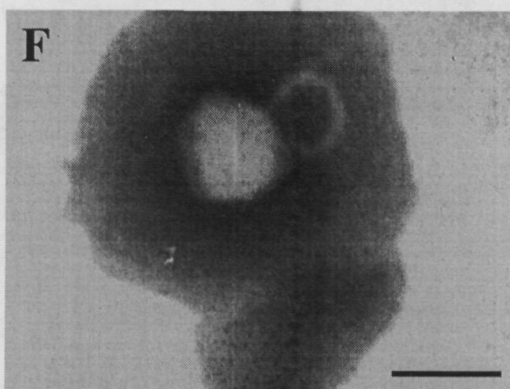
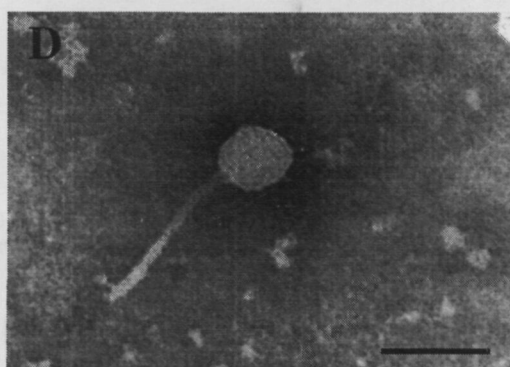
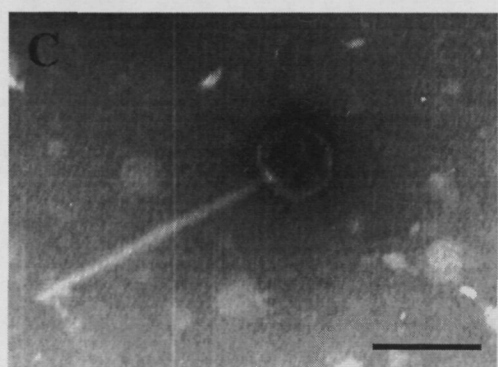
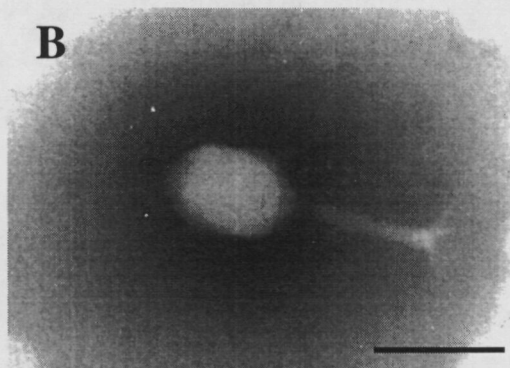
Efectivamente, los fagos portadores del gen de la Stx 2 infecciosos para O157:H7, fueron detectados en los sobrenadantes infectados con fagos purificados de los mismos volúmenes de muestra antes y después del tratamiento. Ésto indica que la inactivación que sufrieron fue nula o menor a un logaritmo.

3.3.2. Estudio de los tipos morfológicos de colifagos presentes en diferentes muestras de agua

3.3.2.1.- Observación de los tipos morfológicos de colifagos

A lo largo de este estudio, se ha determinado la morfología de 670 bacteriófagos presentes en diferentes muestras de agua. Entre todos ellos se observaron fagos con morfología correspondiente a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae*. Dentro de cada grupo morfológico de bacteriófagos, se pudieron además, distinguir subgrupos. Entre los *Myoviridae*, se observaron aislamientos con cápside isométrica y otros con cápside alargada. En el caso de los *Siphoviridae*, se observaron bacteriófagos con cola recta, curvada o rizada. (Figura 3.2).

Figura 3.2.- Micrografías de algunos tipos morfológicos representativos de los colifagos somáticos aislados de las muestras de aguas naturales analizadas en este estudio. **A)** *Myoviridae* con cápside isométrica; **B)** *Myoviridae* con cápside alargada; **C)** *Siphoviridae* con cola recta; **D y E)** *Siphoviridae* con cola curva; **F)** *Siphoviridae* con cola rizada; **G)** *Podoviridae*; **H)** *Microviridae*. La barra corresponde a 100 nm.



3.3.2.2.- Estudio de los efectos producidos por diversos factores metodológicos

3.3.2.2.1.- Efecto del medio de cultivo utilizado y de la filtración de la muestra

Al inicio de este estudio se realizaron unas experiencias en que se observó la posible influencia del medio de cultivo utilizado y el efecto que la filtración previa de la muestra podía tener sobre los porcentajes de morfotipos observados de colifagos somáticos presentes en agua residual.

Dado que para estos estudios se utilizó el mismo tipo de agua residual, se han agrupado los resultados obtenidos a fin de comparar mejor las variaciones producidas por los diferentes factores metodológicos (Tabla 3.6).

Medio de cultivo utilizado

La diferencia de medio provocó que la distribución de los tipos de morfologías de bacteriófagos aislados fuera significativamente distinta, (Fisher's Exact Test $p < 0,05$), (Tabla 3.6).

Filtración

Asimismo se observaron diferencias significativas comparando experiencias en que se filtró la muestra a aquéllas en que no se filtró (Tabla 3.6).

Tabla 3.6.- Efecto del ensayo de medio de cultivo y de la filtración de la muestra en la distribución de tipos morfológicos de colifagos somáticos en agua residual ^(a).

	n ^(b)	%			
		<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	<i>Microviridae</i>
Medio de triptona	100	91,0	6,0	1,0	2,0
Medio Scholten's ^(c)	30	63,6	27,3	0,0	9,1
Muestra filtrada ^(d)	30	34,5	55,2	0,0	10,3

(a) Muestra de agua residual recogida a la entrada de la planta de tratamiento de aguas número 1.

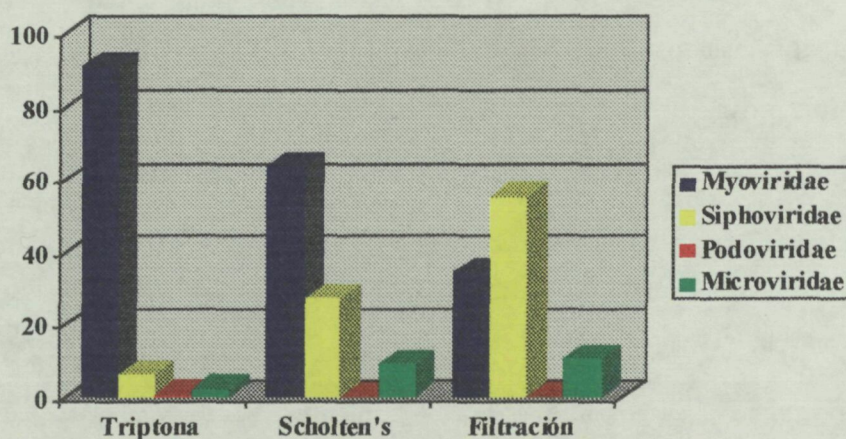
(b) Número de aislamientos de bacteriófagos observados por el microscopio electrónico.

(c) Medio Scholten's modificado (Anexo 1).

(d) Filtrada por membranas de 0,22 µm de baja afinidad para proteínas y utilizando medio de triptona.

A continuación se muestra la representación gráfica de estos resultados

Gráfica 3.5.- Variación en los porcentajes de morfologías de bacteriófagos según el medio utilizado y la filtración previa de la muestra.



No se observaron variaciones significativas respecto a los subtipos internos de los dos tipos mayoritarios de bacteriófagos. En su mayoría correspondieron a fagos tipo *Myoviridae* de cápside isométrica y *Siphoviridae* de cola recta.

Atendiendo a los resultados obtenidos, se decidió utilizar el medio de triptona y no realizar filtración para los estudios que se describen a continuación.

3.3.2.3.- Efecto de la cepa huésped utilizada

Se estudió la posible influencia de la cepa huésped utilizada, sobre los tipos morfológicos de bacteriófagos presentes en muestras de agua residual, utilizando como cepas huésped *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) y *E. coli* CN13.

3.3.2.3.1.- Estudio de las morfologías de los bacteriófagos infecciosos para O157:H7 en muestras de agua residual

Los resultados del estudio de los tipos morfológicos de los bacteriófagos que infectan a *E. coli* O157:H7 presentes en agua residual, indicaron que mayoritariamente esta cepa es infectada por bacteriófagos de morfología tipo *Myoviridae*. En proporciones inferiores se aislaron fagos de morfología tipo *Siphoviridae* y no se aisló ningún otro grupo (Tabla 3.7).

Tabla 3.7.- Porcentajes de morfologías de bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7.

Muestra	ufp/ml	n ^(a)	%					
			<i>Myoviridae</i>			<i>Siphoviridae</i>		
			Cápside isométrica	Cápside alargada	Total	Cola recta	Cola curvada	Total
Agua residual	1,1.10 ²	45	7 % ^(b)	93 % ^(c)	73,3 %	0 % ^(d)	100 % ^(e)	26,7 %

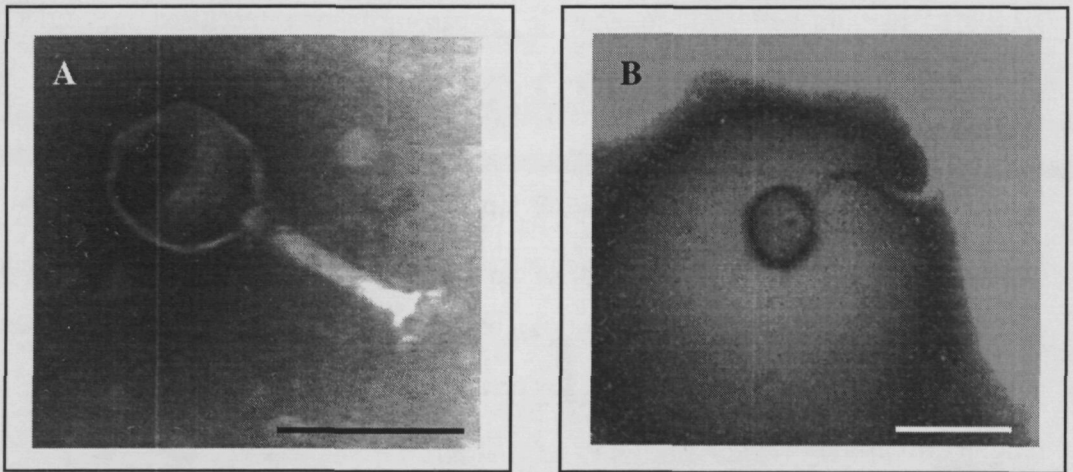
(a) Número de aislamientos de bacteriófagos observados por el microscopio electrónico.

(b,c) Porcentaje de fagos *Myoviridae* de cápside isométrica y alargada respectivamente, respecto al porcentaje total de fagos observados de la morfología *Myoviridae*.

(d,e) Porcentaje de fagos *Siphoviridae* con cola recta y curvada respectivamente, respecto al porcentaje total de fagos observados de la morfología *Siphoviridae*.

Los bacteriófagos de morfología tipo *Myoviridae* que infectan a *E. coli* O157:H7, presentaron cápside alargada en gran mayoría (Figura 3.3.A). Por su parte, la totalidad de bacteriófagos de morfología tipo *Siphoviridae* observados presentaron colas curvadas (Figura 3.3.B).

Figura 3.3- Visualización por microscopía electrónica de bacteriófagos infecciosos para *E. coli* O157:H7. (A) *Myoviridae* de cápside alargada. (B) *Siphoviridae* de cola curvada. Barra equivalente a 100 nm.



3.3.2.3.2.- Morfotipos aislados con *E. coli* CN13

Los resultados de tipos morfológicos de colifagos somáticos presentes en agua residual se mostraron anteriormente en la tabla 3.6, correspondientes a los aislamientos realizados con medio de triptona.

Se observaron diferentes subtipos en las dos morfologías mayoritarias (*Myoviridae* y *Siphoviridae*) de colifagos somáticos presentes en agua residual (Tabla 3.8).

Tabla 3.8.- Porcentajes de morfologías de los tipos morfológicos mayoritarios de colifagos somáticos en agua residual.

Muestra	ufp/ml	n ^(a)	%					
			<i>Myoviridae</i>			<i>Siphoviridae</i>		
			Cápside isométrica	Cápside alargada	Total	Cola recta	Cola curvada	Total
Agua residual	2,3.10 ⁴	100	76 % ^(b)	24 % ^(c)	91 %	83 % ^(d)	17 % ^(e)	6 % ^(f)

(a) Número de aislamientos de bacteriófagos observados por el microscopio electrónico.

(b,c) Porcentaje de fagos *Myoviridae* de cápside isométrica y alargada respectivamente, respecto al porcentaje total de fagos observados de la morfología *Myoviridae*.

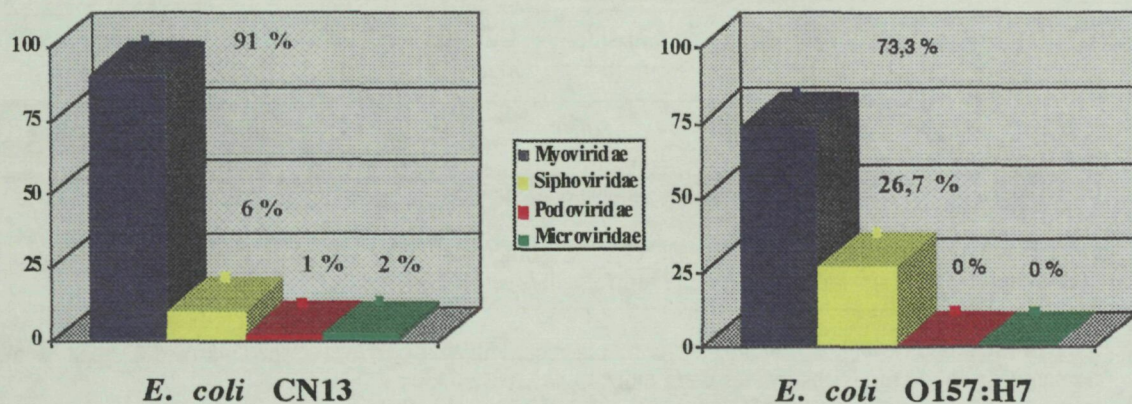
(d,e,f) Porcentaje de fagos *Siphoviridae* con cola recta, curvada o rizada respectivamente, respecto al porcentaje total de fagos observados de la morfología *Myoviridae*.

Como se puede observar en la tabla 3.6, las otras dos morfologías, *Podoviridae* y *Microviridae*, presentaron porcentajes del 1 y 2 % respectivamente. No se comparó posteriormente su mayor o menor persistencia ante procesos de inactivación, ya que con estos porcentajes tan pequeños no son significativas las variaciones observadas.

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, indicó que el porcentaje de bacteriófagos de la morfología *Siphoviridae* que infectan a *E. coli* O157:H7 en muestras de agua residual es significativamente más elevado que en el caso de *E. coli* CN13 (T-student test. $p < 0,05$).

Las diferencias son claramente visibles si se observan estos resultados gráficamente.

Gráfica 3.6.- Comparación de los porcentajes de morfologías de bacteriófagos presentes en agua residual utilizando *E. coli* CN13 y *E. coli* O157:H7 respectivamente, como cepas huésped.



De los aislamientos realizados con ambas cepas, *E. coli* O157:H7 detectó fagos *Myoviridae* de cápside alargada en su mayoría mientras que CN13 detectó mayoritariamente cápside isométrica. De los fagos aislados del tipo *Siphoviridae*, O157:H7 detectó sólo fagos con colas curvadas, mientras que CN13 detectó en su mayoría fagos *Siphoviridae* de cola recta.

A pesar de las diferencias observadas entre los porcentajes de colifagos que infectan a las dos cepas, se continuó utilizando la cepa *E. coli* CN13 para los estudios que se presentan a continuación (*), dado que como ya se ha indicado en la introducción de este capítulo, esta cepa es susceptible de ser infectada por mayor número de colifagos de diversas morfologías (Pedroso y Martins, 1995). Ello permitía detectar, después de los procesos de inactivación, números aún detectables de bacteriófagos.

(*) NOTA: Exceptuando en el estudio de inactivación por tratamiento con cloro, donde se realizaron observaciones de los fagos aislados con ambas cepas, como se muestra posteriormente en el apartado 3.3.2.5.3 de este capítulo.

3.3.2.4.- Estudios de inactivación de los diferentes tipos morfológicos de bacteriófagos

3.3.2.4.1- Estudios de muestras de agua residual y de efluente de depuradora

Las muestras estudiadas (consideradas como muestras con contaminación reciente, que previsiblemente no sufrieron algún tipo de inactivación), no mostraron diferencias significativas (Fisher's Exact Test $p > 0,05$) respecto a la distribución de morfotipos de bacteriófagos (Tabla 3.9).

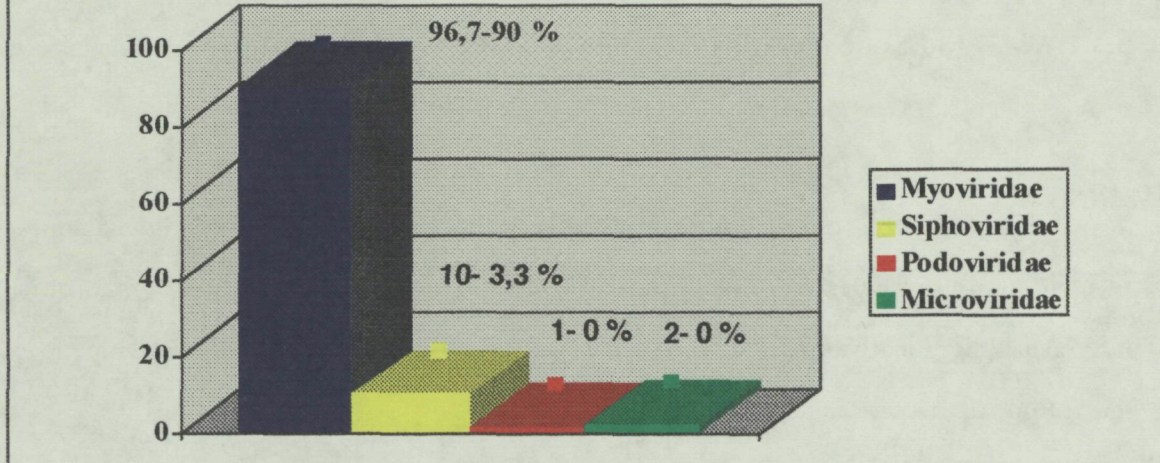
Tabla 3.9.- Distribución de los tipos morfológicos de colifagos somáticos en muestras de contaminación reciente.

Muestra	ufp/ml	n ^(a)	%			
			<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	<i>Microviridae</i>
Planta 1	23000	130	91,0	6,0	1,0	2,0
Planta 2	17500	30	90,0	10,0	0,0	0,0
Matadero	39000	100	92,0	8,0	0,0	0,0
Efluente planta 2	1200	30	96,7	3,3	0,0	0,0

(a) Número de aislamientos de bacteriófagos observados por el microscopio electrónico.

Agrupando estas muestras se puede observar la distribución morfológica de cada tipo morfológico de colifago somático (Gráfica 3.7)

Gráfica 3.7.- En la siguiente gráfica se muestran los porcentajes de las diferentes morfologías en aguas de contaminación reciente.



3.3.2.5.- Estudios en muestras de agua sometidas a procesos de inactivación natural

3.3.2.5.1.- Inactivación natural en un río

En las distribuciones de tipos morfológicos de colifagos somáticos observadas en las muestras procedentes de distintos puntos de un río, donde previsiblemente se produjo una inactivación natural, se pudo observar la variación, en los porcentajes de los tipos morfológicos de colifagos somáticos, al alejarse del origen de la contaminación.

En el punto 1, que se corresponde con las muestras de contaminación reciente (ver Tabla 3.9), presentó una distribución de tipos morfológicos muy similar al de las aguas residuales. Los resultados obtenidos en el punto de muestreo número 1 son significativamente iguales a los resultados obtenidos en las muestras con

contaminación reciente presentados en el apartado 3.3.2.4. (Fisher's Exact Test $p > 0,05$).

En el punto 2, se observó un cambio en los porcentajes de las diferentes morfologías. Este cambio fue más evidente después de un tiempo de residencia en dos pantanos (punto 3). En ambos puntos se observa la misma tendencia, consistente en un descenso del porcentaje de *Myoviridae* y con claro aumento del porcentaje de *Siphoviridae*. Esta tendencia se da hasta el extremo de que en el punto 3 los *Siphoviridae* han pasado a ser el tipo morfológico predominante. Los resultados obtenidos en los tres puntos de muestreo fueron significativamente diferentes (Fisher's Exact Test $p < 0,05$).

Tabla 3.10.- Distribución de tipos morfológicos de colifagos somáticos en diferentes puntos de un río.

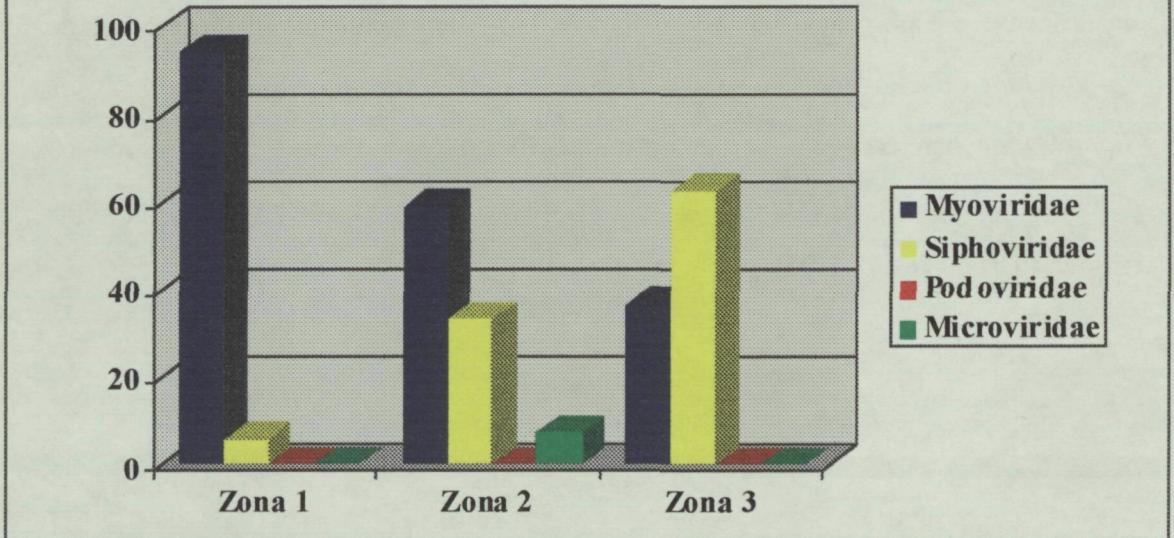
Punto ^(a)	ufp/100 ml	n ^(b)	%			
			<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Podoviridae</i>	<i>Microviridae</i>
1	2,4.10 ⁵	30	94,2	5,8	0,0	0,0
2	2,7.10 ⁴	27	59,3	33,3	0,0	7,4
3	5,0.10 ¹	19	36,8	63,2	0,0	0,0

(a) El punto de muestreo número 1 está situado en una zona del río que recibe influjo de agua con contaminación urbana. El punto número 2 está localizado aproximadamente 4 Km después del punto 1. Punto 3 está situado después de dos lagunas en que el agua del río ha permanecido durante un cierto tiempo.

(b) Número de aislamientos de bacteriófagos observados por el microscopio electrónico.

Los resultados mostrados en la Tabla 3.10 se expresan a continuación gráficamente.

Gráfica 3.8.- Porcentajes de las diferentes morfologías de bacteriófagos en los tres puntos de muestreo del río.



Los diferentes subtipos morfológicos catacterísticos de los dos tipos morfológicos mayoritarios de bacteriófagos se vieron también influidas por el efecto de la inactivación natural. Así, los bacteriófagos de morfología *Myoviridae* en el punto 1 fueron mayoritariamente de cápside isométrica (81 %), mientras que en los puntos 2 y 3 tan sólo se encontraron bacteriófagos de cápside alargada. Por su parte, los bacteriófagos de morfología *Siphoviridae* en el punto 1 presentaron en su totalidad colas rectas. Sin embargo en el punto 2 se calculó un porcentaje del 20 % de colas curvadas, aunque aún prevalecían las colas rectas (80%). En el punto 3, por el contrario, tan sólo se detectó un 17 % de bacteriófagos del tipo *Siphoviridae* de cola recta, y sin embargo se encontró un 66 % de bacteriófagos de cola curvada y apareció la morfología de bacteriófagos de cola rizada, con un porcentaje del 17 %.