

# Metody stanovení somatických kolifágů a úskalí spojená s jejich zavedením do legislativy

## Methods of determining somatic coliphages and the challenges of putting them into practice

David Janák<sup>1</sup> | Jana Zuzáková<sup>2</sup> | Jana Říhová Ambrožová<sup>3</sup>

### INFORMACE O ČLÁNKU

DOI 10.35933/ENTECHO.2021.005

### HISTORIE

Datum doručení: 30. 10. 2021

Datum revize: 25. 11. 2021

Datum akceptace: 2. 12. 2021

### AFILACE

Ústav technologie vody a prostředí,

Vysoká škola chemicko-

-technologická v Praze,

Technická 5, 166 28 Praha 6

<sup>1</sup> Janakd@vscht.cz,

tel.: +420 731 028 103

ORCID ID 0000-0001-9417-0278

<sup>2</sup> ORCID ID 0000-0002-4060-2909

<sup>3</sup> ORCID ID 0000-0002-1503-409X

### KLÍČOVÁ SLOVA

somatické kolifágy; povrchové vody; indikátorový mikroorganismus; kvalita vody

### KEYWORDS

somatic coliphages; surface water; indicator microorganism; water quality

### ABSTRAKT

Z důvodu zavedení stanovení somatických kolifágů do dvou legislativních dokumentů evropské unie (EU), budou muset příslušné orgány členských států EU sledovat jejich výskyt v daných typech vod. Tento článek popisuje stanovení somatických kolifágů v reálných a modelových vzorcích pomocí normovaných metod. Zároveň jsou popsány postřehy a úskalí, která jsou spojena s normovanými stanoveními a se zavedením těchto stanovení do legislativy. V rámci teoretické části práce je popsána morfologie a taxonomie somatických kolifágů a jejich přibližný výskyt v různých typech vod. V rámci experimentální části jsou shrnuty výsledky získané pomocí kultivačních metod, které jsou tabelárně zpracovány.

### ABSTRACT

Due to the inclusion of the determination of somatic coliphages in two European Union (EU) legislative documents, the competent authorities of the EU Member States will have to monitor their occurrence in the given types of waters. This paper describes the determination of somatic coliphages in real and model samples using standardized methods. At the same time, observations and pitfalls are described, which are connected with standardized determinations and with the introduction of these determinations into legislation. The theoretical part of the thesis describes the morphology and taxonomy of somatic coliphages and their approximate occurrence in different types of waters. The experimental part summarizes the results, obtained by using cultivation methods, which are tabulated.

## 1 Úvod

Voda je jednou z nejdůležitějších složek pro člověka. Vzhledem k tomu, že její kvalitativní parametry se odvíjí od míry organického znečištění, přítomnosti polutantů a rizikových organismů a látek v ní obsažených, je zapotřebí věnovat zvýšenou pozornost environmentálním charakteristikám, technologickým procesům a rizikové analýze. V ČR jsou k dispozici legislativní požadavky zaměřené na monitoring a kontrolu hygienické nezávadnosti vod. Zcela zásadní je pak hygienický požadavek na kvalitativní a kvantitativní fyzikálně-chemické, chemické, mikrobiologické a biologické ukazatele. Tyto parametry se aktualizují v legislativních nařízeních s ohledem na vědecké poznání a ekonomickou situaci v daný okamžik. Následně se některé parametry upravují, doplní se pro jejich stanovení jiná vhodnější metoda, nebo se nahradí jiným ukazatelem. V případě mikrobiologického rozboru vody jsou v tomto aspektu zcela novým ukazatelem kvality vody somatické kolifágy. Somatické kolifágy byly mezi nové ukazatele kvality vody zařazeny proto, že celosvětově se uvádí 30 % případů gastrointestinálního onemocnění, způsobených po požití pitné vody. Za většinu onemocnění z těchto uvedených 30 % jsou zodpovědné enterické viry, nebo prvoci, které se v pitných vodách běžně

laboratorně nestanovují (Durán et al., 2003). Somatické kolifágy jsou viry indukující fekální znečištění, nejsou pro člověka patogenní, jejich stanovení je relativně časově i ekonomicky nenáročné a mají určitou podobnost s enterickými viry.

Jako nový indikátorový mikroorganismus jsou somatické kolifágy zmiňovány ve dvou legislativních dokumentech, v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) a ve Směrnici Evropského parlamentu a Rady (EU). První legislativní dokument (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741, 2020) vstoupil v platnost dne 25. 5. 2020. Podle tohoto nařízení bude nutné somatické kolifágy stanovovat v rámci validačního monitorování u zařízení čistících vodu pro opětovné využívání. Pro dosažení kvality vody třídy A (nejpřísněji nastavená hodnota kvality vody) bude muset být rozdíl mezi množstvím somatických kolifágů v surové vodě vstupující do zařízení a vodou upravenou, tedy vystupující ze zařízení čistící vodu pro opětovné využití, alespoň 6 log<sub>10</sub> neboli 10<sup>6</sup>. V případě, kdy voda vstupující do čistícího zařízení obsahuje méně, než 6 log<sub>10</sub> plaků tvořených jednotkami (PTJ/100 ml) somatických kolifágů, tak na výstupu z jednotky musí mít 0 PTJ/100 ml somatických kolifágů. V literatuře se lze setkat i s označením PFP (plaque forming particles), což znamená plaky tvořící částice. Jednotlivé třídy kvality vody určují, pro jaký účel se opětovně

vyčištěná voda smí používat. Druhý legislativní dokument (Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184, 2020) nahradil Směrnicí 98/83/ES. V této nové směrnici je stanovení somatických kolifágů zmiňováno pro tzv. provozní monitoring. To znamená, že pokud bude výskyt somatických kolifágů ve zdroji povrchové vody určené k úpravě na vodu pitnou nižší než 50 (PTJ/100 ml), tak se nebudou muset stanovovat v celé lince úpravárenské technologie.

## 2 Teoretická část

Somatické kolifágy jsou bakteriofágy neboli bakteriální viry, jejichž hostitelským organismem jsou bakterie. V tomto případě se jedná o koliformní bakterie. Jako hostitelé somatickým kolifágům slouží některé druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*, a to především druh *Escherichia coli*, případně *Klebsiella* spp., *Shigella* spp. ad. Hostitelskou buňku napadají přes její vnější buněčnou stěnu, na kterou se naváží přes lipopolysacharidy, nebo proteinové receptory (Jofre et al., 2016).

Somatické kolifágy jsou dsDNA viry (double stranded) a ssDNA viry (single stranded). Do těchto skupin jsou rozdělovány v závislosti na typu nukleové kyseliny, kterou mají uloženu v kapsidě. Taxonomicky patří ke čtyřem čeledím, kterými jsou: *Microviridae*, *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae* (Lee, 2009; Burbano-Rosero et al., 2011; McMinn et al., 2017).

Na základě podobného uspořádání kapsidy a vlastností, které mají enterické viry, by se somatické kolifágy mohly stát jejich indikátory organismem. Předvídat přítomnost enterických virů v prostředí by bylo jistě určitou výhodou, protože na lidský organismus mají patogenní účinek, již v malých množstvích (Zhang and Farahbakhsh, 2007).

### 2.1 Výskyt somatických kolifágů

Na základě studie (Jofre et al., 2016) bylo zjištěno, že se somatické kolifágy vyskytují ve splaškových odpadních vodách celosvětově v rozmezí od  $5 \cdot 10^6$  PTJ/100 ml do  $5 \cdot 10^7$  PTJ/100 ml. V podzemních vodách se somatické kolifágy vyskytují pouze v případě jejich ovlivnění vodami povrchovými, nebo v případě přímé kontaminace podzemních vod splaškovými vodami. Výskyt somatických kolifágů v povrchových

vodách je významně ovlivněný povětrnostními a klimatickými podmínkami v místě odběru a samozřejmě i samotným místem odběru. Z toho důvodu jejich výskyt ve vodách obecně osciluje mezi nula až několika desítkami PTJ ve 100 ml vzorku (USEPA, 2015).

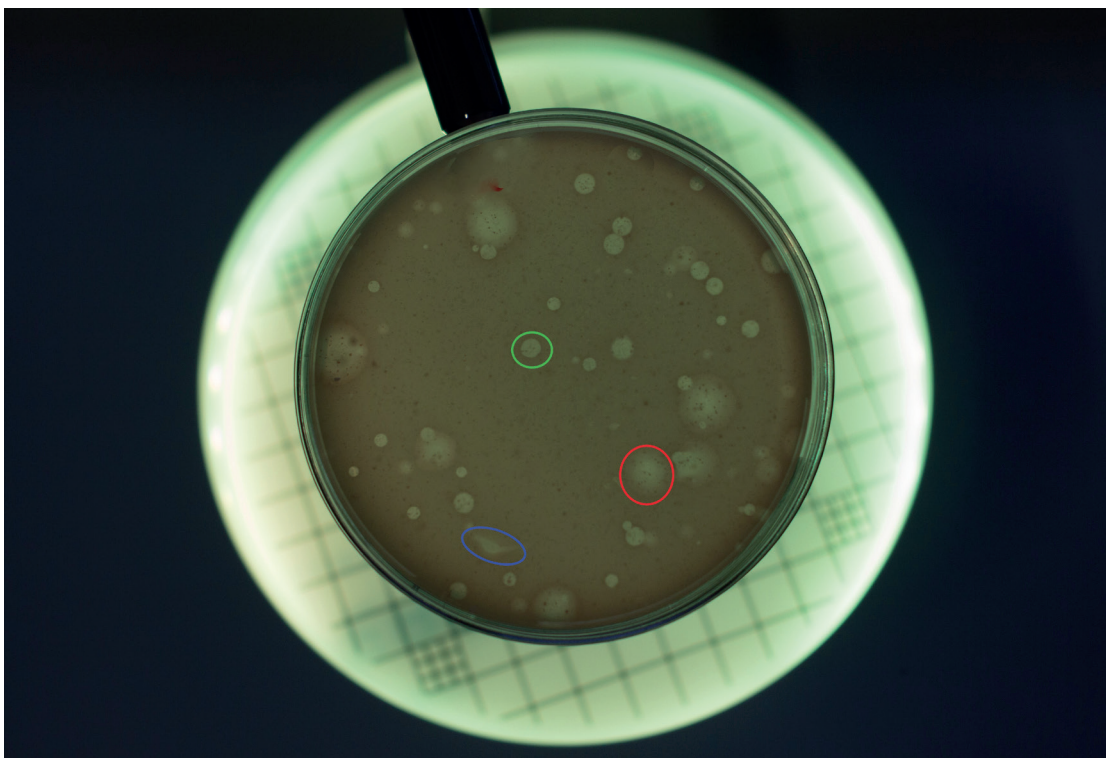
### 2.2 Metody stanovení somatických kolifágů

Somatické kolifágy je možné stanovit kultivačně nebo využít některou z vhodných metod molekulární biologie, kterými jsou: PCR, qPCR, FISH, případně transmisní elektronová mikroskopie. Jednotlivé uvedené metody se liší v náročnosti na přístrojové vybavení, v rychlosti získání výsledků, ve finanční náročnosti stanovení, a především konečném výsledku, který je buď kvalitativní (informace o přítomnosti kolifágů v daném vzorku), nebo kvantitativní (informace o počtu částic ve vzorku) (Burbano-Rosero et al., 2011; Wu et al., 2017). Kultivační stanovení, jehož výsledkem je počet (množství) kolifágů ve vzorku, je provozně, ekonomicky a s ohledem na typ výsledku pro provozovatele úpraven vod nejnvhodnější.

Kultivační stanovení somatických kolifágů je založené na smíchání analyzovaného vzorku (s předpokladem výskytu somatických kolifágů) s hostitelským kmenem bakteriofága (kultura nacházející se v logaritmické fázi růstu) a polotekutým živným médiem. Takto vzniklá směs se buď rozlije přímo do Petriho misky, v případě jednovrstvé plakové titrace, nebo se rozlije na povrch pevného živného média v Petriho misce, v případě dvouvrstvé plakové titrace.

Jednotlivé kultivační metody jsou popsány v příslušných normách (ČSN EN ISO 10705-2, 2002, USEPA, 2001a, USEPA, 2001b). V případě stanovení somatických kolifágů ve vzorku s předpokladem jejich nízkého výskytu, je možné použít doporučené koncentrační metody specifikované normou (ČSN ISO 10705-3, 2020).

Množství vykultivovaných bakteriofágů je ovlivněno použitým hostitelským kmenem, kterým je určitý typ kmene bakterie *Escherichia coli* (Stetler, 1984). Somatické kolifágy se po  $18 \pm 2$  h inkubace při  $36 \pm 2$  °C projeví jako plaky neboli zóny projasnění na agarové ploše, viz Obr. 2.1. Výsledkem kultivačního stanovení je počet somatických kolifágů, vyjádřený jako plaky tvořící jednotky, ve stanovovaném objemu (PTJ/ml).



**Obr. 2.1:** Somatické kolifágy viditelné na agarové plotně, jako plaky tvořící jednotky. Pozn.: fotografie byla pořízena na počítačce kolonií (Colony counter) při slabě žlutozeleném podsvícení. Zakroužkování:  
 ● - plak,  
 ● - kapka zkondenzované vody,  
 ● - hrudka předčasně ztuhlého agaru

### 3 Experimentální část

Experimentální část této studie byla zaměřená na ověření a případnou optimalizaci metodiky kultivačního stanovení somatických kolifágů. Jednotlivé vzorky stanovované na přítomnost somatických kolifágů se lišily množstvím doprovodné mikroflóry a organického znečištění. K detekci somatických kolifágů byla použita metoda dvouvrstvé plakové titrace specifikovaná normou (ČSN EN ISO 10705-2, 2002). Modelové vzorky, vzorky kohoutkové vody a vzorek studniční vody, tedy vzorky s očekávaným nízkým výskytem somatických kolifágů, byly stanovovány pomocí koncentračních metod uvedených v normě (ČSN ISO 10705-2, 2020).

#### 3.1 Zpracování vzorků vod s nízkým počtem kolifágů

U vzorků vod s výskytem somatických kolifágů nižším, než 3 PTJ/ml je nutné upravit analyzovaný vzorek jeho zkoncentrováním. Pro zkoncentrování vzorků jsou v normě (ČSN ISO 10705-3, 2020) uvedeny tři techniky, mezi které patří filtrace pomocí elektropozitivních filtrů, membránová filtrace a flokulace. Použití jednotlivých technik se liší v závislosti na zákalu a stanovovaném objemu daného vzorku. V rámci experimentální části byly použity metody zkoncentrování vzorků membránovou filtrací a flokulací.

##### 3.1.1 Membránová filtrace

Metoda membránové filtrace je založena na principu jednoduché filtrace a je možné ji použít pro vzorky vod se zákalem menším než 2 ZFn. Při větším zákalu lze předpokládat rychlé ucpání membránového filtru. Metoda filtrace je vhodná pro objemy vzorků v rozsahu 0,1–1 litru. Po provedení filtrace se filtr rozstříhá na 8 částí, které se vloží do elučního roztoku v kádince, která se umístí po dobu 5 minut do ultrazvukové lázně. Stanovuje se jak eluát, tak rozstříhaný filtr. Normou předepsaný, a v této studii ověřený eluční roztok ve složení 1% Tween 80, 0,5 M NaCl a 3% hovězí extrakt vykazuje nejvyšší výtěžky.

##### 3.1.2 Flokulace s MgCl<sub>2</sub>

Metodu flokulace lze použít na vzorky se zákalem větším než 2 ZFn a v rozmezí objemu 0,1–1 litru. Princip této koncentrační metody spočívá v přidání ekvivalentní dávky chloridu hořečnatého ke zpracovávanému objemu vzorku, který po úpravě hodnoty pH hydroxidem sodným vytvoří nerozpustné vločky hydroxidu hořečnatého, ve kterých se zachytí somatické kolifágy. Vločky se nechají sedimentovat. Po proběhnutí sedimentace se odlije supernatant a usazené vločky se centrifugují. Po centrifugaci se opět slije supernatant a peleta (centrifugát) se rozpustí ve vhodném rozpouštědle a celý objem se následně

ně kultivačně stanoví. V této studii byla rozpouštědlem peptonová voda s chloridem sodným.

### 4 Výsledky

V rámci této studie byly analyzovány tyto typy vzorků: povrchové vody, šedá voda, pitná (kohoutková) voda, studniční voda, přítok a odtoky z čistíren odpadních vod (ČOV). Použité metody a získané výsledky jsou shrnuty v **Tab. 4.1**. Jednotlivé výsledky vyjadřují počet deterninovaných somatických kolifágů ve stanovovaném objemu (uveden v závorce). Analyzovaný objem byl vybrán na základě odhadu výskytu somatických kolifágů ve vzorku.

**Tabulka 4.1:** Stanovení somatických kolifágů ve vodách v roce 2020

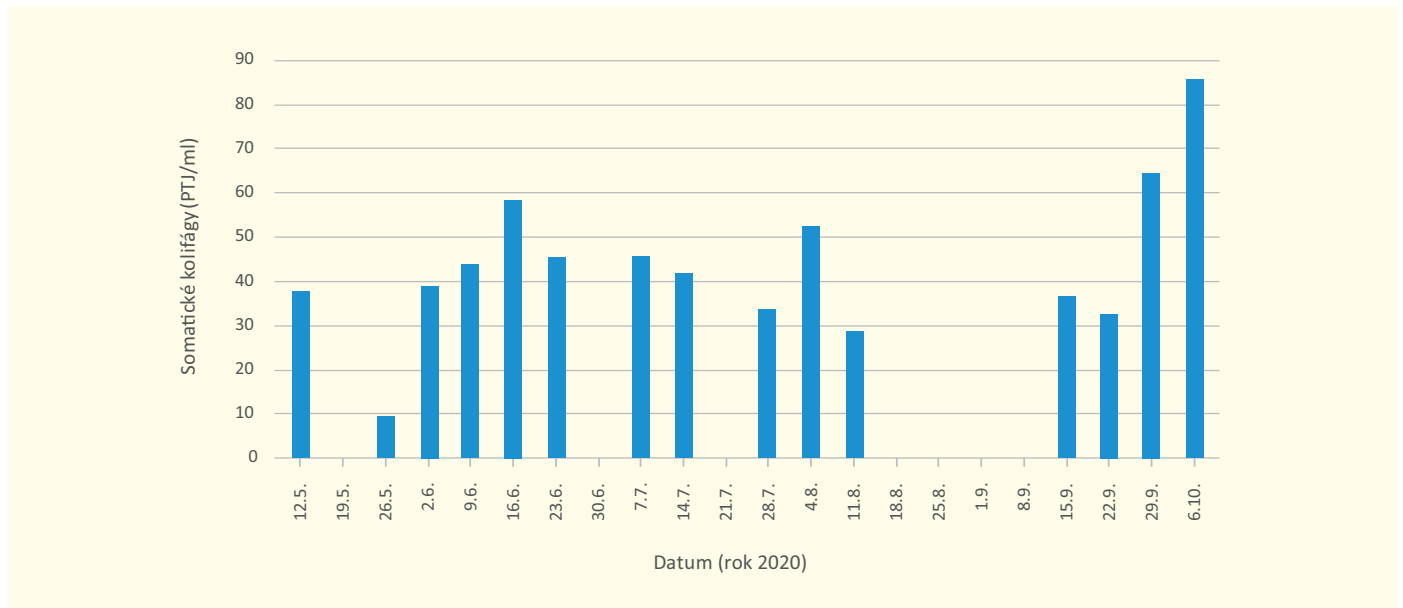
Datum (2020)	Vzorek <sup>1)</sup>	Metoda	Výsledek (PTJ)
22. 07.	Šedá voda	Flokulace, ČSN ISO 10705-3	60 (100 ml)
20. 10.	Pitná voda	Membránová filtrace, ČSN ISO 10705-3	0 (100 ml)
20. 10.	Studniční voda	Membránová filtrace, ČSN ISO 10705-3	0 (100 ml)
11. 11.	Přítok na ČOV 1	ČSN EN ISO 10705-2	26 000 (1 ml)
11. 11.	Vltava nad ÚČOV <sup>2)</sup>	ČSN EN ISO 10705-2	7 (1 ml)
11. 11.	Vltava pod ÚČOV <sup>2)</sup>	ČSN EN ISO 10705-2	4 (1 ml)
04. 12.	Odtok ČOV 2	ČSN EN ISO 10705-2	0 (1 ml)
04. 12.	Odtok ČOV 3	ČSN EN ISO 10705-2	5 (1 ml)

- 1) Pitná voda byla odebrána z vodovodního kohoutu laboratoře ÚTVP VŠCHT Praha. ÚČOV = Ústřední čistírna odpadních vod v Praze
- 2) Vyšší výskyt somatických kolifágů nad ÚČOV mohl být způsoben nejvyšším výskytem vodního ptactva v místě odběru vzorku

Pro zjištění účinnosti koncentračních metod byly testovány modelové vzorky, viz **Tab. 4.2**. Pro zjištění účinnosti membránové filtrace byla říční voda povařena při 80 °C, z důvodu eliminace výskytu somatických kolifágů. Následně byly alikvotní podíly modelových vzorků rozdávány do kádinek, do kterých bylo přidáno po 1 ml přídavku

**Tabulka 4.2:** Srovnání účinnosti koncentračních metod na modelových vzorcích

Datum	Zákal (ZFn)	Vzorek	Objem (ml)	Metoda	Počet (PTJ)	Výtěžnost (%)	Přídavek (PTJ/ml)
04. 12. 20	0	Destilovaná voda	500	Flokulace, ČSN ISO 10705-3	132	57	230
			250		155	67	
			125		150	65	
			63		150	65	
26. 03. 21	1,83	Říční voda	500	Membránová filtrace, ČSN ISO 10705-3	18	19	96
			250		32	33	
			125		69	72	
			100		69	72	
			63		67	70	



**Obr. 4.1:** Graf dlouhodobého monitoringu somatických kolifágů na odtoku z ČOV 1. Pozn.: při hodnotách 0 měření neprobíhalo

somatických kolifágů. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší účinnosti filtrace (72 %) bylo dosaženo při filtraci 100 ml a 125 ml vzorku u flokulace bylo nejvyšší účinnosti (67 %) dosaženo při flokulaci 250 ml vzorku.

Dále byl proveden dlouhodobý monitoring výskytu somatických kolifágů na odtoku z ČOV 1, z důvodu zjištění proměnlivosti výskytu somatických kolifágů v čase, viz **Obr. 4.1**.

## 5 Diskuze

Ve Směrnici (Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184, 2020) je uvedeno, že ve zdroji surové vody určené k úpravě na vodu pitnou musí být somatických kolifágů méně než 50 PTJ/100 ml. V případě výskytu vyššího, než 50 PTJ/100 ml budou muset být somatické kolifágy stanovovány v rozsahu technologie celé úpravárenské lince. Z této hodnoty jasně vyplývá, že je nutné analyzovat objem 100 ml vzorku. V případě takto zvoleného objemu nastává zcela zásadní problém. Norma (ČSN EN ISO 10705-2, 2002) uvádí návod na stanovení somatických kolifágů v 1 ml vzorku (maximálně až 4 ml). Při úvaze požadovaného objemu celkově analyzovaného vzorku (tj. 100 ml) by podle této normy na jedno duplicitně provedené kultivační stanovení somatických kolifágů ve vodě, včetně slepých stanovení, byla vyžadována spotřeba minimálně 52 ks Petriho misek o průměru 9 cm. V případě zjištění toho, že se v surové vodě vyskytuje více než 50 PTJ/100 ml somatických kolifágů, pak je zapotřebí při úvaze běžné úpravy vody (technologická linka ve sledu: surová voda, koagulace, filtrace, akumulace, výstup) disponovat alespoň 252 ks Petriho misek, s průměrem 9 cm na jedno duplicitně provedené stanovení 100 ml vzorků a k tomu patřičného množství živné půdy.

Tento problém by mohl být vyřešen použitím Petriho misek o větším průměru např. 15 cm. Při použití 15 cm Petriho misek lze získat zhruba 3× větší objem, a tudíž lze aplikovat zhruba objem 12 ml vzorku, ale i tak se stále jedná o velkou spotřebu Petriho misek i živné půdy. Dalším možným řešením je použití koncentračních metod uvedených v normě (ČSN ISO 10705-3, 2020), nebo komerčně dostupných kito-vých stanovení, např. Bluephage, která jsou ovšem relativně ekonomicky náročná (Janák et al., 2021).

## 6 Závěr

Z výsledků experimentální části této práce vyplývá, že somatické kolifágy lze považovat za relevantní indikátory fekálního znečištění,

který je relativně snadno stanovitelný. Hodnoty jednotlivých stanovení, uváděné v experimentální části této práce, se pohybují v rozmezí hodnot uváděných v odborné literatuře pro obdobné vzorky (Zhang and Farahbakhsh, 2007; Jofre et al., 2016). Při zjišťování účinnosti koncentračních metod bylo dosaženo nejvyšší účinnosti 72 % u membránové filtrace při filtraci 100 ml a 125 ml modelového vzorku, kterým byla převařená říční voda s přidavkem 1 ml somatických kolifágů u flokulace bylo dosaženo nejvyšší účinnosti 67 % při flokulaci 250 ml modelového vzorku, kterým byla destilovaná voda s přidavkem 1 ml somatických kolifágů. U flokulace by mohla být účinnost vyšší, kdyby byl použit vhodněji připravený modelový vzorek, destilovaná voda mohla eliminovat množství somatických kolifágů působením osmotického tlaku.

Jako téměř u všech nově zaváděných metod do laboratoří je i v případě somatických kolifágů potřeba počítat s určitým časem pro úspěšné osvojení si jejich stanovení. Největší obtíží u stanovení somatických kolifágů je jejich zkoncentrování z většího objemu vzorku. Membránová filtrace je snadná, ale lze ji použít pouze na poměrně čisté zdroje vod s nízkým zákallem. Flokulace vyžaduje velké množství činidel a je časově náročná. Obě koncentrační metody vykazují vyšší procentuální výtěžnost při menších stanovovaných objemech. Dalšími problémy, které při stanovení mohou nastat jsou: zarůst kultivační plochy doprovodnou mikroflórou z důvodu použití nevhodné hostitelské kultury, předčasné ztuhnutí kultivačního média rušící odečet somatických kolifágů, nebo kondenzace vody vytvářející kapky podobné plávkům, viz **Obr. 2.1** (Janák, 2021).

## 5 Literatura

ČSN EN ISO 10705-2. Jakost vod – Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 2: *Kvantitativní stanovení somatických kolifágů*. Praha: ÚNMZ, 20 p.

ČSN ISO 10705-3. Kvalita vod – Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 3: *Validace metod pro zkoncentrování bakteriofágů z vody*. 13 p.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 ze dne 25. května 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody. In: *Úřední věstník Evropské unie*, L 177, 5. 6. 2020, p. 32–55. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX:32020R0741>.

- Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřevyřované znění). In: *Úřední věšník Evropské unie*, L 435, 23. 12. 2020, p. 1–62. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32020L2184>.
- Burbano-Rosero, E. M.; Ueda-Ito, M.; Kisielius, J. J.; Nagasse-Sugahara, T. K.; Almeida, B. C.; Souza, C. P.; Markman, C.; Martins, G. G.; Albertini, L.; Rivera, I. N. G., 2011. *Diversity of Somatic Coliphages in Coastal Regions with Different Levels of Anthropogenic Activity in São Paulo State, Brazil*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(12), 4208–4216, doi:10.1128/aem.02780-10.
- Durán, A. E.; Muniesa, M.; Mocé-Llivina, L.; Campos, C.; Jofre, J.; Lucena, F., 2003. *Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination*. *Journal of Applied Microbiology* 95(1), 29–37, doi:10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x.
- Janák, D., 2021. *Detekce a distribuce somatických kolifágů ve vodách*. Ústav technologie vody a prostředí. Vysoká škola Chemicko-technologická v Praze, p. 64.
- Janák, D.; Zuzáková, J.; Říhová Ambrožová, J., 2021. *Porovnání alternativní a klasické kultivační metody detekce somatických kolifágů*. *Vodárenská biologie* 2021, 10.–11. 2021, Praha, Česká republika, Říhová Ambrožová Jana, Petránková Kánská Klára (Edit.), str. 204, 18–22.
- Jofre, J.; Lucena, F.; Blanch, A.; Muniesa, M., 2016. *Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources*. *Water* 8(5), doi:10.3390/w8050199.
- Lee, H. S., 2009. *Somatic coliphage families as potential indicators of enteric viruses in water and methods for their detection*.
- McMinn, B. R.; Huff, E. M.; Rhodes, E. R.; Korajkic, A., 2017. *Concentration and quantification of somatic and F+ coliphages from recreational waters*. *Journal of Virological Methods* 249(58–65), doi:https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.08.006.
- Stetler, R. E., 1984. *Coliphages as indicators of enteroviruses*. *Applied and Environmental Microbiology* 48(3), 668–670.
- USEPA, 2001a. *Method 1601: Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by two-step enrichment procedure: U.S. Environmental Protection Agency Report 821-R-01-030*, 40 p.
- USEPA, 2001b. *Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure*. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 38.
- USEPA, 2015. *USEPA, Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality 820-R-15-098*. 2015.
- Wu, B.; Wang, R.; Fane, A. G., 2017. *The roles of bacteriophages in membrane-based water and wastewater treatment processes: A review*. *Water Res* 110(120–132), doi:10.1016/j.watres.2016.12.004.
- Zhang, K.; Farahbakhsh, K., 2007. *Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: Implications to water reuse*. *Water Research* 41(12), 2816–2824, doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.010.