

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN SALUD (INISA)**

**“IMPLEMENTACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DOBLE CAPA DE AGAR Y
CAPA SIMPLE DE AGAR, PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFAGOS
SOMÁTICOS EN AGUAS”**

**Trabajo final de graduación para optar por el grado de
Licenciada en Microbiología y Química Clínica**

Preparado por:

Melissa Solano Barquero

JULIO, 2010



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el martes 06 de julio del año 2010 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante MELISSA SOLANO BARQUERO, carné A45105, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de PRACTICA DE GRADUACIÓN, para optar por el grado académico de LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA y el título profesional de DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dr. José Antonio Gené Valverde PRESIDENTE
Dra. Marianela Vargas Umaña
Dra. Luz Chacón Jiménez
Dra. Kenia Barrantes Jiménez
Dra. Rosario Achí Araya

ARTICULO 1

El presidente informa que el expediente de MELISSA SOLANO BARQUERO, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la expOSICIÓN.

ARTICULO 2

La postulante MELISSA SOLANO BARQUERO, hace la exposición oral de su trabajo de graduación título "Implementación de los métodos de doble capa de agar y capa simple de agar para la determinación de colílagos en aguas".

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 100 y se recomienda mención Honorífica.

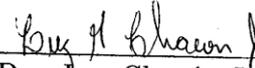
ARTICULO 5

El presidente del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y a la Postulante, a las 12:35 horas.



Dr. José Antonio Gené Valverde
Presidente



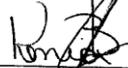
Dra. Luz Chacón Jiménez



Dra. Rosario Achí Araya



Dra. Mariangela Vargas Umaña



Dra. Kema Barrantes Jiménez



Melissa Solano Barquero
Postulante

Dedicatoria

Les dedico esta tesis a mi madre y hermanos por todo el apoyo que me han brindado siempre.

Agradecimientos

A Luz Chacón, tutora de esta tesis, por su apoyo y valiosos aportes a este proyecto.

A Kenia Barrantes y Rosario Achí, lectoras de del proyecto, por su interés y apoyo brindado en el desarrollo de éste.

A Alejandro y Jorge por su colaboración en el montaje de las pruebas y los muestreos.

A Víctor, Gerardo y Marvin por su ayuda desinteresada.

A Carolina Santamaría y Sergio Solano por sus aportes para el análisis estadístico.

A mi familia y amigos por estar siempre a mi lado.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	i
1.1 Importancia de la detección de virus en aguas.....	1
1.2 Métodos para el análisis de la presencia de virus en agua.....	3
1.3 Situación en Costa Rica.....	5
2. JUSTIFICACIÓN.....	7
3. OBJETIVOS.....	9
<i>Objetivo general.</i>	9
<i>Objetivos específicos.</i>	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1 Cepas bacterianas.....	10
4.2 Cepas virales.....	10
4.3 Protocolos base.....	10
4.4 Medios de cultivo y reactivos.....	11
4.5 Procedimientos ensayados para lograr la obtención de la bacteria hospedera en fase logarítmica.....	12
4.6 Procedimiento de muestreo de agua de río, aplicado para las metodologías capa doble de agar y capa simple de agar.....	15
4.7 METODO 1: Capa doble de agar.....	16
4.8 METODO 2: Capa simple de agar.....	23
4.9 Metodología combinada capa doble de agar/capa simple de agar.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1 RESULTADOS PARA LAS MUESTRAS DE AGUA INOCULADA.....	28
5.1.1 METODO 1: Capa doble de agar.....	28
5.1.2 MÉTODO 2: Capa simple de agar.....	37
5.1.3 MÉTODO 3: combinación capa doble de agar/capa simple de agar.....	39
5.1.4 Comparación entre los métodos capa simple de agar y capa doble de agar.....	40
5.2 RESULTADOS PARA LAS MUESTRAS DE AGUA DE RÍO.....	41
5.2.1 Muestréos en Río Cascajal (Coronado).....	41
5.2.2 Muestréos en el Río Coris (Cartago).....	41
6. DISCUSIÓN.....	46
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
8. REFERENCIAS.....	64
Anexos.....	68

Solano Barquero, Melissa

Implementación de los métodos de doble capa de agar y capa simple de agar, para la determinación de colifagos somáticos en aguas.

Proyecto de graduación – Facultad de Microbiología, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), San José C.R.

M. Solano B. 2010

Resumen

Las consecuencias para la salud de los virus presentes en agua, plantea la imperiosa necesidad de contar con metodologías sencillas que permitan determinar la presencia de los mismos.

Dentro de estas metodologías, se puede mencionar la detección de colifagos. Los colifagos somáticos son virus que infectan y se replican en *Escherichia coli*. Durante muchos años la detección de estos virus ha sido aplicada como índice de contaminación fecal, además se ha determinado que tienen un comportamiento ambiental similar al de los virus entéricos humanos, por lo cual su hallazgo es presuntivo de la presencia de estos virus patógenos.

En este trabajo se implementaron, optimizaron y compararon los métodos capa doble de agar y capa simple de agar descritos por la American Public Health Association (APHA) en el y por la Environmental Protection Agency's (EPA), para la detección de colifagos somáticos en aguas. Se determinó que para las condiciones del laboratorio es necesario realizar algunas modificaciones y que una vez controladas ciertas variables de los métodos, se obtienen resultados reproducibles y comparables entre ambos métodos.

COLIFAGOS SOMÁTICOS, DETERMINACIÓN DE VIRUS EN AGUA, MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VIRUS

Directora: Dra. Luz Chacón
Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)

Lista de cuadros

- Cuadro 1:** Cuantificación de UFP y determinación del título viral en un amplificado del stock de colifagos Φ 174 ATCC, utilizando un cultivo de *E. coli* obtenido por el método de estándar de McFarland 1%
- Cuadro 2:** Comparación de la recuperación de UFP provenientes de un amplificado de colifagos, utilizando DO=0,1 y DO= 0,5
- Cuadro 3:** Número de UFP y determinación del título de dos amplificados virales, uno de ellos filtrado y el otro refiltrado.
- Cuadro 4:** Cuantificación de UFP y determinación del título viral de un concentrado de colifagos preparado a partir de un amplificado del stock de colifagos Φ 174 ATCC.
- Cuadro 5:** Títulos virales obtenidos para un amplificado de colifagos el día de su amplificación, 49 días y 97 días posterior a su almacenamiento a 4 °C.
- Cuadro 6:** Comparación del número de UFP y de los títulos virales obtenidos para un concentrado de colifagos ensayado en tres repeticiones
- Cuadro 7:** Recuento de UFP y determinación del título viral de un concentrado de colifagos, según la edad del cultivo de *E. coli*.
- Cuadro 8:** Número de UFP y determinación título de un amplificado de colifagos, por el método de capa simple de agar
- Cuadro 9:** Número de UFP y título de un amplificado de colifagos, por el método de capa simple de agar utilizando para la determinación una dilución final de 10^{-6}

- Cuadro 10:** Número de UFP y determinación de los títulos virales para una de una muestra de agua inoculada, analizada por los métodos capa simple de agar y capa doble de agar
- Cuadro 11:** Número de UFP y título de colifagos obtenido por el método de capa doble de agar, en la muestra de agua del Río Coris, el día del muestreo y posterior a un almacenamiento de 48 horas a 4 °C
- Cuadro 12:** Número de UFP y título de colifagos para una muestra de agua del Río Coris, ensayada por el método capa simple de agar el día del muestreo y posterior a un almacenamiento de 48 horas a 4 °C.
- Cuadro 13:** Número de UFP y título de colifagos, obtenido por el método de capa simple de agar, en una muestra de agua del Río Coris, ensayada el día del muestreo y posterior a un almacenamiento de de 48 horas a 4 °C.

Lista de figuras

- Figura 1** UFP provenientes de un amplificado del stock de colifagos Φ 174 ATCC, obtenidas utilizando un cultivo de bacteria hospedera cuya concentración se reguló con un estándar de McFarland 1%
- Figura 2** Izquierda platos positivos por colifagos sin unidades formadoras de placas evidentes. Derecha: platos con resultados negativos por colifagos
- Figura 3** Título de un amplificado viral el día de su amplificación (día cero), 49 días y 97 días posterior a su almacenamiento a 4 °C.
- Figura 4** Títulos obtenidos para un concentrado de colifagos antes de su almacenamiento posterior a un mes de almacenamiento a diferentes temperaturas.
- Figura 5** Título obtenido para el concentrado de colifagos el día de su amplificación (día cero) y posterior a uno y siete meses de almacenamiento a -70 °C.
- Figura 6** Platos de Petri con UFP obtenidas por el método de capa simple de agar.
- Figura 7** Arriba platos vistos de frente, abajo platos vistos por el reverso Izquierda: Platos de Petri con cultivos obtenidos aplicando el método de capa doble. Derecha: Platos de Petri con cultivos obtenidos aplicando el método de capa simple.
- Figura 8** Tres de los diez platos utilizados para la muestra. Izquierda: plato con burbujas distribuidas en la periferia. Centro: plato con burbujas distribuidas uniformemente en el agar. Derecha: plato con pocas burbujas.

Figura 9 Excesiva producción de gas en los platos de las muestras, comparado con el de un control. Izquierda: Plato de Petri del control negativo de la prueba. Derecha: plato de Petri con muestra del Río Coris.

Figura 10 Observación de la morfología de las UFP obtenidas al ensayar la muestra de agua.

Abreviaturas utilizadas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- APHA: American Public Health Association
- ARN: ácido ribonucleico
- ATS: agar tripticasa soya
- ATCC: American Type Culture Collection
- AyA: acueductos y alcantarillados
- CaCl₂: cloruro de calcio
- CTS: caldo tripticasa soya
- DO: densidad óptica
- *E.coli*: *Escherichia coli*
- EPA: Agencia de Protección Ambiental
- F⁺: macho específico
- I = Incontables
- M: megaplacas
- MS: Ministerio de Salud Pública
- nm: nanómetros
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- SMEWW: Standard Methods of Examination Water and Wastewater
- TL: todo lisado
- UFP: unidades formadoras de placas
- # UFP: número de unidades formadoras de placas

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la detección de virus en aguas.

El agua es un elemento vital para todos los seres vivos, cumple un papel fundamental en la salud de las personas y en el sostenimiento de la vida en el planeta, sin embargo, es uno de los recursos más vulnerables a las acciones del ser humano y de la naturaleza.

Actividades humanas como la industria, agricultura, ganadería, navegación y las actividades domésticas, generan distintos tipos de desechos que contaminan las aguas. Especial atención, merecen los vertidos de aguas residuales en aguas superficiales, ya que muchas se destinan al consumo humano.

La contaminación de aguas con aguas negras, representa un alto riesgo de transmisión de enfermedades a los seres humanos, ya que las deposiciones fecales humanas y de animales contienen diversos tipos de microorganismos enteropatógenos, dentro de los cuales podemos encontrar bacterias como *Salmonella*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, algunos protozoarios y varios tipos de virus (Borrego *et al.* 1990).

Al respecto, la Organización Mundial de la Salud, informa que aproximadamente 2 millones de personas mueren cada año, debido a enfermedades diarreicas frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados, donde los más afectados son los niños menores de 5 años (OMS, 2009).

A pesar de que las aguas pueden ser contaminadas por una gran gama de microorganismos, para determinar su calidad microbiológica, por lo general se analiza únicamente, la presencia de ciertas bacterias, las cuales no reflejan el comportamiento de patógenos virales, ni de otros parásitos como protozoarios (Borrego *et al.* 1987).

Cuando las aguas residuales son sometidas a un proceso de descontaminación los patógenos bacterianos se ven disminuidos o eliminados. Es por ello que en los países que cuentan con un sistema de tratamiento de aguas eficaz, los brotes diarreicos ocasionados por agua o alimentos contaminados, ya no son originados en su mayoría por bacterias, sino por virus (Bofill-Mas *et al.* 2005).

Alrededor de 140 tipos de virus entéricos pueden ser transmitidos a través del agua, estos virus se replican en el tracto gastrointestinal y son excretados por los individuos infectados (Vidales *et al.* 2004). Entre los virus entéricos más importantes se encuentran enterovirus, virus de hepatitis A y E, calicivirus, rotavirus y astrovirus (Leclerc *et al.* 2000).

Los enterovirus pertenecen a la familia Picornaviridae y dentro de ellos las principales especies son poliovirus, coxsakievirus A, echovirus y enterovirus 68-71, estos virus están asociados a infecciones del sistema nervioso, oculares, respiratorias, miocarditis, diarrea y anomalías cardíacas congénitas (Bofill-Mas *et al.* 2005).

El cuadro clínico más frecuente causado por estos virus es la gastroenteritis, la cual es causa de mortalidad en países en vías de desarrollo y en países industrializados, afectando principalmente a los grupos extremos de edad (Gangarosa *et al.* 1992).

Otras manifestaciones de estos virus son fiebre, fatiga, dolor de cabeza, anorexia, mialgia, meningitis aséptica, encefalitis, síndrome de mano-pie-boca, síntomas respiratorios, demencia, ataxia, pérdida de memoria, herpangina y parálisis (Richman, *et al.* 2002). Estos cuadros pueden presentarse a repetición, si la persona se infecta nuevamente con el virus, ya que algunos de estos microorganismos no generan protección inmunitaria a largo plazo (Campos, 2003).

Como grupo, los virus sobreviven más tiempo que las bacterias o los protozoarios en el medio ambiente. Tienden a adsorberse a las superficies lo cual les protege ante condiciones adversas y prolongan su supervivencia en el agua. Los virus entéricos son

difíciles de detectar en las muestras ambientales ya que por lo general su concentración en grandes volúmenes de agua es escasa (Reynolds, 2001).

1.2 Métodos para el análisis de la presencia de virus en agua

Uno de los métodos utilizados para la detección de la presencia de virus en aguas es el cultivo celular, el cual lleva un proceso de identificación laborioso y costoso, provee resultados lentos, se deben aplicar distintas líneas celulares, según el tipo de virus que se quiera detectar y además es un procedimiento delicado que requiere ser realizado por personal calificado (Reynolds, 2001).

Otros métodos para la detección de estos virus, se basan en biología molecular, sobre todo en PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés), sin embargo, la mayoría de estos métodos se encuentran aún en desarrollo (Bofill-Mas *et al.* 2005), y su implementación requiere de un alto presupuesto económico.

Han sido descritas también, metodologías más sencillas, basadas en la aplicación de indicadores virales cuya presencia se relaciona con la posible existencia de virus patógenos humanos, como virus entéricos.

Dentro de estas metodologías, se pueden mencionar métodos como la detección de colifagos. Los colifagos son virus que infectan y se replican en *Escherichia coli* (Armon y Kott, 1996), estos fagos usan como hospedero específicamente a *Escherichia coli* del tracto gastrointestinal de organismos de sangre caliente, esto permite asegurar que su presencia en el ambiente se debe exclusivamente a la excreción de materia fecal (Paz-y-Miño *et al.* 2003).

La permanencia de los colifagos en el ambiente es de larga duración y se ha visto que resisten los procesos de purificación del agua de forma muy similar a los virus entéricos que afectan a los humanos, esto los convierte en excelentes parámetros para

determinar contaminación fecal y funcionar como marcadores del proceso de tratamiento de aguas (Skraber *et al.* 2004).

Los colifagos han sido ampliamente estudiados. Se han descrito dos grandes grupos, los somáticos y los llamados macho específicos (F^+) (Cole *et al.* 2003).

Los colifagos somáticos son virus de ADN que infectan la bacteria hospedera atravesando su membrana celular y los colifagos F^+ son virus que pueden ser ADN o ARN e infectan a las cepas de *E.coli* macho, por medio del pilus-F (EPA, 2001).

Comparando entre ambos grupos, la mayor ventaja en la detección de los colifagos somáticos, es que generalmente se encuentran en mayor concentración que los colifagos macho específico en aguas potables, superficiales y residuales, esto debe ser tomado en cuenta sobre todo en cuando se ensayan muestras de agua, cuyo grado de contaminación se espera bajo (Wentsel *et al.* 1982).

Las metodologías relacionadas con colifagos han sido descritas por varios organismos internacionales, entre ellas la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA, por sus siglas en inglés), que detalla el método para la detección de colifagos somáticos y F^+ por el procedimiento de capa simple de agar (EPA, 2001). Por otro lado el Standard Methods of Examination Water and Wastewater (SMEWW) de American Public Health Association (APHA, 2005) también ha descrito el método para la detección de colifagos somáticos por el procedimiento de capa doble de agar y capa simple de agar. Estos procedimientos son aplicables en países en vías de desarrollo ya que proveen resultados rápidos y accesibles económicamente.

1.3 Situación en Costa Rica

En Costa Rica, el 96% de las aguas negras recolectadas se disponen en los ríos, sin ningún tratamiento (AyA, 2002). Lo cual es preocupante si se considera que una persona infectada puede excretar concentraciones de hasta 10^{11} partículas virales por gramo de heces, inclusive en los casos asintomáticos. Las partículas virales pueden llegar a contaminar cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneos (Vidales, *et al.* 2004).

Un 12 % de los acueductos de Costa Rica son abastecidos con aguas superficiales, las cuales provienen de ríos, quebradas y embalses (MS, 2004); estas aguas son sometidas a procesos de potabilización y luego distribuidas por los acueductos a una parte importante de la población, sin embargo una de las mayores problemáticas es que por lo general los virus entéricos son muy resistentes a los sistemas de purificación de aguas (Wescot y Ayres, 1990).

Algunas de las enfermedades vinculadas con el agua, que se presentan con frecuencia en el país son: disentería amebiana, disentería bacilar, cólera, hepatitis A, fiebre paratifoidea, y tifoidea (AyA, 2002).

En un estudio en el que se recopilan los datos de 22 brotes de diarrea ocurridos en el país de 1999 al 2001, se determina que en un 52% de los brotes el agente causal es desconocido, 12% son causados por virus, 22% bacterias, 7% sustancias químicas y el mismo porcentaje es provocado por protozoarios (Valiente, 2001). A pesar de que el porcentaje de brotes causados por virus parece ser bajo, se debe mencionar que son los que afectan mayor número de personas y además existen grandes dificultades para la identificación de los mismos, aún en países desarrollados, por lo que es probable que incluso parte del 52% donde el agente causal es desconocido, pueda deberse a un virus.

En el ámbito legal, el marco normativo de Costa Rica, define el agua como potable cuando cumple con las disposiciones organolépticas, físicas, químicas, biológicas y

microbiológicas establecidas por el Ministerio de Salud en el “Reglamento Calidad del Agua Potable” Decreto N° 32327-S, sin embargo en esta reglamentación, los parámetros microbiológicos para determinar la calidad del agua, señalan únicamente determinación de la concentración de coliformes fecales y de *Escherichia coli* (MS, 2005).

Actualmente se carece de información sobre el perfil viral de las aguas en Costa Rica, por lo que la detección de colifagos, lograría ampliar el conocimiento microbiológico de las mismas. Solo si se posee una adecuada noción de la calidad de las aguas, se podrán adoptar medidas para asegurar de manera más fiable la potabilidad de la misma.

2. JUSTIFICACIÓN

Aproximadamente dos millones de personas mueren cada año, debido a enfermedades diarreicas, frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados, donde los más afectados son los niños menores de cinco años.

La presencia de diversos microorganismos tales como bacterias, protozoarios y virus, en el agua de consumo, genera brotes diarreicos y a pesar de que se realizan esfuerzos por garantizar la inocuidad de este líquido vital, se tiene el problema de que los métodos tradicionalmente utilizados para detectar contaminación fecal, están basados exclusivamente en la detección de bacterias.

Estos métodos basados únicamente en la detección bacteriana, no reflejan el comportamiento de patógenos virales, ni de otros parásitos como protozoarios.

Esto es preocupante ya que la presencia de virus en aguas, causa infecciones virales que pueden provocar desde gastroenteritis hasta casos graves de parálisis y muerte. Estas infecciones son de especial importancia en individuos inmunosuprimidos, en los cuales sus manifestaciones suelen ser más severas.

Otro aspecto importante de señalar, es que la mayoría de las metodologías aplicadas para la determinación de virus en aguas, se basan en la detección de un virus en específico, lo que conlleva un procedimiento largo y costoso, que no permite un rastreo general de virus patógenos; esto aunado al hecho de que la mayoría de estas metodologías no se encuentran bien estandarizadas, son las razones por las cuales muchos de los países se ven imposibilitados para implementarlas.

En Costa Rica, la reglamentación para agua potable, establece dentro de los lineamientos microbiológicos, únicamente indicadores bacterianos, esto es preocupante pues como lo señala la literatura, los sistemas de purificación de aguas utilizados, disminuyen sustancialmente las cargas bacterianas, sin embargo, los virus suelen ser

suelen ser más resistentes a estos procesos de desinfección, y además sus dosis infectantes suelen ser bajas (Wescot, 1990; Payment, 1993).

Contar con un sistema de detección de virus, es indispensable para la salud pública y dentro de esta perspectiva se enmarca el principal objetivo de este proyecto, que es implementar y optimizar dos métodos descritos en la literatura, para la detección de virus indicadores, que puedan ser utilizados para conocer el perfil viral de las aguas de Costa Rica.

Estos métodos que se pretenden implementar se basan en la detección de colifagos somáticos, que se han sugerido y aplicado en otros países como indicadores de la contaminación del agua, así como posibles modelos para virus entéricos ya que se asemejan a éstos en su persistencia ambiental, su comportamiento ante las tensiones ambientales, variación estacional, grado de resistencia a la cloración y además parecen eliminarse a un ritmo comparable en los procesos de tratamiento de aguas, por lo cual una muestra positiva por colifagos tiene una alta probabilidad de ser positiva por enterovirus (Cole *et al.* 2003).

La detección de colifagos es a la vez rápida y económica si se compara con otros métodos para el análisis de virus en aguas, por lo cual es una opción para ser implementado en países poco desarrollados.

3. OBJETIVOS

Objetivo general.

Implementar y optimizar el método de doble capa de agar y de capa simple de agar, para la determinación de colifagos somáticos en aguas y probarlo en matrices de agua de río en Costa Rica.

Objetivos específicos

1. Probar el método de doble capa de agar descrito en SMEWW de APHA (APHA, 2005) para determinación de colifagos somáticos en agua y optimizarlo para las condiciones del laboratorio.
2. Probar el método capa simple de agar descrito en SMEWW de APHA (APHA, 2005) y en EPA (EPA, 2001) para determinación de colifagos somáticos en agua y optimizarlo para las condiciones del laboratorio.
3. Comparar los métodos de doble capa de agar y capa simple de agar, en términos económicos, de facilidad en el procesamiento de muestras y en términos de eficacia en la recuperación de unidades formadoras de placas.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas

Escherichia coli 13706 ATCC.

Para recuperar el liofilizado de la bacteria hospedera *E.coli* 13706 ATCC, se siguieron los lineamientos estipulados por la ATCC. Se reconstituyó el liofilizado con caldo tripticasa soya (CTS, marca Oxoid®). Se cultivó en platos con agar tripticasa soya (ATS, marca Oxoid®) al 1,5%. Se tomaron colonias individuales que se inocularon en CTS. Se incubó 16 horas a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ con glicerol.

4.2 Cepas virales

Colifago Φ 174 ATCC

Se reconstituyó el stock de colifagos Φ 174 ATCC, CTS y se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este stock fue amplificado tomando 0,2 ml e incubándolos en 25-30 ml de cultivo de *E.coli* 13706 ATCC en fase logarítmica durante 4-6 horas a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para los ensayos se utilizaron concentrados virales o diluciones que se obtuvieron a partir de amplificados del stock de colifagos Φ 174 ATCC.

4.3 Protocolos base

4.3.1 Para la detección de colifagos somáticos por el método de capa simple de agar se tomó como base:

- El protocolo 1602 de la EPA para la detección de colifagos somáticos y macho específicos (EPA, 2001).

- El protocolo 9224 E de SMEWW (APHA, 2005)

4.3.2 Para la detección de colifagos somáticos por el método de capa doble de agar se tomó como base:

- El protocolo 9224 B de SMEWW (APHA, 2005).

A partir de estos protocolos se realizaron modificaciones para optimizar el método. Estas modificaciones se detallan en la sección de metodología y resultados ya que se ensayaron tomando como base los resultados obtenidos.

4.4 Medios de cultivo y reactivos

- Extracto de carne 1,5%: Lab-Lemco OXOID[®] LP0029
- Solución de glicerol al 50%:
- Caldo tripticasa soya (CTS): OXOID[®] CM-0129
- Agar tripticasa soya (ATS) 1,5%: CTS OXOID[®] CM-0129 y Agar SIGMA[®] A7002
- Agar tripticasa soya 1,2% de doble concentración: CTS OXOID[®] CM-0129 y Agar SIGMA[®] A7002
- Agar tripticasa soya 0.7%: CTS OXOID[®] CM-0129 y Agar SIGMA[®] A7002
- Tubos para dilución con triptona (tubos con CTS): CTS OXOID[®] CM-0129 y Agar SIGMA[®] A7002.
- Solución de cloruro de calcio (CaCl₂): MERCK[®] Art 2386
- Filtros: 0,22 µm Sartorius[®]

La preparación de estos medios de cultivo y reactivos puede encontrarse en el Anexo 1.

4.5 Procedimientos ensayados para lograr la obtención de la bacteria hospedera en fase logarítmica

Para utilizar la bacteria hospedera en la detección de los colifagos somáticos esta debe encontrarse en fase logarítmica. Para llegar a ello se ensayaron 4 métodos que se describen a continuación.

4.5.1 Metodología basada en tiempos de incubación

Se inoculó una asada de la cepa *E.coli* ATCC 13706 en 5 ml de CTS. Se incubó en agitación por 16 horas a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se transfirieron 1,5 ml del cultivo a un erlenmeyer con 30 ml de CTS y se incubó por 4 horas en agitación. Se almacenó el cultivo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Antes de inocular con el colifago, el cultivo bacteriano se incubó 2 horas más en agitación $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (APHA, 2005).

4.5.2 Metodología utilizando un estándar de McFarland 1%

Esta metodología es similar a la descrita por APHA en SMEWW y fue desarrollada en el laboratorio. En un tubo de ensayo con 5 mL de CTS se inoculó una asada de la cepa de trabajo *E.coli* ATCC 13706, se incubó por 16 horas a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, a partir de este cultivo se transfirieron volúmenes a otro tubo de ensayo con 5 mL de CTS, hasta alcanzar una turbidez semejante a un estándar de McFarland 1%. A partir del último se transfirieron 1,5 ml a un erlenmeyer con 30 ml de CTS y se incubó por 4 horas en agitación a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. El cultivo se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

4.5.3 Metodología utilizando espectrofotometría

En un erlenmeyer con 25 ml de CTS se inoculó una asada de la cepa *E.coli* ATCC 13706 y se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación por 18-20 horas. Se transfirieron 0,1 a 1 ml de este cultivo a otro erlenmeyer con 25 ml de CTS el cual se incubó en agitación por 4 horas. Terminada la incubación se tomó una alícuota y se le determinó la absorbancia en un Eppendorf[®] BioPhotomer plus a 560 nm. De acuerdo al protocolo la DO debe encontrarse entre 0,1-0,5 unidades de densidad óptica (DO). Cuando la DO fue baja se incubó el cultivo por más tiempo, cuando la DO fue más alta se diluyó en CTS hasta obtener una DO adecuada. Se almacenó el cultivo a 4 °C hasta su uso.

4.5.4 Metodología utilizando espectrofotometría y disminuyendo tiempos de incubación de *E. coli*

Para el ensayo de las muestras se utilizó una modificación al método espectrofotométrico descrito por EPA, se variaron los tiempos de incubación de la bacteria. En un erlenmeyer con 25 ml de CTS se inocularon entre 2 y 3 asadas grandes del cultivo congelado de *E.coli* ATCC 13706, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4-5 horas, se determinó y ajustó la DO.

Con el fin de validar la modificación del método descrita anteriormente, se realizó un ensayo de efecto del tiempo de incubación de la *E.coli* 13706 ATCC, sobre la determinación del título de un concentrado de colifagos.

En este ensayo se utilizó un concentrado de colifagos diluido 10^{-9} . Se analizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.7.3, con la variante de la aplicación de cultivos de *E.coli* con diferentes tiempos de incubación. La obtención de los cultivos se detalla a continuación y puede observarse de manera esquematizada en el Anexo 5

- *Cultivo de E.coli con un día de incubación:* se obtuvo inoculando 3 asadas de la bacteria en 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ en agitación durante 4 horas o hasta lograr una DO adecuada.

- *Cultivo de E.coli con dos días de incubación:* el día uno se inoculó una asada de la bacteria en un tubo con 5 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ durante toda la noche, el día dos se transfirieron 1,5 ml del cultivo a un erlenmeyer con 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ durante 4 horas en agitación y posterior a esto se inoculó un volumen adecuado del cultivo en un erlenmeyer con 30 ml de CTS, hasta ajustar la DO alrededor de 0,3.

- *Para tres días de incubación:* se realizó el mismo procedimiento que para dos días de incubación, pero el día dos después de la incubación de 4 horas, el cultivo se almacenó a 4 °C hasta el día siguiente. El día tres se transfirieron 1,5 ml del cultivo a un nuevo erlenmeyer con 30 ml de CTS y se incubó 4 horas en agitación, posterior a ello se inoculó un volumen adecuado del cultivo en un erlenmeyer con 30 ml de CTS, hasta ajustar la DO alrededor de 0,3.

- *Para cuatro días de incubación:* se realizó el mismo procedimiento que para tres días de incubación, solo que en el día tres después de la incubación de 4 horas, el cultivo se almacenó a 4 °C . El día cuatro, se transfirieron 1,5 ml del cultivo que se encontró a 4 °C , a un nuevo erlenmeyer con 30 ml de CTS y se incubó a $36,5\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ 4 horas en agitación, posterior a ello se inoculó un volumen adecuado del cultivo en un erlenmeyer con 30 ml de CTS, hasta ajustar la DO alrededor de 0,3.

4.6 Procedimiento de muestreo de agua de río, aplicado para las metodologías capa doble de agar y capa simple de agar

Las muestras de agua se recolectaron en 4 bolsas plásticas estériles, cada una con capacidad de 300 ml. Las bolsas fueron transportadas en hieleras con hielo en gel hasta el laboratorio, en un viaje de 45-90 minutos.

4.6.1 Muestreos en el río de Cascajal (Coronado)

En esta zona se realizaron dos muestreos en una zona alta del río, donde se observó poca influencia de actividad humana o animal. Para la colecta de las muestras se aplicaron los criterios de muestreo señalados SMEWW.

Ambos muestreos se realizaron entre 9:00 y 10 am., en época lluviosa y con una temperatura ambiente entre 15-20 °C.

4.6.2 Muestreos en el río Coris (Cartago)

En este río se realizaron tres muestreos, en una zona baja del río. En una exploración del trayecto del río se determinó que en las zonas aledañas hay chancheras, ganado, asentamientos humanos, industrias químicas y farmacéuticas.

Los muestreos en este río se realizaron en una zona lateral del cauce, todos entre las 9:00 y 10:00 am. El primer y tercer muestreo se realizaron en un época seca. Mientras que el segundo muestreo se realizó en época lluviosa, después de un fuerte temporal de dos semanas.

4.7 METODO 1: Capa doble de agar

4.7.1 Procedimientos ensayados para optimizar la amplificación del stock de colifagos Φ174 ATCC y la determinación de su título viral

4.7.1.1 Preparación de la bacteria hospedera y modificaciones aplicadas

Para lograr la obtención del cultivo de la bacteria hospedera en fase logarítmica, se aplicaron las formas descritas para este fin en la sección 4.5.

A pesar de que las metodologías originales de EPA y APHA solo señalaban la preparación de un cultivo de *E.coli* ATCC 13706 en fase logarítmica, para el método capa doble de agar se requirió la preparación de dos cultivos en paralelo, el cultivo 1 para incubar con el colifago y el cultivo 2 se requiere en el proceso de plaqueo de los colifagos.

4.7.1.2 Tiempo de incubación *E.coli*-colifago y modificaciones aplicadas

A los 25-30 ml del cultivo de *E. coli* 13706 ATCC en fase logarítmica preparado se le adicionó 0,2 ml de colifago Φ174 ATCC rehidratado y se incubó en agitación por 4 horas a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. La metodología original señala que se incula 1 ml de colifago rehidratado.

4.7.1.3 Proceso de filtración y modificaciones aplicadas

Se utilizó un sistema de filtración al vacío (Sartorius Stedim Biotech®), con 3 embudos, cada uno de ellos con su respectivo filtro, todo previamente esterilizado. Antes de la filtración, los filtros con un diámetro de poro de 22 μm fueron pretatados con extracto de carne 1,5%, que se dejó reposar por 2 minutos antes de encender la bomba de vacío. La metodología original señala que se deben pasar 10 ml de extracto de carne, en este caso se utilizaron 3 ml.

La filtración tardó aproximadamente 5 minutos. El filtrado se recogió en un erlenmeyer estéril.

4.7.1.4 Realización de diluciones y modificaciones aplicadas

A partir del un mililitro del filtrado se prepararon diluciones seriadas que fueron desde 0 (sin diluir) hasta 10^{-9} , sin embargo, las más utilizadas fueron entre 10^{-1} y 10^{-5} . Estas diluciones se realizaron de forma seriada en tubos para dilución con triptona.

4.7.1.5 Plaqueo de las diluciones

De acuerdo a lo descrito en los protocolos base del APHA y EPA, cada dilución se inoculó en agar tripticasa soya 0,7% (ATS 0,7%) a $44,5 \pm 1$ °C y plaqueó por quintuplicado en ATS 1,5 %.

A los con 3 ml de ATS 0,7 %, se les adicionó 0,1 ml del cultivo de la bacteria hospedera (cultivo 2) y 1 ml de la dilución correspondiente. Antes de vertirlos sobre las placas con ATS al 1,5 % solidificado, se agitaron por aproximadamente 30 segundos. Todas las placas fueron homogenizadas antes de la gelificación del medio.

4.7.1.6 Incubación de los platos de Petri

Los platos se incubaron invertidos toda la noche a $36,5 \pm 2,0$ °C. Al día siguiente se examinaron y se contó el número de unidades formadoras de placas (UFP) en cada uno.

4.7.1.7 Determinación del título del amplificado del stock de colifagos Φ174 ATCC

Para determinar el título se utilizaron los platos que contuvieran entre 20-100 UFP, siguiendo la siguiente fórmula:

$$C_a = (P/5) \times D$$

C_a es el título del stock filtrado (UFP /mL)

P el número total de placas en los 5 platos de la dilución respectiva.

D es el recíproco de la dilución

4.7.1.8 Preparación del control positivo

Para el control positivo se requiere que este contenga entre 30-80 UFP/ml. En los casos que el filtrado tuvo esta concentración, simplemente se fraccionó en alícuotas de 1,1 ml, se rotuló y almacenó. Cuando la concentración fue mayor se aplicó una dilución a los filtrados.

La estandarización del control positivo se realizó preparando 10 tubos de prueba, cada uno con 3 ml de agar, 0,1 ml del cultivo de la bacteria hospedera *E.coli* ATCC 13706 en fase log, y 1 ml del control positivo, se mezcló y chorreó en placas de petri. Los platos se incubaron por 18-20 horas a $36,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se calculó un promedio del número de placas en todos los platos (número total de placas, dividido entre 10, que es el número de platos), para diluciones adecuadas el recuento debe encontrarse entre 30 y 80 UFP.

4.7.1.9 Almacenamiento del control positivo, el stock amplificado y variables aplicadas

Un mililitro del stock amplificado obtenido en el punto 4.7.1.3 se utilizó para realizar diluciones. El resto se almacenó, según el título obtenido, para utilizarse como control positivo o como base para la preparación de concentrados virales.

Dado que ni la metodología original, ni la literatura consultada señalan cuál es la temperatura óptima de almacenamiento de los fagos, el filtrado que se fraccionó en alícuotas de 1,1 ml, se almacenó en tubos eppendorf a 4 °C en los primeros ensayos y a -70 °C en ensayos posteriores.

Se realizaron pruebas para determinar la temperatura óptima de almacenamiento de los colifagos. Un amplificado de colifagos con título conocido se dividió en alícuotas de 1,1 ml contenidas en tubos eppendorf que se almacenaron a tres temperaturas distintas, temperatura ambiente, 4 °C, -70 °C y -70 °C pero añadiendo 200 ml de glicerol. Todos los tubos eppendorf fueron almacenados durante un mes, y posteriormente se les volvió a cuantificar el título para determinar en cuanto había disminuido el mismo.

El procedimiento aplicado para determinar el título un mes después de almacenados, es el descrito en la sección 4.7.3.

4.7.2 Procedimientos ensayados para la obtención de los concentrados de colifagos Φ 174 ATCC y la determinación de su título viral.

4.7.2.1 Preparación de la bacteria hospedera y modificaciones aplicadas

Para lograr el cultivo de la bacteria hospedera se ensayaron los métodos estándar de McFarland 1% (sección 4.5.2) y el método espectrofotométrico descrito por la EPA (sección 4.5.3).

Las metodologías de referencia únicamente señalan la preparación de un cultivo de *E.coli* ATCC 13706 en fase logarítmica, para efectos de nuestro laboratorio en el método capa doble de agar se requirió la preparación de dos cultivos en paralelo, el cultivo 1 para incubar con el colifago y el cultivo 2 para el proceso de plaqueo de los colifagos.

4.7.2.2 Variables aplicadas en el tiempo de incubación *E.coli*-colifago

Se prepararon 25-30 ml de cultivo de *E. coli* ATCC 13706 en fase logarítmica al cual se le adicionó 1 ml del amplificado del stock de colifagos y se incubó en agitación por 4 horas a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7.2.3 Proceso de filtración y modificaciones aplicadas

Se realiza igual al procedimiento descrito en la sección 4.7.1.3.

4.7.2.4 Realización de diluciones y modificaciones aplicadas

A partir del amplificado se prepararon diluciones en el rango de 10^{-1} hasta 10^{-12} , realizando diluciones seriadas en tubos para dilución con triptona.

Las diluciones fueron plaqueadas tomando en cuenta la posible concentración, por ejemplo en concentrados de colifagos donde la concentración se esperaba alta, no se plaquearon las diluciones bajas del amplificado, como 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

4.7.2.5 Plaqueo de las diluciones y determinación del título del concentrado de colifagos

Este procedimiento se realiza igual al descrito en las secciones del 4.7.1.5 al 4.7.1.7.

4.7.2.6 Preparación y almacenamiento del control positivo y del concentrado de colifagos

Este procedimiento se realiza igual al descrito en las secciones 4.7.1.8 y 4.7.1.9. En los casos donde se contaba de previo con el control positivo se toma una de las alícuotas del congelador y se ensaya como si fuera 1 ml de una dilución, por el método descrito en la sección 4.7.1.5 pero sin realizarlo por quintuplicado.

4.7.3 Procedimientos ensayados para corroborar el título de un amplificado de stock de colifagos, de un concentrado de colifagos y para determinar el título de colifagos en una muestra de río

Los ensayos se estructuran como se señala en la sección 4.7.2, se requiere únicamente un cultivo de *E.coli* en fase logarítmica. No se incluyen los pasos de incubación bacteria-fago (4.7.2.2), ni el proceso de filtración (4.7.2.3).

El procedimiento inicia con la elaboración de diluciones seriadas, las cuales pueden realizarse a partir de 1ml del amplificado de stock de colifagos, de un concentrado de colifagos almacenados o de la muestra. El rango de las diluciones utilizadas para esos ensayos puede ir desde 10^{-1} hasta 10^{-12} , sin embargo, el rango más utilizado fue de 10^{-1} hasta 10^{-5} . Todo el resto del procedimiento es igual al descrito en la sección señalada.

Además se determinó el título de un amplificado de stock de colifagos, utilizando dos cultivos bacterianos cuya densidad óptica corresponda a los extremos recomendados en la literatura (un cultivo con una DO igual a 0,1 y otro con una DO igual a 0,5), con el fin de verificar la aplicabilidad de todo el rango de DO señalado en la literatura.

4.7.4 Procedimiento para ensayo de muestras de río

Este método fue utilizado para las muestras de río de Cascajal. La preparación del cultivo de la bacteria hospedera en fase logarímicamente se obtuvo mediante el método espectrofotométrico modificando los tiempos de incubación (sección 4.5.4).

Para este procedimiento no se realizaron variantes a la metodología original descrita. Se prepararon 12 tubos, cada uno con 3 ml de ATS 0,7% fundido, y se mantuvieron a 44,5 °C en un baño María. Diez de los tubos fueron utilizados para la muestra, uno para control positivo y uno como control negativo. A los 12 tubos se les añadió 0,1 ml del cultivo bacteriano en fase logarímicamente. Al tubo del control negativo se le agregó 1 ml de CTS. Al control positivo se le agregó 1 ml de control positivo (obtenido en la sección 4.7.1.8). A cada uno de los tubos para muestra se les adicionó 1 ml de la muestra. Todos los tubos fueron agitados inmediatamente y colocados en un plato de Petri que contenía ATS 1,5% solidificado.

Los platos se rotaron sobre una superficie plana para distribuir adecuadamente el agar, y se dejaron solidificar. Una vez listos se incubaron a 36,5 °C ± 2,0 ° C por 18-20 horas. Al día siguiente se hizo el recuento de UFP en los 10 platos de la muestra.

La concentración de colifagos somáticos se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$C_a = (P/10) \times D$$

C_a es el título de la muestra. (PFU/mL)

P es el número total de placas en los 10 platos.

D es el recíproco de la dilución.

4.8 METODO 2: Capa simple de agar

4.8.1 Procedimientos ensayados para el análisis de agua inoculada con amplificadores del stock de colifagos Φ174 ATCC o con concentrados de colifagos

4.8.1.1 Preparación de la bacteria hospedera y modificaciones aplicadas

Para este método la preparación de la bacteria hospedera en la fase logarítmica se realizó por el método espectrofotométrico descrito por la EPA (sección 4.5.3).

Para el método de capa simple de agar solo fue necesario preparar un cultivo de 25-30 ml de la bacteria hospedera.

4.8.1.2 Inoculación de agua destilada con concentrado de colifagos y vertido de la mezcla en platos de Petri

En un erlenmeyer estéril de 500 ml de capacidad se colocaron 99 ml de agua destilada. El erlenmeyer se colocó en un baño María a $44,5 \pm 1$ °C hasta atemperar. Una vez alcanzada la misma temperatura, se adicionaron 5 ml de la solución CaCl_2 , 10 ml del cultivo de la bacteria hospedera y 1 ml del concentrado del stock de colifagos o una dilución del mismo.

La mezcla se colocó nuevamente en el baño María durante 3 minutos, transcurrido este tiempo, la muestra de agua inoculada se mezcló con 100 ml de ATS (1,2% de doble concentración) fundido que se encontraba también a $44,5 \pm 1$ °C. La mezcla se homogenizó y se distribuyó en 10 platos de Petri de vidrio, los cuales se rotaron sobre una superficie plana dejándolos solidificar.

4.8.1.3 Preparación del control positivo

Para la preparación del control positivo se utilizaron dos erlenmeyers de 50 ml de capacidad, uno contuvo 12,5 ml de ATS (1,2% de doble concentración) fundido y el otro 12,5 ml de agua destilada, ambos se autoclavaron 15 min a 121 °C, posterior a esto se mantuvieron a 44,5 °C \pm 1 °C. Al erlenmeyer que contenía el agua se le agregó 1ml del stock de control positivo y 1 ml de la bacteria hospedera, posteriormente se mezcló con los 12,5 ml del agar fundido. Finalmente se depositó la mezcla en un único plato de Petri de vidrio y se dejó en reposo hasta que se logró la solidificación del agar.

4.8.1.4 Preparación del control negativo

Se preparó igual que el control positivo, pero se omitió el mililitro del stock de control positivo.

4.8.1.5 Incubación de los platos de Petri

Todos los platos fueron incubados invertidos a 36,5 °C \pm 2 °C durante toda la noche.

4.8.1.6 Determinación del título de la muestra de agua inoculada

A las 18-20 horas de incubación los platos fueron revisados. Se contabilizó el número total de UFP en los 10 platos correspondientes a las muestras, se expresa como UFP/100 ml de muestra. Para determinar el título del amplificado del stock o concentrado de colifagos con el que se inocula la muestra, se tomó en cuenta la dilución con la que se inoculó la muestra, además de la dilución 1/100 obtenida inherente al método. Para lo anterior se utilizan las siguientes fórmulas:

-*Título de la muestra inoculada (UFP/100 ml)* = Σ UFP en los 10 platos

-*Título de la muestra inoculada (UFP/ ml)* = #UFP en las 10 platos/100

-*Título del amplificado (UFP/ ml)* = (#UFP en las 10 placas \times Factor de dilución) /100

El factor de dilución que se debe contemplar para la fórmula es el factor de dilución final, que se obtienen al multiplicar el factor de dilución del concentrado de fagos que se inocula, por 10^2 , ya que se inocula 1 ml de la dilución del concentrado en 99 ml de agua destilada.

4.8.2 Procedimientos ensayados para el análisis de muestras de agua de río

4.8.2.1 Preparación de la bacteria hospedera y modificaciones aplicadas

La preparación de la bacteria hospedera en la fase logarítmica se realizó únicamente por el método espectrofotométrico modificado, disminuyendo los tiempos de incubación de la *E.coli* (sección 4.5.4).

4.8.2.2 Proceso de filtración y modificaciones aplicadas

La filtración de las muestras de agua de río se realiza de la misma forma descrita en la sección 4.7.1.3. El volumen de agua filtrado osciló entre 400 y 600 ml.

4.8.2.3 Preparación de la muestra y plaqueo de la mezcla en platos de Petri

Se removió estérilmente una alícuota de 100 ml del filtrado y se colocó en un erlenmeyer estéril de 500 ml, se incubó en baño María a $44,5 \pm 1$ °C por 3 minutos. Una vez lograda la homogeneidad en la temperatura se le adicionan 5 ml de la solución CaCl_2 y 10 ml del cultivo de la bacteria hospedera.

La mezcla se colocó nuevamente en el baño María durante 3 minutos, transcurrido este tiempo, se le adiciona a la mezcla 100 ml de ATS (1,2% de doble concentración) fundido (a una temperatura de $44,5 \pm 1$ °C). La mezcla se agitó hasta homogenizar y posteriormente se distribuyó en 10 platos de Petri de vidrio, los cuales se rotaron sobre una superficie sólida dejándolos solidificar.

4.8.2.4 Preparación del control positivo y negativo

Se preparó como se describe en las secciones 4.8.1.3 y 4.8.1.4.

4.8.2.5 Incubación de los platos de Petri y determinación del título de la muestra de agua inoculada

Se realizó como se describe en las secciones 4.8.1.5 y 4.8.1.6.

Para calcular el título de la muestra de agua de río, se utilizó la siguiente fórmula

-Título de la muestra de río (UFP/100 ml) = Σ UFP en los 10 platos

4.8.2.6 Repetición de la prueba después de almacenar la muestra 48 horas a 4°C

De las muestras filtradas, se ensayaron 100 ml el día de la filtración, el resto de la muestra filtrada se almacenó a 4 °C, 48 horas después se repitió la prueba iniciando en el punto 4.8.2.3 en adelante.

4.9 Metodología combinada capa doble de agar/capa simple de agar

El método se analizó con muestras de agua inoculadas. El primer día se inoculó 198 ml de agua destilada estéril, con 2 ml de un concentrado de virus de título conocido.

Se ensayó la muestra por el método capa doble de agar, utilizando procedimiento descrito en la sección 4.7.3 utilizando diluciones desde cero hasta 10^{-5} y plaqueando solo 1 o 2 platos y no 5 por cada dilución. A partir de los resultados se calculó el título de la muestra inoculada

Según el título obtenido se evalúa si es necesario diluir la muestra, con el fin de obtener 100 ml muestra con un título que permita un recuento adecuado de UFP por el método de capa simple (no más de 200 UFP/plato).

Una vez listos los 100 ml de muestra o 100 ml de dilución de la muestra, se ensayó por el método de capa simple de agar descrito en la sección 4.8.1. Se determinó el título de la muestra, de la siguiente forma:

$$\text{Título del amplificado(UFP/ ml)} = (\text{\#UFP en las 10 placas} \times \text{Factor de dilución}) / 100$$

El factor de dilución que se debe contemplar para la fórmula es el factor de dilución final, que se obtienen al multiplicar el factor de dilución del concentrado de fagos que se inocula, por 10^2 , ya que se inocula 2 ml de la dilución del concentrado en 198 ml de agua destilada.

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS PARA LAS MUESTRAS DE AGUA INOCULADA

5.1.1 METODO 1: Capa doble de agar

5.1.1.1 Resultados obtenidos en los procedimientos para lograr la obtención de la bacteria hospedera en fase logarítmica (sección 4.5)

En el primer ensayo se realizó una amplificación del stock de colifagos Φ 174 ATCC, utilizando la metodología basada en tiempos de incubación para la obtención de la bacteria *E. coli* 13706 ATCC en fase logarítmica (sección 4.5.1).

Para este ensayo al amplificado viral se le aplicó diluciones de 10^{-1} a 10^{-9} , y se plaqueó por quintuplicado cada una de ellas, finalmente se obtuvo un resultado negativo, con cero UFP en los 45 platos.

Para este primer ensayo se observó que la concentración del cultivo bacteriano fue muy alta, por lo cual, se volvió a realizar una amplificación del stock de colifagos Φ 174 ATCC, utilizando un cultivo bacteriano cuya concentración se reguló por medio de un estándar de McFarland 1% (sección 4.5.2). Los resultados de este ensayo se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro N° 1

Cuantificación de UFP y determinación del título viral, en un amplificado del stock de colifagos Φ 174 ATCC, utilizando un cultivo de *E.coli* 13706 ATCC obtenido por el método de estándar de McFarland 1%

Dilución	Número de platos con UFP	# UFP				
10^{-1}	5	I	I	I	I	I
10^{-2}	5	45	45	41	35	25 M
10^{-3}	5	9	9	6	6	4
10^{-4}	2	1	1	0	0	0
10^{-5}	0	0	0	0	0	0
Título	$3,82 \times 10^2$ UFP/ml					

M = megaplasas I = incontables

La dilución 10^{-2} de este amplificado viral titulado, fue utilizada como control positivo en pruebas posteriores.



Figura 1. UFP provenientes de un amplificado del stock de colifagos Φ 174 ATCC, obtenidas utilizando un cultivo de *E.coli* 13706 ATCC cuya concentración se reguló con un estándar de McFarland 1%

En el plato de Petri se observó una capa opaca uniforme en la superficie del agar, la cual es provocada por el crecimiento de la bacteria *E.coli*, además se observaron pequeñas depresiones brillantes que representan a las unidades formadoras de placas (UFP). Las UFP pueden tener un tamaño variable de 1 mm a 10 mm.

Se realizó una prueba en la cual se ensayaron diluciones de un amplificado de stock de colifagos, en cultivos con dos densidades ópticas que corresponden a los extremos del rango establecido por la literatura. Los resultados se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro N° 2
Comparación de la recuperación de UFP provenientes de un amplificado de colifagos, utilizando DO=0,1 y DO= 0,5

Dilución	DO 0.1					DO 0,5				
	<i># UFC en cada uno de los 5 platos</i>					<i># UFC en cada uno de los 5 platos</i>				
10 ⁻⁵	Incontables en los 5 platos					Incontables en los 5 platos				
10 ⁻⁶	32	30	25	23	21	46	46	40	33	33
10 ⁻⁷	8	7	5	4	2	10	7	5	5	4
Título	2,62 x 10 ⁷ UFP/ml					3,96 x 10 ⁷ UFP/ml				

DO = densidad óptica

En los platos con cultivo bacteriano de DO = 0,1 la sobrecapa bacteriana no fue tan uniforme, se observó pequeños espacios sin colonias bacterianas, mientras que en los platos con cultivo bacteriano de DO = 0,5 la sobrecapa bacteriana fue muy confluyente, lo que genera que las UFP sean más pequeñas que las que se presentaron en otras pruebas en las cuales se utilizó una DO intermedia, cercana a 0.3.

5.1.1.2 Importancia de la concentración bacteriana y la polaridad del filtro

En uno de los ensayos se filtró dos veces un amplificado viral, para determinar como influye la polaridad del filtro y la capa de bacterias atrapadas sobre el filtro, en el paso de los colifagos a través del sistema de filtración. El refiltrado se realizó sobre los mismos filtros en los que se filtró por primera vez.

Cuadro N° 3
Número de UFP y determinación del título de dos amplificadores virales,
uno filtrado y el otro refiltrado

Dilución	Amplificado después de la primera filtración						Amplificado refiltrado					
	# Platos con UFP	# UFP					# Platos Con UFP	# Platos con UFP				
10 ⁻¹	5	I	I	I	I	I	5	4	4	4	3	2
10 ⁻²	5	45	45	41	35	25	1	1	0	0	0	0
10 ⁻³	5	9	9	6	6	4	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Título	3 800 UFP / ml						34 UFP/ml					

I= incontables

5.1.1.3 Observación de los resultados según la carga viral

Se realizó un ensayo para determinar el título viral de un concentrado de colifagos (sección 4.7.2), utilizando como base 1 ml del amplificado de colifagos Φ174 ATCC al cual se le aplicaron diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁵ y se plaqueó por quintuplicado cada una de ellas, obteniendo como resultado platos con sobrecapa bacteriana totalmente lisada (“todo lisado”=TL) por lo cual no se observaron UFP individuales.

Dentro de las diferencias observadas entre un plato negativo y un plato positivo sin UFP evidentes, se tiene que la superficie del agar de un plato negativo es opaca, mientras que la de un positivo sin UFP evidentes es brillante. Por otro lado un plato de Petri con un cultivo positivo por colifagos es más traslúcido que un plato negativo (Figura 2).

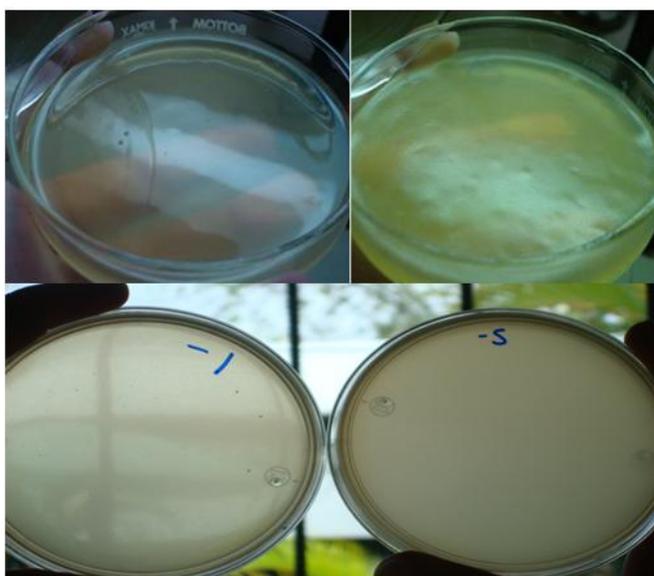


Figura 2. Izquierda: Platos positivos por colifagos pero sin unidades formadoras de placas evidentes. Derecha: platos con resultados negativos por colifagos.

Para comprobar que los platos sin UFP evidentes eran positivos, se realizaron dos pruebas adicionales en las que el concentrado de virus a ensayar se preparo a partir de 1 ml de diluciones 1/10 y 1/100 del amplificado del stock de colifagos y no directamente 1 ml del mismo.

Cuadro N° 4

Cuantificación de UFP y determinación del título viral de un concentrado de colifagos, preparado a partir de diluciones de un amplificado stock de colifagos Φ 174 ATCC

Dilución	Dilución 1/10 del colifago					Dilución 1/100 del colifago						
	# Platos con UFP	# UFP					# Platos con UFP	# UFP				
10^{-1}	5	TL	TL	TL	TL	TL	5	I	I	I	I	I
10^{-2}	5	I	I	I	I	I	5	66	64	57	57	49
10^{-3}	5	66	62	58	48	42	3	11	11	8	6	5
10^{-4}	5	8	6	5	5	3	2	2	1	1	0	0
10^{-5}	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Título	$5,52 \times 10^5$ UFP/ ml					$5,86 \times 10^5$ UFP / ml						

Tl = todo lisado, I = incontable

En el cuadro 4 se presentan resultados expresados como “todo lisado e incontable”, cuya morfología puede observarse en el Anexo 4.

5.1.1.4 Temperatura óptima para el almacenamiento de los colifagos

Inicialmente los colifagos Φ 174 ATCC del stock original, los amplificados y concentrados de colifagos se almacenaron a 4 °C.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al determinar el título de un amplificado viral el día de su amplificación y posteriormente al ensayarlo por el método descrito en la sección 4.7.3, para corroborar su título viral tras 49 y 97 días de almacenamiento a 4 °C.

Cuadro N° 5

Títulos virales obtenidos para un amplificado de colifagos Φ 174 ATCC el día de su amplificación, 49 días y 97 días posterior a su almacenamiento a 4°C

Dilución	Amplificado de colifagos el día de la amplificación						Amplificado de colifagos con 49 días de almacenamiento a 4 °C						Amplificado de colifagos con 97 días de almacenamiento a 4 °C					
	# Platos con UFP	# UFP					# Platos con UFP	# UFP					# Platos con UFP	# UFP				
10 ⁻¹	5	1	1	1	1	1	5	43	40	38	27	22	0	0	0	0	0	0
10 ⁻²	5	45	45	41	35	25	5	4	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0
10 ⁻³	5	9	9	6	6	4	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴	2	1	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
Título del amplificado	3,82 x 10 ³ UFP/ml						3,40 x 10 ² UFP/ml						0 UFP/ ml					

Se observó una disminución en las UFP, al aumentar el tiempo de almacenamiento a 4 °C

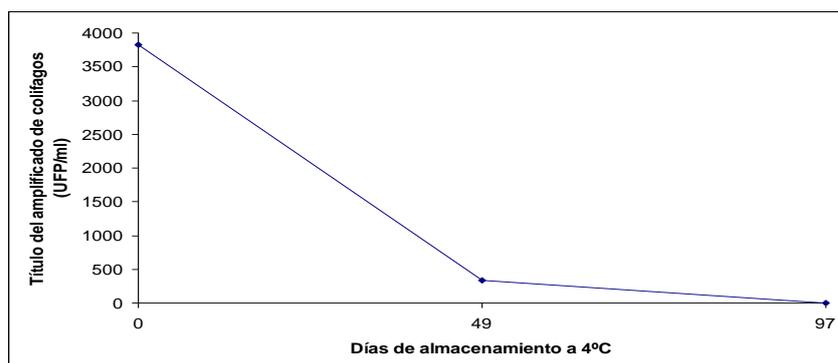


Figura 3. Título de un amplificado viral de colifagos Φ 174 ATCC el día de su amplificación (día cero), 49 días y 97 días posterior a su almacenamiento a 4°C

El título inicial del concentrado viral utilizado para la prueba de temperatura óptima de almacenamiento para colifagos (descrito en la sección 4.7.1.9) fue de $2,26 \times 10^4$ UFP/ml antes de su almacenamiento, el día de su amplificación.

Después de un mes de almacenamiento de este amplificado viral a diferentes temperaturas, se obtuvo los siguientes títulos: 61 UFP/ml a temperatura ambiente; $2,76 \times 10^3$ UFP/ml a 4 °C; $2,14 \times 10^4$ UFP/ml a -70 °C sin adicionar glicerol y $2,12 \times 10^4$ UFP/ml a -70 °C adicionando glicerol al criovial (ver Anexo 5).

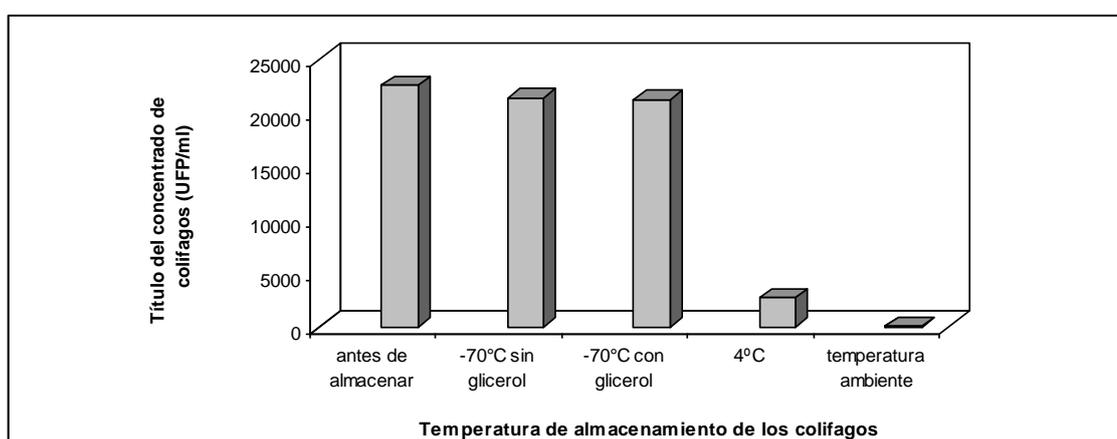


Figura 4. Títulos obtenidos para un concentrado de colifagos Φ 174 ATCC, antes de su almacenamiento y posterior a un mes de almacenamiento a diferentes temperaturas

El título de los colifagos antes de almacenarlos fue de $2,26 \times 10^4$; $2,14 \times 10^4$ UFP/ml tras un mes de almacenamiento a -70°C y $7,25 \times 10^2$ UFP/ml posterior a un almacenamiento de siete meses a -70°C (Figura 5).

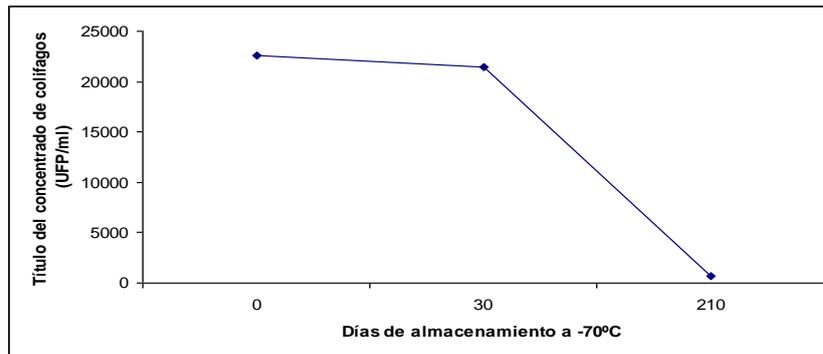


Figura 5. Título obtenido para el concentrado de colifagos $\Phi 174$ ATCC el día de su amplificación (día cero) y posterior a uno y siete meses de almacenamiento a -70°C

5.1.1.5 Algunas de las pruebas realizadas para corroborar la reproducibilidad del ensayo capa doble de agar

Para corroborar la reproducibilidad de la prueba se realizaron repeticiones de ensayos en los que se determina el título viral de concentrados de colifagos, teniendo en este caso densidad óptica, temperatura de almacenamiento de fagos y obtención del cultivo bacteriano controlados según lo que se había ensayado en pruebas anteriores.

Cuadro N° 6
Comparación del número de UFP y de los títulos virales obtenidos para un
concentrado de colifagos Φ174 ATCC ensayado en tres repeticiones

Dilución	Ensayo 1						Ensayo 2						Ensayo 3					
	# Platos con UFP	# UFP					# Platos con UFP	# UFP					# Platos con UFP	# UFP				
10 ⁻¹	5	I	I	I	I	I	5	I	I	I	I	I	5	I	I	I	I	I
10 ⁻²	5	47	52	45	50	47	5	50	48	45	47	46	5	45	53	48	50	47
10 ⁻³	5	10	12	7	9	9	5	8	10	9	11	10	5	7	10	9	6	12
10 ⁻⁴	1	1	0	0	0	0	2	1	1	-	-	-	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
Título del amplificado	4,82 x 10 ³ UFP/ml						4,72 x 10 ³ UFP/ml						4,86 x 10 ³ UFP/ ml					

5.1.1.6 Pruebas realizadas para determinar el tiempo de incubación necesario para que el cultivo de la bacteria hospedera esté en fase logarítmica y disponible para utilizar en los ensayos.

A continuación se presentan los resultados al ensayar el método descrito en la sección 4.5.4.

Cuadro N° 7
Recuento de UFP y determinación del título viral de un concentrado
de colifagos Φ174 ATCC, según la edad del cultivo de *E.coli* 13706 ATCC

Dilución	Edad del cultivo (días)	#UFP					Título (UFP/ml)
10 ⁻⁹	1	51	47	43	42	35	4,36x10 ¹⁰
	2	53	45	39	39	42	4,36x10 ¹⁰
	3	0	0	0	0	0	0
	4	46	46	43	42	39	4,32x10 ¹⁰

5.1.2 MÉTODO 2: Capa simple de agar

A continuación se presentan los resultados obtenidos al ensayar por el método capa simple de agar, 99 ml de agua destilada estéril inoculada con 1 ml de amplificado de colifagos Φ 174 ATCC.

Cuadro N° 8
Número de UFP y determinación del título de un amplificado de colifagos Φ 174 ATCC, por el método de capa simple de agar

Plato	Número de UFP
1	30
2	26
3	24
4	22
5	22
6	20
7	18
8	13
9	12
Total	187 UFP/100ml
<i>Título de la muestra inoculada</i>	$1,87 \times 10^2$ UFP/ml



Figura 6. Platos de Petri con UFP obtenidas por el método de capa simple de agar

En los platos se observó una superficie del agar más brillante que en capa doble de agar. Las UFP están inmersas en el agar, son de un tamaño variable y son menos definidas que las obtenidas por el método capa doble.

Por el método capa doble de agar se determinó un título viral de $3,84 \times 10^7$ UFP/ml, para un concentrado de colifagos, este mismo concentrado viral se analizó por el método capa simple de agar, según se describe en la sección 4.8.1 de la metodología. Para este ensayo se hicieron diluciones seriadas del concentrado hasta 10^{-4} , y se inoculó 1 ml de la dilución 10^{-4} en 99 ml de agua destilada estéril, obteniendo una dilución final de 10^{-6} . Éste ensayo por capa simple de agar se repitió en dos días distintos y los resultados se presentan en el cuadro 9.

Cuadro N° 9
Número de UFP y título de un amplificado de colifagos $\Phi 174$ ATCC, por el método de capa simple de agar utilizando para la determinación una dilución final de 10^{-6} del concentrado de colifagos

Plato	Dilución 10^{-6}	Repetición con dilución 10^{-6}
	#UFC	#UFP
1	157	127
2	184	145
3	185	140
4	170	142
5	187	193
6	142	175
7	180	158
8	151	168
9	176	170
10	182	158
Total	1714 UFP/100ml	1576 UFP/100ml
<i>Título del concentrado de colifagos</i>	$1,71 \times 10^7$ UFP/ml	$1,58 \times 10^7$ UFP/ml

Se realizaron más repeticiones, a partir del mismo concentrado de colifagos ($3,84 \times 10^7$ UFP/ml) pero esta vez inoculando las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} , para obtener en las muestras de agua inoculada diluciones finales de 10^{-7} y 10^{-8} , para las cuales se obtuvo un título de concentrado de colifagos de $2,41 \times 10^7$ UFP/ml y $3,80 \times 10^7$ UFP/ml (ver detalle en Anexo 5)

5.1.3 MÉTODO 3: combinación capa doble de agar/capa simple de agar

Se ensayó como se describe en la sección 4.9 de la metodología. Se prepararon 200 ml de muestra inoculada, con un concentrado de colifagos de título conocido, llevando la muestra a una concentración final aproximada de $1,6 \times 10^2$ UFP/ml.

Cuando la muestra se analizó por capa doble de agar se obtuvo un título de $1,9 \times 10^2$ UFP/ml. Se realizó una dilución 1/10 de la muestra, tomando 10 ml de la muestra e inoculándola en 90 ml de agua destilada estéril, obteniendo 100 ml para ensayar por el método capa simple de agar. Se esperaba obtener 1900 UFP en los 100 ml ensayados, para llegar a un título final de $1,9 \times 10^2$ UFP/ml, sin embargo se obtuvo 258 UFP/100ml para una concentración de $2,58 \times 10^1$ UFP/ml.

Estas pruebas se repitieron dos veces más, los resultados se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro N° 10
Número de UFP y determinación de los títulos virales para una muestra de agua inoculada, analizada por los métodos capa simple de agar y capa doble de agar

Dilución	Ensayo	Capa doble de agar		Capa simple de agar	
		Título viral de la muestra inoculada	Título viral de la muestra inoculada	Promedio de UFP/plato	Total de UFP
10^{-1}	1	$3,3 \times 10^2$ UFP/ml	$8,3 \times 10^1$ UFP/ml	80	826 UFP/100 ml
	2	$4,0 \times 10^2$ UFP/ml	$1,6 \times 10^2$ UFP/ml	145	1605 UFP/100 ml

5.1.4 Comparación entre los métodos capa simple de agar y capa doble de agar

Por el método de capa doble se obtuvo una sobrecapa bacteriana en la superficie del agar, por lo cual el aspecto de esta es opaca, mientras que en capa simple las bacterias están inmersas en el agar, no hay una sobrecapa bacteriana y la superficie del plato es más brillante (Figura 7).

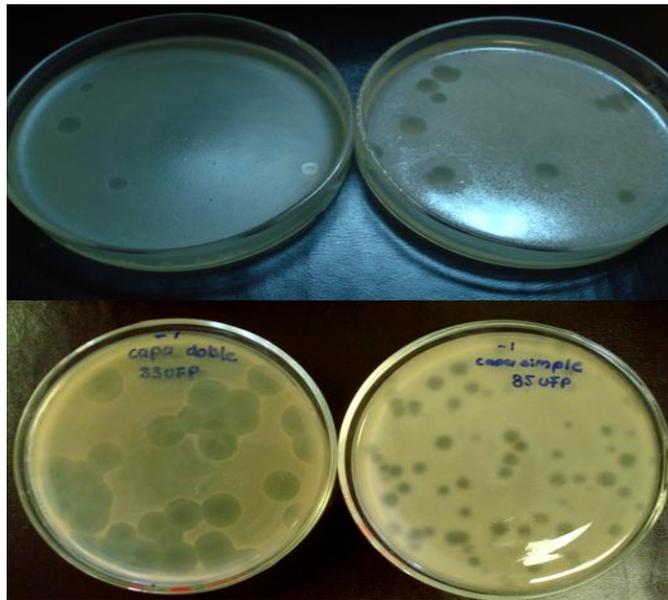


Figura 7. Arriba platos vistos de frente, abajo platos vistos por el reverso. Izquierda: Platos de Petri con cultivos obtenidos aplicando el método de capa doble. Derecha: Platos de Petri con cultivos obtenidos aplicando el método de capa simple.

En el método capa doble de agar las unidades formadoras de placas son más definidas y se presentan como depresiones en la sobrecapa bacteriana, en tanto que por el método de capa simple las UFP están inmersas en el agar, lo que las vuelve ligeramente difusas.

Cuando el título de colifagos es más alto, las UFP analizadas por el método capa simple de agar suelen ser más pequeñas, las analizadas por capa doble mantienen su tamaño habitual y tienden a unirse entre sí formando megaplacas.

5.2 RESULTADOS PARA LAS MUESTRAS DE AGUA DE RÍO

5.2.1 Muestreos en Río Cascajal (Coronado)

- Primer y segundo muestreo

Las muestras provenientes del Río Cascajal fueron probadas por los métodos de capa doble descritos en las secciones 4.7.4 y 4.7.3, utilizando en este último diluciones de la muestra hasta 10^{-5} , para ambos ensayos se obtuvieron resultados negativos por colifagos.

Los platos de Petri presentan un aspecto similar al observado en las pruebas aplicadas para implementar la técnica capa doble de agar además los resultados de los controles positivo y negativo son adecuados.

5.2.2 Muestreos en el Río Coris (Cartago)

A las muestras del Río Coris se les determinó el título viral el día del muestreo y posterior a 48 horas de almacenamiento a 4 °C. Los métodos capa doble de agar y capa simple de agar se realizaron en paralelo el mismo día.

- Primer muestreo

Este muestreo se realizó en una época de baja pluviosidad, no se presentaron lluvias dos semanas previas al evento de muestreo.

Cuadro N° 11
Número de UFP y título de colifagos obtenido por el método de capa doble de agar,
en la muestra de agua del Río Coris, el día del muestreo
y posterior a un almacenamiento de 48 horas a 4 °C

Dilución	Día del muestreo					Después de 48 horas a 4 °C				
	# UFP/ plato					# UFP/plato				
0	4	2	1	1	0	6	5	5	5	2
10 ⁻¹	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
10 ⁻²	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
10 ⁻³	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
Título	1,6 UFP/ml					4,6 UFP/ml				

Cuadro N° 12
Número de UFP y determinación del título de colifagos en una muestra de agua del Río Coris,
ensayada por el método de capa simple de agar el día del muestreo y posterior
a un almacenamiento de 48 horas a 4 °C

Plato	Día del muestreo	Después de 48 horas a 4 °C
	#UFP	#UFP
1	24	37
2	23	35
3	22	30
4	17	29
5	16	29
6	15	29
7	14	26
8	9	25
9	7	25
10	6	25
Total	153 UFP/100ml	290 UFP/100ml
Título	1,53UFP/ml	2,90 UFP/ml

El mismo día del muestreo se obtiene 1,6 UFP/ml y 1,53 UFP/ml para capa doble y capa simple respectivamente. Posterior a un almacenamiento de 48 h a 4 °C se obtienen recuentos de 4,6 UFP/ml utilizando capa doble de agar y 2,9 UFP/ml utilizando capa simple de agar.

Durante la lectura de las muestras se observó en los platos de Petri gran cantidad de burbujas, esta interferencia se mantuvo aunque en menor proporción, después de 48 horas de incubación. La distribución y proporción de las burbujas no es homogénea, si se compara entre los platos algunos presentan baja cantidad de burbujas distribuidas principalmente en la periferia del plato, mientras que otros las presentan de manera uniforme en todo el plato (Figura 8). A diferencia de las muestras, los platos de Petri de los controles de la prueba presentan poca cantidad de burbujas (Anexo 4).



Figura 8. Tres de los diez platos utilizados para la muestra. Izquierda: plato con burbujas distribuidas en la periferia. Centro: plato con burbujas distribuidas uniformemente en el agar. Derecha: plato con pocas burbujas.

-Segundo muestreo.

Este muestreo se realiza tras un fuerte temporal que modifica las condiciones de la periferia del río. Además la muestra presenta cantidades altas de sólidos suspendidos por lo que la filtración fue bastante lenta.

Cuadro N° 13
Número de UFP y título de colifagos, obtenido por el método de capa simple de agar,
en una muestra de agua del Río Coris, ensayada el día del muestreo
y posterior a un almacenamiento de 48 horas a 4 °C

Plato	Día del muestreo	Después de 48 horas a 4 °C
	# UFP/ plato	# UFP/ plato
1	9	14
2	6	14
3	6	13
4	5	13
5	3	8
6	2	8
7	2	5
8	2	5
9	1	3
10	0	3
<i>Total</i>	36 UFP/100ml	86 UFP/100ml
Título	0.36 UFP/ml	0,86 UFP/ml

En este muestreo también se observa que los platos que contienen la muestra presentan una gran cantidad de burbujas (Figura 8). Cuando se repite la prueba después de 48 horas de incubación a 4 °C, también se observa una disminución en la cantidad de burbujas en los platos que contienen la muestra, sin embargo estas continúan presentes. Los controles de la prueba presentan poca cantidad de burbujas (Figura 9).



Figura 9. Excesiva producción de gas en los platos de las muestras, comparado con el de un control negativo. Izquierda: Plato de Petri del control negativo de la prueba. Derecha: Plato de Petri con muestra del Río Coris.

- *Tercer muestreo.*

Para este muestreo se analizaron las muestras por el método de capa simple de agar. El ensayo montado el día del muestreo obtuvo un título de 3,74 UFP/ml y posterior al almacenamiento a 4 °C durante 48 horas se obtuvo un título de 3,76 UFP/ml. En los platos de estas pruebas se presenta menor cantidad de burbujas que en los de los muestreos anteriores.

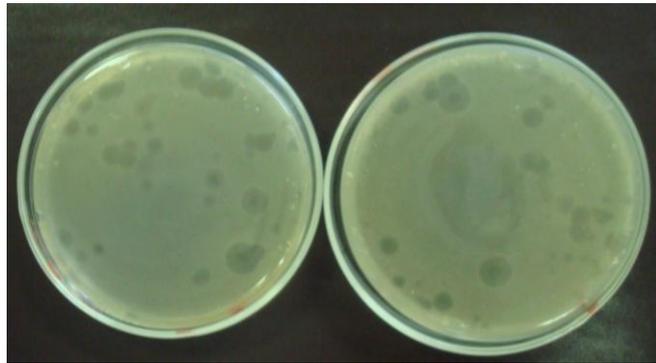


Figura 10. Observación de la morfología de las UFP obtenidas al ensayar la muestra de agua

6. DISCUSIÓN

Los métodos de capa simple y capa doble de agar descritos en SMEWW (APHA) y EPA han sido ampliamente utilizados con algunas variantes en diferentes laboratorios de investigación, obteniendo buenos resultados (Paz-y-Miño *et al.*, 2003; Muniesa y Jofre, 2004)

En esta investigación se ensayaron ambos métodos, para conocer su comportamiento y a la vez aplicar algunas modificaciones para optimizarlo a las condiciones de un laboratorio en Costa Rica.

Se observó que para la obtención de la bacteria hospedera en fase logarítmica, la regulación con los tiempos de incubación estipulados por la APHA en SMEWW no fue la más adecuada en las condiciones experimentales de éste trabajo ya que la densidad del cultivo bacteriano fue muy alta, lo cual puede generar resultados negativos, como los observados para el primer ensayo.

Cuando se analizan estos tiempos de incubación que plantea APHA para la obtención de un cultivo de *E.coli* en fase logarítmica, y se comparan con las curvas de crecimiento para esta bacteria (Ramírez, *et al.* 2005), parece que el cultivo obtenido no está en una fase de crecimiento exponencial al momento de la incubación con el colifago (ver curva de crecimiento en Anexo 4).

Para la preparación del cultivo bacteriano hay dos fases de incubación, en la primera fase se incuba la bacteria sin el fago durante 6 horas y en la segunda fase se incuba 4 horas con el colifago. Según lo anterior el inicio de la incubación colifago-*E.coli* se estaría dando prácticamente en una fase estacionaria de la curva de crecimiento. En esta fase puede haber un equilibrio entre la muerte y división de la bacteria o la bacteria puede simplemente dejar de dividirse (Prescott, *et al.* 2004).

Lo anterior puede tener implicaciones en la amplificación del virus, ya que este incorpora su ADN a la bacteria y depende de la replicación del material genético bacteriano para la generación de nuevas partículas virales (Días, 2006). El colifago puede infectar una bacteria que ha dejado de dividirse, lo cual podría llevar a que el fago no sea replicado. Si el cultivo bacteriano no alcanza la fase logarítmica se puede inferir que la cantidad final de colifago obtenida es baja, comparado con lo que se podría obtener si se realiza con un cultivo en fase logarítmica, donde las bacterias se están replicando activamente.

En la literatura se menciona también que el estar mucho tiempo en una fase estacionaria implica cambios significativos a nivel de la expresión génica y fisiológica de la bacteria. Por ejemplo las bacterias suelen incrementar los puentes cruzados del peptidoglicano y por consiguiente la fuerza intrínseca de la pared celular, lo cual podría afectar de alguna manera la capacidad de infección del virus a la célula (Prescott, *et al.* 2004).

Otro aspecto importante, es que al trabajar con un cultivo bacteriano denso, el tiempo de filtración se alarga y es posible que se den pérdidas de colifagos ya que muchos de ellos pueden quedar atrapados en la capa de bacterias y los restos de las mismas que se disponen sobre el filtro.

En uno de los ensayos se filtró un cultivo obteniendo una capa bacteriana sobre el filtro, posterior a esto se refiltró la muestra, es decir, se hizo pasar el filtrado nuevamente por los filtros tapizados de *E.coli*, lo cual generó una disminución de 2 logaritmos en la concentración de colifagos (Cuadro 3). Esta reducción puede ser consecuencia de una captura mecánica de los fagos entre las bacterias y restos de éstas.

El segundo cultivo bacteriano, destinado a la obtención de la *E.coli* hospedera aplicada en la enumeración o plaqueo de los colifagos, fue en un principio incubada igual que el primer cultivo, o sea 6 horas y 4 horas más (en este caso sin el fago), obteniendo de igual manera un cultivo bacteriano sumamente denso y que posiblemente

no se encuentra en una fase logarítmica. Al utilizar éste en los platos de Petri se obtiene una sobrecapa bacteriana muy confluida, lo cual puede dificultar la observación de las placas, ya que aunque el virus logre la lisis de las de *E. coli*, la densidad de la misma podría ocultar las UFP.

Además de obstruir la observación de las UFP, la densidad bacteriana afecta la replicación de los virus, ya que como lo señala la literatura, esta depende tanto de la densidad bacteriana como de la concentración de los fagos. Cuando la concentración bacteriana es alta se menciona en la literatura que es necesaria una mayor concentración viral para poder lograr y detectar su replicación (Muniesa y Jofre, 2004).

También se plantea que cuando la concentración viral es alta o muy baja la replicación del fago no es adecuada, sin embargo no se ofrece en la literatura una explicación apropiada para este fenómeno.

Otra de las explicaciones que podría justificar los resultados negativos en el primer ensayo es que la carga de virus contenida en los 0,2 ml del “stock” original (reserva ATCC) amplificado haya sido muy baja y no permitiera una replicación adecuada, o que simplemente no se lograra su detección con el método aplicado.

La aplicación del segundo método utilizando un estándar de McFarland 1% mejoró la lectura de la prueba. Se logró obtener un cultivo bacteriano menos concentrado, lo cual facilitó la filtración de los colifagos y además logró la producción de una sobrecapa bacteriana adecuada para la observación de las UFP. Por lo anterior, la utilización del estándar de McFarland 1% puede plantearse como una opción en el caso de que el laboratorio no cuente con un espectrofotómetro.

El ajuste de la concentración bacteriana mediante la determinación de la densidad óptica medida espectrofotométricamente, hace que la regulación de dicha densidad sea menos subjetiva, lo cual disminuye la incertidumbre atribuible a esta

variable en el ensayo, esto es beneficioso en casos donde los ensayos deban ser comparados.

La densidad óptica adecuada para las condiciones de trabajo se observa en los resultados detallados en el Cuadro 2, con la densidad óptica más baja (0,1), la capa bacteriana que se forma en el plato es menos uniforme, por lo cual las placas se observan más difusas. Esto tiene implicaciones importantes cuando se ensayan muestras con títulos virales altos, pues los conteos obtenidos son más bajos que en los casos donde se aplicó DO de 0,5, la razón de esto es que cuando hay mayor número de UFP éstas tienden a estar más unidas, por lo cual se requiere que la sobrecapa bacteriana delimite adecuadamente dónde termina una UFP e inicia la siguiente.

A un menor título viral, las UFP estaban más distribuidas en el plato, con más distancia entre una y otra, por lo cual la DO no afectó significativamente el conteo de las mismas.

Cuando se aplicó una DO de 0,5 se obtuvo UFP bien definidas, pero de menor tamaño a las que se habían observado en otros ensayos en los cuales se utilizó una DO intermedia entre el rango sugerido, cercana a 0,3. En los ensayos siguientes se utilizaron DO cercanas a este valor intermedio.

En los ensayos en los que se obtuvo “megaplacas”, éstas se contabilizaron como una sola UFP, conforme al criterio de la APHA, el cual menciona que cuando hay esparcidos en los platos y es imposible separar por ejemplo una colonia bacteriana de otra, debe ser contabilizado como una sola colonia, lo cual en este caso sería como una única UFP (Swanson , 2001).

Para disminuir la interferencia de las “megaplacas” y de resultados falsamente disminuidos, cada dilución se montó por quintuplicado, ya que no es común observar este fenómeno en todos los platos.

La literatura señala que un plato obtenido de una muestra positiva va a presentar zonas de lisis en la capa bacteriana (EPA, 2001), sin embargo cuando el título viral fue muy alto, no fueron visibles las UFP en el agar, ya que los virus lograron lisar toda la sobrecapa bacteriana.

Existen diferencias fenotípicas entre un plato positivo sin UFP evidentes y un plato negativo por colifagos y aunque este ha sido un aspecto obviado por la literatura, inicialmente estos resultados podrían confundirse porque en ninguno de ellos se observan UFP. Por ello es importante también procesar siempre el control positivo y negativo como parte de la prueba, ya que pueden haber otras variables que generen un resultado negativo aún en muestras positivas, por ejemplo una inadecuada homogenización de la mezclas.

Cuando en el plato no se observan UFP y la sobrecapa bacteriana ha desaparecido por completo, el resultado fue expresado como “todo lisado”. Para los resultados “todo lisado” e “incontables”, no se puede determinar el título viral, se requieren más diluciones para poder cuantificarlo. La diferencia entre “todo lisado” e “incontable” es de suma importancia, ya que placas “todo lisado” son totalmente transparentes, mientras que en “incontable” tiene restos de la sobrecapa bacteriana.

Las implicaciones de estos conceptos durante el análisis de una muestra resultan en títulos virales más altos para “todo lisado” que para “incontable”. Esto se comprobó cuando se ensayaron algunos amplificadores “todo lisado” y que al diluirlos se obtuvo un resultado “incontable”.

Con el fin de evaluar la reproducibilidad del método capa doble de agar se realizaron repeticiones de los ensayos, en los cuales se determinó que a 4 °C los colifagos se degradan de forma acelerada en el tiempo.

La temperatura 4 °C se utilizó para almacenar los colifagos inicialmente, ya que en realidad la literatura consultada no especifica cuál es la temperatura óptima para su almacenaje.

Un estudio realizado en el 2003, determinó que a mayor temperatura ocurre una mayor inactivación de los colifagos F+, ya que ésta influye en la tasa de reacciones que se producen dentro del microorganismo, afectando la eficacia y supervivencia, sin embargo en este estudio mencionado solo se evalúan temperaturas que van de 5 a 35 °C (Feng, *et al.* 2003).

En esta investigación se determinó que la temperatura ambiente es la que menos favorece la preservación de los colifagos, en esta condición, la concentración viral se redujo 3 logaritmos en un periodo de un mes, mientras que a 4 °C la pérdida de 3 logaritmos en el título viral tardó alrededor de 3 meses. Tras un mes de almacenamiento a -70 °C la pérdida viral fue despreciable, hubo un descenso de $2,26 \times 10^4$ a $2,14 \times 10^4$. Después de 7 meses de almacenamiento a -70 °C, la reducción en el título viral solo fue de dos logaritmos.

En todos los ensayos se requiere montar controles positivos, por lo cual una degradación acelerada de los mismos implica una inversión tanto económica como de tiempo para el laboratorio ya que colifagos requieren, en ese caso, ser amplificados con mayor frecuencia y es por esta razón que se pretende que los colifagos mantengan una concentración estable por el mayor tiempo posible. En este estudio se demostró que la temperatura de -70 °C es la óptima para el almacenaje de los virus, ya que en esta condición los fagos se degradan más lentamente.

Por otro lado, la aplicación de glicerol en el almacenamiento de los colifagos a -70 °C no proporciona un incremento significativo en la preservación de estos virus, posiblemente porque el glicerol protege las membranas celulares, al congelar hace que los cristales se formen en el medio extracelular, se produce una alta concentración de sal provocando la difusión del agua hacia el espacio extracelular y la entrada del

crioprotector hacia la célula, esto evita la deshidratación y muerte celular pero no sucede así en los colifagos ya que su cubierta es proteica y no una membrana semipermeable (Herrero, *et al.* 2004)

Cuando se analiza la aplicabilidad de la prueba a nivel de laboratorio, como parte de un perfil microbiológico en el análisis de aguas, deben tomarse en cuenta varios aspectos importantes, uno de ellos es el tiempo total necesario del ensayo.

Una vez que la muestra llega para el análisis al laboratorio, se requieren 24 horas para la obtención de los resultados, sin embargo debe señalarse que la fase analítica del ensayo es lo que más consume tiempo.

En un laboratorio donde se monte este ensayo de rutina es probable que mantengan siempre un cultivo de la *E.coli* en fase logarítmica, pero en términos generales según lo describe la metodología original de la APHA en SMEWW, la preparación de un cultivo bacteriano en esta fase, tarda de 2 a 3 días.

Considerando que en las condiciones experimentales utilizadas se requería un método rápido, que preferiblemente se pudiera aplicar el mismo día del muestreo, se realizó un ensayo para determinar cómo influye la edad del cultivo bacteriano en los resultados.

Los resultados muestran que sin importar la cantidad de días de incubación de la *E.coli*, se formó en el plato una sobrecapa bacteriana uniforme que permitió una lectura adecuada de las UFP. Para los títulos virales obtenidos con cultivos bacterianos de 1, 2, y 4 días (Cuadro 7) se obtuvo una $t = 0$ con una $p = 1,0$ con un nivel de confianza de 90 % y una $t = 0,2787$ con una $p = 0,7943$ con un nivel de confianza de 95 %, por lo cual se puede afirmar que para nuestras condiciones de laboratorio no existe una diferencia estadísticamente significativa al utilizar 1, 2 o 4 días de incubación para la bacteria hospedera *E.coli* 13706 ATCC.

Se debe señalar que la contaminación de los cultivos afecta la replicación tanto de la bacteria como del fago, esto se observó en el caso de 3 días de incubación de la *E.coli* (Cuadro 7), donde los resultados son negativos por colifagos, en este caso el erlenmeyer tuvo un contaminante ambiental; es probable que la *E.coli* no lograra crecer adecuadamente por la competencia que representaban las otras bacterias en el cultivo y además las bacterias contaminantes interfieren con la replicación de los colifagos cuando estos se incuban con la *E.coli* (Muniesa y Jofre, 2004).

Dado lo anterior, a la hora de plaquear para la enumeración de los colifagos lo que creció sobre el agar fue una capa de un combinado de bacterias por lo cual no se pudieron observar las UFP y el plato parecía tener un resultado negativo.

Es importante indicar que aunque no se hayan encontrado diferencias significativas en los títulos de colifagos obtenidos en los distintos tiempos de incubación de la *E.coli* aplicados en la prueba, la literatura recomienda que el cultivo con el que se trabaje provenga de otro que se haya incubado toda la noche (APHA, 2005; EPA, 2001; Paz-y-Miño *et al*, 2003; Ramírez *et al*. 2005).

Esta recomendación puede estar dirigida a obtener un mejor crecimiento de la bacteria, ya que cuando se transfiere un cultivo en fase de crecimiento exponencial a un medio nuevo de la misma composición la fase de latencia se acorta o no se produce, por lo que prácticamente durante toda la incubación se tendría un cultivo en fase logarítmica, mientras que la fase de latencia se alarga considerablemente si el inóculo proviene de un cultivo viejo o de uno que haya sido refrigerado, lo cual estaría representado en este ensayo por los días 4 y 1 respectivamente (Prescott, et al. 2004).

En cuanto a la reproducibilidad de las pruebas por el método capa doble de agar, puede decirse que es afectada por muchos factores como la densidad óptica, la temperatura de almacenamiento del fago, la condición fisiológica de la bacteria hospedera, la relación en la concentración colifagos- *E.coli*, etc, pero una vez que se tienen controladas estas variables los resultados son reproducibles.

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de 3 ensayos (de 5 repeticiones cada uno) en los cuales la mayoría de las variables ya se habían probado y optimizado, en este caso aplicando la prueba t-student se obtuvo $p = 0,4601$, $p = 0,6483$ y $p = 0,4615$, con un nivel de confianza de 90%, lo cual comprueba que no hay diferencias significativas estadísticamente en la recuperación de colifagos para las tres repeticiones, por lo que se puede afirmar que el método parece comportarse de una manera reproducible.

Con respecto a las muestras que se analizaron por el método de capa simple, los resultados obtenidos presentan en todas la repeticiones el mismo rango de magnitud (10^7 UFP/ml), que es el mismo que se encontró tiempo atrás cuando se analizó la muestra por el método capa doble de agar, determinando de esta manera una buena correlación entre los métodos (valores de $t = 2,490048$, $p = 0,0885$ con un nivel de confianza de 95%).

A pesar de que todos los resultados están en el orden de 10^7 UFP/ml, existen algunas variaciones, por ejemplo, en los ensayos se obtuvo un ámbito de concentración que va desde $1,58 \times 10^7$ hasta $3,80 \times 10^7$ UFP/ml. Este comportamiento es compatible al observado en otros estudios que se basan en los métodos de capa doble y capa simple de agar (Muniesa y Jofre, 2004).

Al aplicar los análisis estadísticos para los resultados obtenidos para capa simple de agar se obtiene que no hay diferencia significativa para los promedios de 4 repeticiones, con un valor de $p = 0,0696$ con un nivel de confianza de 95%.

Las variaciones que se obtienen en las repeticiones de los ensayos por ambos métodos no son estadísticamente significativas y posiblemente obedecen a que las muestras se inoculan con alícuotas de 1 ml que si bien es cierto contienen concentraciones similares de colifagos no necesariamente son idénticas. Además en el método capa doble de agar deben considerarse posibles pérdidas de colifagos al aplicar diluciones.

En cuanto a los muestreos de agua de río, se debe aclarar que en el caso de Cascajal, las muestras se tomaron cerca de la naciente del río, en una época muy lluviosa y en un sitio con poca influencia de actividad humana y animal, por lo cual la concentración de colifagos somáticos se esperaba baja.

Aunado a lo anterior, el volumen total de agua que se analizó por cada muestreo en el río Cascajal fue de 10 ml, ya que solo se utilizó el método de capa doble, en el cual se hacen 10 repeticiones por muestra, a diferencia de un método de capa simple en el cual se analizan 100 ml de agua.

Los resultados de las muestras de agua del río Coris fueron todas positivas por colifagos. Se debe tomar en cuenta que en el trayecto de este río y cercano a la zona de muestreo se encuentran chancheras, presencia de ganado y asentamientos humanos e industrias que liberan parte de sus desechos al río.

La presencia de colifagos en las aguas de río analizadas implica presencia de materia fecal y por lo tanto la posible presencia de virus entéricos en el agua.

Los rangos de UFP obtenidos para muestras de río evaluadas en algunos estudios son variables ya que dependen de las modificaciones del método aplicado, así como del grado de contaminación de la fuente de agua. En un estudio realizado en Perú se obtuvo valores de 17-700 UFP/100ml para agua de río sin tratar, llegando a <1 UFP/ 100 litros de agua una vez finalizado el proceso de purificación de de la misma (Payment y Franco, 1993). En otro estudio se encontraron recuentos iniciales más altos, 1010-3800 UFP/ 100 ml, llegando a recuentos de 0-2 UFP/100 ml después del tratamiento del agua (Paz-y-Miño, *et al.* 2003).

A pesar de que no se ha establecido un valor límite para colifagos en aguas crudas, según las guías para la calidad para del agua de bebida, de la Organización Mundial de la Salud, se han encontrado concentraciones de colifagos somáticos de 10^{10} /L en aguas de desecho y de 10^5 /L en aguas de ríos y lagos (OMS, 2008), lo cual

concuerta con los resultados obtenidos en este ensayo, donde se encuentran concentraciones de 10^4 y 10^5 /L.

En cuanto a los resultados presentados en los Cuadros 12, 13 y los resultados del tercer muestreo en río Coris, se observa que las UFP aumentan cuando se repite la prueba 48 horas después de filtrada la muestra. A pesar de ello se descartó que los virus pudieran estarse replicando en estas muestras almacenadas, ya que la bacteria hospedera ha sido eliminada por el proceso de filtración.

Los colifagos prácticamente no se replican fuera del intestino de los animales, en el ambiente no siempre encuentran disponibles sus bacterias hospederas y las condiciones necesarias para su replicación, por lo cual su cantidad se ve poco alterada en el transporte de la muestra y tiempo del ensayo (Muniesa y Jofre, 2003).

Sin embargo el ensayo de colifagos consume tiempo por lo cual podría ser necesario realizar el ensayo en un día distinto al del muestreo, principalmente debido a que la determinación de colifagos se pretende implementar como parte de un análisis más amplio en el perfil microbiológico del agua, por lo cual además de su ensayo se debe determinar la presencia de ciertos indicadores bacterianos, por ejemplo coliformes fecales, los cuales deben realizarse de manera más inmediata ya que estas podrían multiplicarse en condiciones ambientales, o podrían perder con el tiempo su capacidad de replicarse en los cultivos, afectando su cuantificación.

Debido a lo anterior y a que una de las inquietudes del proyecto fue determinar cuánto tiempo se mantienen viables los fagos en una muestra de agua almacenada sin que sus títulos comiencen a decaer, se planteó ensayar la muestra de agua el día de su colecta y posterior a 48 horas de almacenamiento a 4 °C.

A pesar de los objetivos de la prueba, no fue factible la comparación de los resultados obtenidos para el día del muestreo y tras 48 horas de almacenamiento, ya que los platos de Pertri obtenidos del primer día presentan muchas burbujas en el agar lo

cual interfiere con la lectura de las UFP, inclusive llegando a imposibilitar su lectura en ciertas zonas de los platos. Posterior al almacenamiento disminuye la cantidad de burbujas de manera que interfieren menos en el conteo de las UFP lo cual genera una recuperación más eficiente que podría simular un falso aumento en el título de colifagos.

Se plantea como hipótesis que alguna sustancia química contenida en las muestras de agua exagera la producción de gas por parte de la *E. coli*, ya que esta sustancia podría modificar el pH del medio, funcionar como sustrato o inhibir la utilización de algún sustrato por parte de la bacteria. Es probable que con el tiempo el interferente se degrade por lo cual el día 3 la cantidad de burbujas fue menor.

Estas observaciones se apoyan también en datos de la literatura, donde se ha descrito que para algunas cepas de *Escherichia coli* un aumento en el pH del medio de cultivo aumenta la producción de gas (Meadows, *et al.* 1980), y que en términos generales la producción de gas por parte de las bacterias se ve influida por los sustratos en los cuales se desarrolle el microorganismo (Dávila y Razo, 2007).

Aunque en este trabajo no se contó con un estudio químico paralelo a los ensayos de colifagos, el hecho de que los controles no presentaran esta cantidad de burbujas y que no se observara el mismo fenómeno en las muestras de Cascajal, también parece apoyar la hipótesis de que la causa de la interferencia se relaciona con algún componente de la matriz analizada.

Los resultados del segundo muestreo presentaron los conteos más bajos de colifagos, lo cual pudo deberse en parte a que estos se realizaron tras un largo temporal, con lluvias abundantes, que disminuyeron la presencia de vegetación y animales en los márgenes del río.

Por otro lado en el segundo muestreo el agua presentaba más cantidad de material suspendido lo cual dificultó la filtración y hay más posibilidad de que algunos

colifagos se quedaran adheridos a la superficie de esos materiales, ya que como señala la literatura los colifagos suelen adherirse a superficies con cargas específicas (Reynolds, 2001).

El aumento en el caudal del río pudo haber favorecido que los colifagos se diluyeran en la muestra de agua o que fueran arrastrados y disminuyera su cantidad.

En cuanto a las UFP presentes en las muestras, se observaron pequeñas diferencias en sus zonas de lisis, variaciones de un muestreo a otro e incluso en una misma placa, diferentes morfologías (Anexo 4). Esto se debe a que los colifagos son un grupo diverso de virus que pueden pertenecer a las familias de fagos Myoviridae, Siphoviridae, Podoviridae and Microviridae y que presentan un espectro amplio de tipos morfológicos (OMS, 2008).

En algunos casos donde se observó UFP que contienen en su zona central una discreta cantidad de colonias bacterianas (Figura 8 y Anexo 4) los métodos de referencia indican que se debe a mutantes bacterianas que no pueden ser infectadas por el virus (EPA, 2001).

Comparando los métodos capa doble de agar y capa simple de agar se puede concluir que capa simple de agar es una técnica más rápida y ofrece menor interferencia por errores de pipeteo, en cambio en capa doble para cada plato hay que mezclar la *E.coli*, el colifago y el agar individualmente cinco veces por cada dilución, agitando tras la adición de cada uno de los componentes y antes de procesar las muestras se debe contar con platos con una capa basal de ATS 1,5%, lo cual lo vuelve un método más lento.

El método capa simple de agar más económico ya que requiere preparar solo 100 ml de agar 1,2 % de doble concentración, mientras que en el método de capa doble de agar se requiere la preparación de un plato con agar 1,5% en el fondo y además preparar 100 ml de ATS 0,7% el cual se distribuye en tubos de ensayo.

En el análisis de muestras de agua ambos métodos consumen la misma cantidad de platos de Petri, sin embargo cuando se ensayan diluciones virales se consume una cantidad mayor de placas en el método capa doble de agar.

En el método de capa doble de agar se tienden a formar megaplacas, principalmente cuando el título de colifagos es alto, a diferencia del método de capa simple de agar en el cual a pesar de tener un título alto de colifagos, generalmente se puede observar la separación entre una UFP y otra, lo cual hace su resultado en la mayoría de los casos cuantificable.

En cuanto a los volúmenes de muestra que se pueden analizar por ambos métodos, capa doble de agar tiene la desventaja de que se analiza 10 ml de las muestras de agua, por lo cual es menos sensible que capa simple de agar, en el cual se pueden analizar 100 ml.

A pesar de que la literatura describe en que el método de capa simple es más sensible al poder analizar mayor cantidad de muestra, en los resultados de los ensayos no se obtuvo recuentos más altos al utilizar el método de capa simple de agar, incluso en la mayoría de los casos se obtuvo resultados ligeramente más altos por el método de capa doble.

Estas pequeñas diferencias se pueden ejemplificar con el resultado de uno de los ensayos donde por capa doble de agar se recupera $3,84 \times 10^7$ UFP/ml, mientras que para la misma muestra por el método capa simple de agar se recuperó $1,71 \times 10^7$ UFP/ml, $1,58 \times 10^7$ UFP/ml, $2,41 \times 10^7$ UFP/ml, $3,80 \times 10^7$ UFP/ml en diferentes repeticiones de la prueba, sin embargo como se mencionó anteriormente estos resultados no presentan diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de las muestras del río Coris también se observó pequeñas diferencias en los resultados obtenidos por ambos métodos, lo cual está reflejado en los resultados de los Cuadros 11 y 12, en donde se obtiene en uno de los ensayos 1,6 UFP/ml por capa

doble, 1,53 UFP/ml por capa simple y 4,6 UFP/ml por capa doble, 2,90 UFP/ml por capa simple.

Conforme a lo anterior, se observan que según el método que se aplique, existen diferencias en la recuperación de UFP pero esa recuperación mantiene una variación normal para estos métodos aplicados.

En cuanto al método combinado capa doble de agar-capas simple de agar, se pretendía determinar inicialmente el título de la muestra por medio de capa doble de agar y ajustar adecuadamente la dilución de la muestra que se analizaría por capa simple de agar, con ello se obtendría las ventajas de ambos métodos, en capa doble conocer el título y con capa simple tener la oportunidad obtener una mayor sensibilidad ya que se analiza más cantidad de muestra.

A pesar del objetivo del ensayo, los resultados obtenidos al combinar capa simple y capa doble de agar (Cuadro 10) difieren inclusive en el orden de magnitud ya que por capa doble se encuentran en el orden de 10^2 UFP/ml mientras que por capa simple se encuentran en el orden de 10^1 UFP/ml.

Cuando se analiza el título de un concentrado viral por los métodos capa doble y capa simple realizados de manera independiente, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los resultados. Cuando se aplica el método combinado capa doble-capas simple de agar se obtienen resultados que difieren incluso en el rango de magnitud entre un método y otro, sin embargo debido a que este método se ensayó poco, para obtener una conclusión sobre su comportamiento se requieren más repeticiones.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La obtención del cultivo bacteriano basado en los tiempos de incubación estipulados por la APHA en SMEWW, no resultaron adecuados para las condiciones de laboratorio donde se llevó a cabo el estudio, sin embargo utilizando la variante del estándar de McFarland 1% para regular la concentración, se obtuvo un cultivo que permitió la lectura adecuada de la prueba, por lo cual su aplicación puede plantearse como una opción para aquellos laboratorios que no cuenten con un espectrofotómetro.
- Para el método capa doble de agar es indispensable regular adecuadamente la concentración de los dos cultivos bacterianos, el utilizado para la incubación en la amplificación del fago y el aplicado en el plaqueo y enumeración de los fagos en las placas de Petri.
- La aplicabilidad de rango de densidad óptica planteado en la literatura (DO 0.1-0.5) depende de la concentración viral de la muestra por lo cual se recomienda utilizar un rango de DO intermedio ya que éste resultó útil para el análisis de concentraciones virales tanto altas como bajas.
- Cuando se analiza por el método capa doble de agar una muestra con un título viral muy elevado, pueden obtenerse platos positivos en los que no se observan unidades formadoras de placas (UFP), éstos se distinguen de un plato negativo porque su superficie es brillante y además son translúcidos.
- En la prueba a diferentes temperaturas se determinó que a mayor temperatura más rápida es la degradación de los colifagos, además se estableció que la temperatura óptima para el almacenamiento de los mismos es $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura en la cual se obtuvo un descenso de solo 2 logaritmos en el título viral, tras un almacenamiento de 7 meses. La adición de glicerol en el almacenamiento a esta temperatura no

influyó en la preservación de los colifagos, por lo cual su adición no resulta necesaria.

- No hubo una diferencia estadísticamente significativa al utilizar para el ensayo un cultivo bacteriano de 1,2 ó 4 días de incubación, según las condiciones en las que se realizó la prueba.
- La contaminación de los medios de cultivo bacterianos con contaminantes ambientales, afecta la replicación de los colifagos así como su lectura.
- La reproducibilidad de los métodos capa doble de agar y capa simple de agar es afectada por muchos factores como la densidad óptica, la temperatura de almacenamiento, la condición fisiológica de la bacteria hospedera, la relación en la concentración *E.coli*- colifagos, etc, pero cuando se tienen estas variables controladas, puede afirmarse según las pruebas estadísticas, ambos métodos son reproducibles.
- Comparando los métodos capa doble de agar y capa simple de agar se puede mencionar que capa simple de agar es una técnica más rápida y ofrece menor interferencia por errores de pipeteo que capa doble de agar.
- La implementación del método capa simple de agar es más económico que capa doble de agar y permite analizar más volumen de muestra, sin embargo en los ensayos no se demostró que fuera más sensible que capa doble de agar.
- Según los ensayos aplicados, por el método capa doble de agar se obtienen conteos de UFP más altos en números absolutos que los obtenidos por capa simple, sin embargo al comparar la recuperación de UFP por ambos métodos se puede afirmar que no existe una diferencia estadísticamente significativa.

- Cuando se aplica el método combinado capa doble-capas simple de agar se obtienen resultados que parecen ser muy distintos, pero que por el número de ensayos no se puede comprobar estadísticamente, por lo cual es imposible obtener una conclusión sobre la funcionalidad de este método combinado y se recomienda realizar más repeticiones.
- En cuanto al análisis de muestras de río, ambos métodos son funcionales y obtienen resultados comparables. En términos generales, el título viral obtenido en una muestra ensayada depende del método que se aplique para su análisis, así como el grado de contaminación de la fuente de agua. Las concentraciones virales obtenidas en las muestras del río Coris (10^4 y 10^5) son según la OMS, las habitualmente encontradas en muestras de río.

8. REFERENCIAS

1. APHA. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, 21th Edition. Washington. 2005
2. Armon, R; Kott, Y. 1996. *Bacteriophages as indicators of pollution*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26:299
3. Bofill-Mas, S; Clemente, P; Albiñana, N; Maluquer de Motes Porta, S; Hundesa, A; Girones, R. 2005. *Efectos sobre la salud de la contaminación de agua y alimentos por virus emergentes humanos*. *Revista Española de Salud Publica*, 79 (2)
4. Borrego, J; Moriño, M; Vicente, A; Cónax, R; Romero, P. 1987. *Coliphages an indicador of fecal pollution in water. It relationship with indicator an pathogenic microorganism*. *Water research*, 21: 1473-1480.
5. Borrego, J; Moriño, M; Martinez, A; Romero, P. 1990. *Coliphages as indicador of fecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments*. *Water research*, 24: 111-116.
6. Bosh, A. 1998. *Human enteric viruses in the water environment: a minireview*. *International microbiology*, 1: 191-196
7. Campos, C. 2003. *Indicadores de contaminación fecal en aguas*. En: *agua potable para comunidades rurales, rehúso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas*. Cap 20 pp 224-229, disponible en http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo_20.pdf
8. Cole, D; Long, S; Sobsey, M. 2003. *Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (11): 6507-6514
9. Dávila, G; Razo, E. 2007. *Producción biológica de hidrógeno por vía fermentativa: Fundamentos y perspectivas*. *BioTecnología*, 11(3): 19-27

10. Días, J. Trabajo de grado en microbiología ambiental: *Susceptibilidad de los hospederos bacterianos a la infección de colifagos, provenientes de aguas residuales*. Para optar por el grado de licenciatura dado por la Pontificia Universidad Javerina (México), 2006.
11. EPA. *Method 1602: Male-specific (F+) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) procedure*. Environmental Protection Agency's . Washington. 2001.
12. Feng, Y; Ong, S; Hu, J. 2003. *Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Qb*. Industrial Microbiology and Biotechnology, 30:549-552
13. Gangarosa, R; Glass, R; Lew, J; Boeing, J. 1985. *Hospitalizations involving gastroenteritis in the United States: the special burden of the disease among the elderly*. American Journal of Epidemiology, 135: 281-90.
14. Herrero, L; Ávila, R; Corrales, E; Hun, L. *Procedimientos en virología médica*. 1^{ra} edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, 2004. Pp: 48-49
15. Instituto Costarricense de Acueductos y alcantarillados (AyA). *Análisis sectorial agua potable y saneamiento de Costa Rica*. Costa Rica. 2002.
16. Leclerc, H; Edberg, S; Pierzo, V; Delattre, J. 2000. *Bacteriophages as indicator of enteric viruses and public health risk in groundwater*. Journal of Applied Microbiology, 85: 5-2
17. Meadows, P; Anderson, J; Patel, K; Mullins, W. 1980. *Variability in gas production by Escherichia coli in enrichment media and its relationship to pH*. Applied and environmental microbiology, 40(2): 309-312.
18. Ministerio de Salud, Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. *Calidad del agua potable en Costa Rica: situación actual y perspectivas*. Costa Rica. 2004. Disponible en www.netsalud.sa.cr.
19. Ministerio de Salud. *Compendio de 7 reglamentos*. La Gaceta: diario oficial (San José, CR) 2005.

20. Muniesa, M y Jofre, J. 2004. *Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 65–76.
21. Organización Mundial de la Salud. 2009. *Water, Sanitation and Health*. Disponible en: www.who.int/water_sanitation_health/hygiene/en/index.html.
22. Organización Mundial de la Salud. 2008. *Guidelines for drinking-water quality*. Tercera edición. Volumen 1.
23. Payment, P y Franco, E. 1993. *Clostridium perfringens and somatic coliphages as indicator of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cyst*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2418-2424
24. Paz-y-Miño, M; Barzola, C; Lazcano, C; Ponce, M; León, J. 2003. *Colifagos como indicadores de contaminación fecal y de remoción bacteriana en la potabilización del agua*. *Revista Peruana de Biología*, 10 (2): 133-144
25. Prescott, J; Harley, P; Klein, D. *Microbiología*. Quinta edición, McGRAW-HILL. España, 2004
26. Ramírez, J; Contreras, G; Gómez, C. 2005. *La fase estacionaria en la bacteria Escherichia coli*. *Revista latinoamericana de microbiología*, 47(3): 92 – 101
27. Reynolds, K. 2001. *Introducción a las enfermedades microbianas propagadas a través del agua*. *Revista agua Latinoamérica*, 1: 38-39.
28. Richman, D; Whitley, R; Hayden, F. *Clinical virology*. 2nd edition. ASM Press. Washington DC, 2002. Pp 971-988
29. Skrabber, S; Grassilloud, B; Gantzer, C. 2004. *Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6): 3644-3649.

30. Swanson, K; Petran, R; Hanlin, J. 2001. *Culture Methods for enumeration of microorganisms*. p57. En Pouch, F y Ito, K (eds). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, APHA. Cuarta edición.
31. Valiente, C; Mora, D. 2001. *El papel del agua para consumo humano en los brotes de diarrea reportados en Costa Rica en el periodo 1999-2001*. Laboratorio Nacional de Aguas. Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados.
32. Vidales, C; Gonzáles, J; Rodríguez, F. 2004. *Cinética de PRDI en un pantano construido de flujo superficial*. Ciencia UANL, 7 (1):
33. Wentsel, R; O Neill, P; Kitchens, J. 1982. *Evaluation of coliphage detection as rapid indicator of water quality*. Applied and Environmental Microbiology, 43: 430-438
34. Wescott, D y Ayres, R. 1990. *Criterio de calidad de aguas de riego con agua residual municipal regenerada*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona. p33 -66.

Anexos

Anexo 1:

Preparación de medios de cultivo y reactivos:

- *Extracto de carne 1,5%:* este extracto se pasó a través de los filtros antes de filtrar las muestras o los cultivos con colifagos, con el fin de disminuir la adsorción del fago en el filtro. Preparación: disolver 1,5 g de extracto de carne y 0,375 g de glicina (glicina con una concentración final de 0,05 M) en 90 ml de agua. Ajustar el pH 7.0 – 7.5, llevar a un volumen final de 100 mL con agua grado reactivo. Autoclavar a 121°C por 15 minutos y almacenar a 4 °C.
- *Solución de glicerol al 50%:* se utilizó para la congelación de las cepas bacterianas. Preparación: agregue cantidades iguales de glicerol no diluido y agua grado reactivo. Autoclavar a 121°C por 15 minutos y almacenar a 4 °C.
- *Caldo tripticasa soya (CTS):* se utilizó como medio de crecimiento para las bacterias *E.coli* hospederas, para reconstituir liofilizados y para realizar diluciones. Preparación: seguir el procedimiento indicado en el frasco. Si no se cuenta con el medio deshidratado, prepararlo agregando 17.0g de triptona, 3.0 g de soytona, 2.5 g de dextrosa, 5.0 g de cloruro de sodio, 2.5 g de difosfato de potasio en un litro de agua grado reactivo y calentar para disolver Ajustar el pH a 7,3. Autoclavar a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos. Verificar el pH después de autoclavado, removiendo asépticamente una alícuota del medio. Ajuste el pH si es necesario y descarte la alícuota una vez que haya chequeado el pH, para garantizar que el medio no esté contaminado. Se puede almacenar hasta por 3 meses a 4 °C. este medio también puede ser preparado igual al slant de agar triptona pero excluyendo el agar.
- *Agar tripticasa soya 1,5%:* este agar se utilizó como capa inferior (de soporte) en los platos, para el método de doble capa de agar. Preparación: Mezclar 1,0 g de triptona, 0,1 g de extracto de levadura, 0,1 g de glucosa, 0,8 g de NaCl, 0,022

g de CaCl_2 y 1,5 g de agar en 100 mL de agua grado reactivo, todo mezclado gentilmente en un recipiente de 250 ml. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Se enfría a $48^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$. Se dispensa 17-18 mL de ATS por plato, y se almacenan a 4°C .

- *Agar tripticasa soya 0.7%*: Se utilizó como capa superior en el método de doble capa de agar. Preparación: se utiliza el mismo procedimiento que para el CTS pero se le agregan 7 g de agar/ litro de medio CTS, se calienta para disolver, se autoclava a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. Enfriar a $48^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ y mezclar. Se dispensan 5 mL por tubo de 10cc y se mantiene a $45-48^\circ\text{C}$ hasta su uso.
- *Tubos para dilución con triptona*: Se utilizó para realizar las diluciones de los colifagos en la estandarización del método y para la dilución de las muestras. Dispensar asépticamente 9 mL de caldo triptona estéril (CTS) en cada uno de los tubos de ensayo estériles de 16 x 150 mm con tapa.
- *Agar tripticasa soya de doble concentración (ATS 1,2% de doble concentración)*: se prepara igual que el agar tripticasa soya 1,5%, utilizando el doble de cantidad de cada uno de los componentes, a excepción del agar en el del cual se agrega 1.2 g por 100 ml.
- *Stock de cloruro de magnesio (80X, 4M)*: a 814 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, agregue 300ml de agua grado reactivo, mezcle para disolver. Lleve a un volumen final de 1 L, mezle. Autoclave por 15 minutos a 15psi.
- *Solución de cloruro de calcio (CaCl_2)*: adicione 22g de CaCl_2 a 50 ml de agua, esterilice y autoclave a 121°C por 15 minutos. Almacene a temperatura ambiente.

Anexo 2

Cuadro de virus entéricos humanos que pueden ser transmitidos por el agua

Genus	Popular name	Disease caused
<i>Enterovirus</i>	Poliovirus	Paralysis, meningitis, fever
	Coxsackievirus, A, B	Herpangina, meningitis, fever, respiratory disease, hand-foot-and-mouth disease, myocarditis, heart anomalies, rash, pleurodynia, diabetes?
	Echovirus	Meningitis, fever, respiratory disease, rash, gastroenteritis
<i>Hepatovirus</i>	Hepatitis A	Hepatitis
<i>Reovirus</i>	Human reovirus	Unknown
<i>Rotavirus</i>	Human rotavirus	Gastroenteritis
<i>Mastadenovirus</i>	Human adenovirus	Gastroenteritis, respiratory disease, conjunctivitis
<i>Calicivirus</i>	Human calicivirus	Gastroenteritis
	Norwalk virus	Gastroenteritis, fever
	SRSV	Gastroenteritis
	Hepatitis E	Hepatitis
<i>Astrovirus</i>	Human astrovirus	Gastroenteritis
<i>Parvovirus</i>	Human parvovirus	Gastroenteritis
<i>Coronavirus</i>	Human coronavirus	Gastroenteritis, respiratory disease
<i>Torovirus</i>	Human torovirus	Gastroenteritis

Fuente: Bosh, 1998.

Anexo 3

Glosario

-*Amplificados del stock de colifagos Φ 174 ATCC*: es el filtrado que se obtiene al amplificar el stock original de colifagos Φ 174 ATCC, con la bacteria durante 4 horas, y que se almacena a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 1,1 ml.

-*Colifagos*: son virus de bacterias que infectan y se replican en *Escherichia coli*. (Armon, 1996)

-*Colifagos somáticos*: son virus de ADN que infectan la bacteria hospedera (*E.coli*) atravesando su membrana celular (EPA,2001).

-*Colifagos macho específicos (F^+)*: son virus que pueden ser tanto ADN o ARN e infectan a las cepas de *E.coli* macho, por medio del pilus-F (EPA,2001).

-*Concentrado de colifagos*: es el filtrado que se obtiene al amplificar un stock de amplificado de colifagos.

- *Densidad óptica*: es la absorción de luz por unidad de distancia, o también conocida como absorbancia. Va a reflejar la cantidad de bacteria presente en el medio. Entre más bacteria esté presente en el medio, se va a producir una mayor absorción de la luz ya que estas bacterias obstruyen el paso de la misma.

- *Sobrecapa bacteriana*: son las colonias que crecen de manera uniforme una al lado de la otra en la superficie del agar, cuando se aplica el método capa doble de agar

-*Stock de control positivo de colifagos*: son las alícuotas de colifagos almacenados que contienen entre 30-80 UFP/ml. Se obtuvieron de un filtrado de amplificado o concentrado de colifagos o de una dilución de los mismos.

- *Todo lisado*: hace referencia a un resultado en el cual no se observan restos de la sobrecapa bacteriana en el agar, ya que el virus la ha desintegrado completamente.

- *Enterovirus*: son virus que se replican en el tracto gastrointestinal del ser humano.

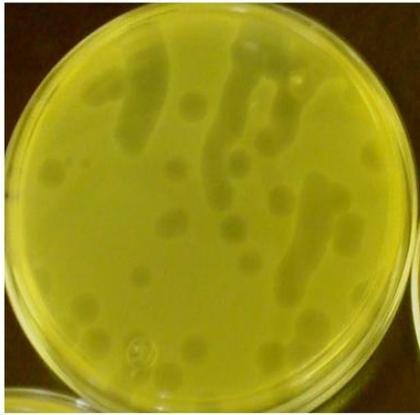
- *Plaqueo*: se refiere al proceso en el

- *Título*: se refiere a la concentración, en este caso de colifagos, presente en la muestra que se analiza, expresada en unidades formadoras de placas por mililitro.

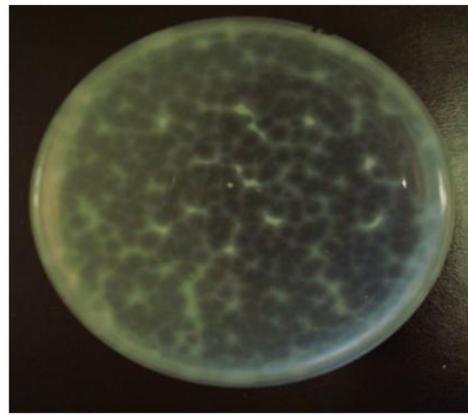
- *Unidad formadora de placas (UFP)*: es la expresión de la presencia de los colifagos en la muestra y son las zonas circulares que se observan en los platos, debido a la lisis que genera el colifago en las bacterias hospederas.

- *Incontables*: se refiere a un resultado en el cual la sobrecapa bacteriana no ha desaparecido en un 100%, pero que el grado de degradación de la misma no permite contar las UFP ya que simplemente se observan restos de la sobrecapa.

Anexo 4



Observación de megaplaques



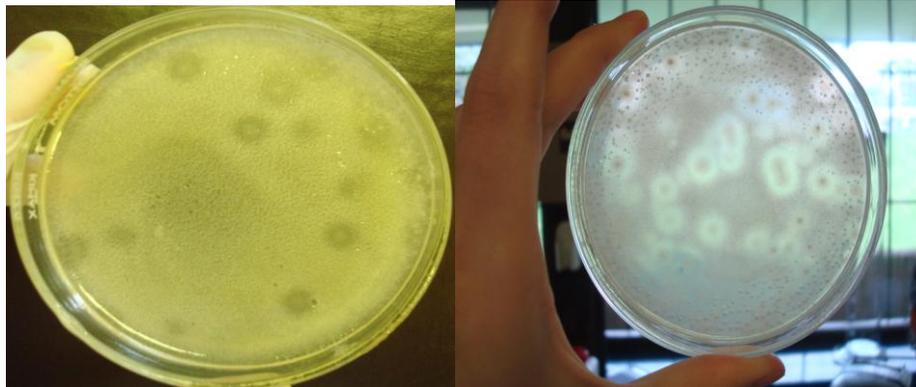
Concentrado de colifagos con alta carga viral
| analizado por el método capa simple de agar



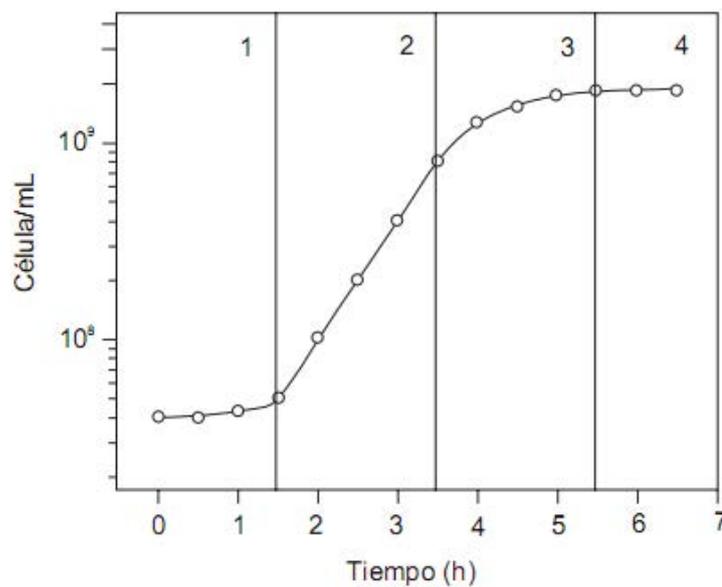
Platos de Petri en los cuales se observa la sobrecapa bacteriana y las UFP, por el método capa doble de agar



Izquierda: Plato de Petri con un resultado definido como todo lisado. Centro: Plato de Petri con un resultado definido como incontable. Derecha: Plato de Petri con un resultado negativo



Observación de la morfología de las UFP obtenidas al ensayar la muestra de agua.



Curva de crecimiento en medio rico de la bacteria *Escherichia coli*. La curva de crecimiento se inicia al diluir el cultivo de una noche en medio nuevo. 1) fase lag; 2) Fase logarítmica o exponencial; 3) Fase de transición; 4) Fase estacionaria. En estos cultivos la fase exponencial representa el periodo de crecimiento rápido o balanceado y la fase estacionaria de crecimiento nulo.

Fuente: Ramírez, 2005.

Anexo 5

Procedimiento para la obtención de cuatro cultivos de *E. coli* con diferentes tiempos de incubación

<i>Cultivo de E. coli</i>	<i>Día 1 (lunes)</i>	<i>Día 2 (martes)</i>	<i>Día 3 (miércoles)</i>	<i>Día 4 (jueves)</i>
Cultivo de 1 día	-	-	-	Se inoculó 3 asadas del congelado de <i>E.coli</i> , en CTS, se incubó 4 horas a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se ajustó DO cercana a 0,3
Cutivo de 2 días	-	-	Se inoculó una asada del congelado de <i>E.coli</i> en 5 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche	Se transfirieron 1,5 ml a un erlenmeyer con 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas en agitación y se ajustó la DO.
Cultivo de 3 días	-	Se inoculó una asada del congelado de <i>E.coli</i> en 5 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche	Se transfirieron 1,5 ml a un erlenmeyer con 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas. El cultivo se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.	Se transfirieron 1,5 ml a un erlenmeyer con 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas en agitación y se ajustó la DO.
Cultivo de 4 días	Se inoculó una asada del congelado de <i>E.coli</i> en 5 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche	Se transfirieron 1,5 ml a un erlenmeyer con 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas. El cultivo se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.	Se transfirieron 1,5 ml a un erlenmeyer con 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas. El cultivo se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.	Se transfirieron 1,5 ml a un erlenmeyer con 30 ml de CTS, se incubó a $36,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas en agitación y se ajustó la DO.

**Cuantificación de UFP y determinación de los títulos virales de
un concentrado de colifagos almacenado a diferentes temperaturas durante un mes**

Temperatura	Dilución del concentrado de colifagos	#UFP					Título
<i>Temperatura ambiente</i>	0	70	67	63	55	50	61 UFP/ml
	10 ⁻¹	11	10	5	4	4	
	10 ⁻²	2	1	0	0	0	
	10 ⁻³	1	0	0	0	0	
<i>4 °C</i>	0	Todo lisado en los 5 platos					2,76 x 10 ³ UFP/ml
	10 ⁻¹	Incontables en los 5 platos					
	10 ⁻²	32	30	27	25	24	
	10 ⁻³	7	5	4	3	2	
<i>-70 °C sin glicerol</i>	0	Todo lisado en los 5 platos					2,14 x 10 ⁴ UFP/ml
	10 ⁻¹	Incontables en los 5 platos					
	10 ⁻²	179	140	147	160	152	
	10 ⁻³	25	21	21	21	19	
<i>-70 °C con glicerol</i>	0	Todo lisado en los 5 platos					2,12 x 10 ⁴ UFP/ml
	10 ⁻¹	Incontables en los 5 platos					
	10 ⁻²	129	128	126	123	115	
	10 ⁻³	25	24	23	20	14	

Número de UFP y determinación del título de un amplificado de colifagos Φ 174 ATCC, por el método de capa simple de agar, utilizando para la determinación una dilución final de 10^{-7} y de 10^{-8}

Plato	Dilución 10^{-7} #UFC	Dilución 10^{-8} #UFP
1	1	5
2	2	3
3	3	2
4	4	3
5	5	5
6	6	12
7	7	3
8	8	5
Total	241 UFP/ 100ml	38 UFP/100ml
<i>Título del concentrado de colifagos</i>	$2,41 \times 10^7$ UFP/ml	$3,80 \times 10^7$ UFP/ml