



ADAPTRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para
a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia

Procedimiento de trabajo

Aislamiento y recuento de colifagos
somáticos en aguas residuales y
depuradas (basado en ISO 10705-2)

Objectivo 2 - Actividade 2.2

Autor: Néstor Abreu

Revisado por: Gilberto Martel y Vanessa Millán

Parceiro: ITC

Fecha: octubre de 2020

Versión: 1





INDICE

1. OBJETO	2
2. ALCANCE	2
3. REFERENCIAS	2
4. DEFINICIONES	2
5. FUNDAMENTO	3
6. REACTIVOS, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	3
6.1. Reactivos	3
6.2. Soluciones	4
6.3. Medios de cultivo	5
7. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL FUNGIBLE	7
8. PROCEDIMIENTO	8
8.1. Toma de muestra	8
8.2. Toma de muestra	8
8.2.1. Cultivo y mantenimiento de la cepa bacteriana hospedadora	9
8.2.1.1. Preparación de los cultivos stock	9
8.2.1.2. Preparación de los cultivos de trabajo	9
8.2.2. Calibración de medidas de absorbancia para recuentos de microorganismos viables	10
8.2.3. Cultivo y mantenimiento del bacteriófago ϕ X174	11
8.3 Técnica analítica	11
8.3.1 Preparación de inóculos	11
8.3.2. <i>Preparación de la muestra</i>	12
8.3.3. <i>Procedimiento estándar</i>	12
9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS	13
10. OBSERVACIONES	14



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



1. OBJETO

El objetivo de este procedimiento es establecer un plan de trabajo para el aislamiento y recuento de colifagos somáticos en aguas depuradas cuando el ensayo se realiza según el siguiente método.

2. ALCANCE

Este procedimiento se establece para el aislamiento y recuento de colifagos somáticos en aguas depuradas según la técnica de la doble capa, mediante la incubación de la muestra con una cepa bacteriana adecuada.

3. REFERENCIAS

- ISO 31-0: 1992 (third edition). Quantities and units - part 0: General principles.
- ISO 3696: 1987. Water for analytical laboratory use – Specification and test methods.
- ISO 5667-1: 1980. Water quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- ISO 5667-2: 1982. Water Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- ISO 5667-3: 1985. Water Quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples.

4. DEFINICIONES

Colifagos somáticos: Virus bacterianos capaces de infectar cepas específicas de *Escherichia coli* (y cepas relacionadas) por unión a la membrana celular de la bacteria durante el primer paso del proceso infeccioso. Estos virus producen placas visibles o calvas de lisis (zonas claras) en un césped confluyente de una bacteria hospedadora creciendo bajo condiciones adecuadas de cultivo.

La presencia de colifagos somáticos en una muestra de agua indica normalmente contaminación por heces humanas o animales o por agua residuales. Proporcionan un método relativamente rápido y simple para la detección de contaminación fecal, y su resistencia en aguas y alimentos es más parecida a la de los virus entéricos humanos que la que presentan las bacterias fecales utilizadas comúnmente como indicadores de calidad. Los cepas de hospedadores de los colifagos somáticos incluyen además de *E. coli* otras especies relacionadas estrechamente, algunas de las cuales pueden estar presentes en ambientes acuáticos sin contaminación fecal.



Siembra en doble capa: Método de inoculación en un medio de cultivo en el que se mezcla una alícuota de una muestra o cultivo líquido con una porción de agar semisólido (medio con la mitad del agar normal), y una vez homogeneizado se vierte sobre una placa con el mismo medio, pero con la cantidad normal de agar y solidificado.

5. FUNDAMENTO

La muestra o dilución es mezclada con un pequeño volumen de agar semisólido y un cultivo de la cepa bacteriana hospedadora. Esta mezcla se vierte sobre una placa con agar nutritivo. Tras una incubación adecuada, se contabilizan todas las placas (calvas de lisis) presentes en el medio gelificado. Los resultados se expresan como unidades formadoras de placas (partículas) UFP por unidad de volumen (UFP/ml, UFP/l).

La bacteria hospedadora utilizada en este ensayo no es patógena para el hombre o animales y puede ser manipulada de acuerdo a los procedimientos normales de seguridad de los laboratorios de microbiología. Los colifagos somáticos no son patógenos para el hombre o animales, aunque algunos son muy resistentes al secado. Se deben tomar las precauciones adecuadas para prevenir contaminación cruzada de los materiales utilizados en el análisis, particularmente cuando se examinan o manipulan cultivos de alto título o al inocular cultivos de las cepas hospedadoras. Tales procedimientos deben realizarse en cabinas de flujo laminar o en condiciones asépticas en áreas separadas del laboratorio.

6. REACTIVOS, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

6.1. Reactivos

1. Cloruro sódico (NaCl) (CAS nº 7647-14-5) (Scharlab Ref. SO022710500 o similar).
2. Peptona (CAS nº 91079-38-8) (Scharlab Ref. 45893-0010 o similar).
3. Extracto de levadura (Scharlab Ref. 07-079-500 o similar).
4. Extracto de carne (Scharlab Ref. 07-515-500 o similar).
5. Carbonato de sodio anhidro (Na₂CO₃) (CAS nº 497-19-8) (Scharlab Ref. SO01160500 o similar).
6. Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O) (CAS nº 7791-18-6) (Scharlab Ref. MA00350500 o similar).
7. Glicerol (CAS nº 56-81-5) (Scharlab Ref. GL00271000 o similar).



8. Cloroformo (CHCL₃) (CAS nº 67-66-3) (Scharlab Ref. CL02031000).
9. Agua destilada tipo II.
10. Alcohol para quemar.

6.2. Soluciones

1. [Solución de Agua de Peptona Salina \(APS\).](#)

Reactivo	Cantidad
Cloruro sódico	8,5 g
Peptona	1,0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los ingredientes en agua caliente. Ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ a $45 \pm 3^\circ\text{C}$ para que después de la esterilización el pH tenga un valor de $7,2 \pm 0,5$. Autoclavar a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 min. Se puede almacenar no más de 6 meses, en oscuridad y a $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

2. [Solución de Na₂CO₃](#): 150 g en 1000 ml de agua destilada. Agitar hasta su total disolución.
3. [Solución de MgCl₂](#): 100 g en 50 ml de agua destilada (4,14 mol/l). El MgCl₂·6H₂O es muy higroscópico y no tendrá forma cristalina después de que se abra el recipiente. Esterilizar por autoclave (condiciones estándar) y almacenar a temperatura ambiente en oscuridad.
4. [Solución de CaCl₂·H₂O \(1 mol/l\)](#): 14,6 g/100 ml. Disolver el cloruro cálcico en el agua mientras se calienta suavemente. Enfriar a temperatura ambiente y esterilizar mediante un filtro de jeringa de 0,2 µm de poro. Conservar en oscuridad a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante un periodo no superior a 6 meses.
5. [Glicerol](#): Distribuir 20 ml en botes adecuados y esterilizar por autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 min. Almacenar en oscuridad durante 1 año como máximo.



6.3. Medios de cultivo

1. [Caldo de Sholtens modificado \(Modified Sholtens' Broth\) \(MSB\)](#)

Composición:

Reactivo	Cantidad
Peptona	10,00 g
Extracto de levadura	3,00 g
Extracto de carne	12,00 g
Cloruro sódico	3,00 g
Solución de Na ₂ CO ₃	5,00 ml
Solución de MgCl ₂	0,30 ml
Agua	1000 ml

Disolver los ingredientes en agua caliente. Ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ a $45 \pm 3^\circ\text{C}$ para que después de la esterilización el pH tenga un valor de $7,2 \pm 0,5$. Distribuir en recipientes con volúmenes de 200 ml y esterilizar en el autoclave $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 min. Almacenar en oscuridad a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ por un periodo no superior a 6 meses.

2. [Agar de Sholtens modificado \(Modified Sholtens' Agar\) \(MSA\)](#)

Composición del medio base:

Reactivo	Cantidad
Peptona	10,00 g
Extracto de levadura	3,00 g



Extracto de carne	12,00 g
Cloruro sódico	3,00 g
Solución de Na ₂ CO ₃	5,00 ml
Solución de MgCl ₂	0,30 ml
Agar	15,00 g
Agua	1000 ml

Disolver los ingredientes en agua caliente. Ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ a $45 \pm 3^\circ\text{C}$ para que después de la esterilización el pH tenga un valor de $7,2 \pm 0,5$. Distribuir en recipientes con volúmenes de 200 ml y esterilizar en el autoclave $121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 min. Almacenar en oscuridad a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ por un periodo no superior a 6 meses.

Composición del medio completo:

Reactivo	Cantidad
Medio base	200 ,0 ml
Solución de CaCl ₂ ·H ₂ O	1,2 ml

Fundir el medio base y enfriar a hasta una temperatura de entre $45-50^\circ\text{C}$. Asépticamente, añadir la solución de cloruro de calcio, mezclar bien y repartir a razón de 20 ml en placas de Petri de 90 mm. Dejar solidificar en una superficie horizontal y almacenar en oscuridad a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ por no más de 1 mes, siempre que no se produzca deshidratación del medio.

3. [Agar semisólido de Sholtens modificado \(Semi-solid Modified Sholtens' Agar\) \(ssMSA\).](#)

Preparar el medio base de acuerdo a las especificaciones del apartado 2 pero usar la mitad de agar (7 g). Distribuir en recipientes adecuados a razón de 50 ml y autoclavar bajo las mismas condiciones que el medio sólido.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



MAC 2014-2020
Cooperação Territorial



Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



4. Agar MacConkey (Scharlab Ref. 02-611-500 o similar).

Medio selectivo y diferencial empleado en la detección, aislamiento y recuento de *Salmonella* y coliformes en muestras clínicas de acuerdo a la “Pharmacopoeial Harmonized Methodology” y en muestras de alimentos de acuerdo a la ISO 21150:2006.

Resuspender el liofilizado siguiendo las instrucciones del fabricante y esterilizar por autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Repartir en placas de Petri de 90 mm a razón de 20 ml. Dejar solidificar sobre una superficie horizontal y almacenar a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ no más de 1 mes.

5. Cultivos de referencia:

- a. *Escherichia coli* strain C, ATCC 13706, conocida también como WG5. (bacteria hospedadora).
- b. Bacteriófago ϕX174 .

7. EQUIPAMIENTO Y MATERIAL FUNGIBLE

1. Autoclave, capaz de mantener una temperatura de $121\pm 3^{\circ}\text{C}$.
2. Baño de agua termostático a $45\pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Estufa microbiológica, capaz de mantener una temperatura de $36\pm 2^{\circ}\text{C}$.
4. pHmetro.
5. Agitador vórtex.
6. Refrigerador.
7. Espectrofotómetro para cubetas de 1 cm de longitud de camino óptico rango de 500-650 nm y ancho de banda máximo 10 nm.
8. Cubeta para espectrofotómetro.
9. Matraces erlenmeyers de 250 ml de capacidad.
10. Filtros de jeringa de baja absorción proteica (PVDF, $0,22\ \mu\text{m}$, 25 mm de diámetro).
11. Jeringuillas desechables de 5 ml.
12. Placas de Petri de 90 mm.
13. Pipeta automática de 100 μl .



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



MAC 2014-2020
Cooperação Territorial



Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



14. Pipeta automática de 1000 μ l
15. Pipeta automática de 5000 μ l.
16. Tubos de ensayo estériles de vidrio borosilicato de 13 ml con tapón.
17. Microtubos tipo Eppendorf de 1,5 ml con tapa plana.
18. Gradillas para tubos de 13 ml.
19. Mechero de gas butano o de alcohol.
20. Guantes desechables de varias tallas (S, M, L, XL).
21. Puntas estériles para pipeta automática 10-100 μ l.
22. Puntas estériles para pipeta automática 100-1000 ul.
23. Puntas estériles para pipeta automática 1000-5000 μ l.
24. Material de vidrio para la preparación del medio de cultivo.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Toma de muestra

Para la toma de muestras se requieren frascos de vidrio neutro estériles, preferentemente de borosilicato de 500/1000 ml de capacidad, con boca ancha y tapa esmerilada o de rosca. Se pueden utilizar también frascos estériles de plástico de un solo uso.

Las muestras se deben analizar lo antes posible. Si el tiempo de traslado no es superior a 2 h., la muestra se puede transportar en las condiciones iniciales. Si el periodo de transporte es más prolongado se debe conservar a 4º C. El análisis microbiológico debe realizarse antes de que hayan transcurrido 6- 8 h. desde la toma de la muestra.

8.2. Toma de muestra



8.2.1. Cultivo y mantenimiento de la cepa bacteriana hospedadora

El cultivo y mantenimiento de la bacteria hospedadora requiere varios pasos. Para este cultivo en la mayoría de los casos se prescribe la agitación suave del cultivo. Además de aumentar la tasa de crecimiento de las bacterias, la agitación asegura que todas las bacterias estén creciendo activamente y no se desarrollen células en fase estacionaria. La presencia de estas células podría disminuir la eficiencia del cultivo a la hora del ensayo. En el caso de que no exista un agitador, el cultivo podría agitarse manualmente de forma repetida.

8.2.1.1. Preparación de los cultivos stock.

1. Rehidratar el contenido de una ampolla liofilizada con el cultivo bacteriano de referencia (E. coli WG5) en 3 ml de MSB usando una pipeta.
2. Transferir la suspensión a un matraz erlenmeyer de 250 ml que contenga 50 ml de MSB.
3. Incubar durante 20 ± 4 h. a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación suave (o agitar manualmente cada 15 min).
4. Añadir 10 ml (concentración final de 15-20% v/v) de glicerol estéril y mezclar bien con vórtex.
5. Distribuir en tubos tipo eppendorf a razón de 0,5 ml y conservar a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ o en nitrógeno líquido (se puede conservar a -20°C , pero es necesario refrescar los cultivos cada varios meses).
6. Este primer pase de la cepa hospedadora debe almacenarse como material de referencia en el laboratorio.

8.2.1.2. Preparación de los cultivos de trabajo

1. Tomar un vial de cultivo stock del congelador y dejarlo atemperar hasta que alcance la temperatura ambiente ($15-30^\circ\text{C}$). Inocular en una placa de agar MacConkey mediante una siembra por agotamiento para obtener colonias aisladas. El resto del contenido del vial se puede utilizar para inocular varias placas.
2. Incubar a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 ± 4 h.
3. Añadir 50 ml de MSB a un matraz erlenmeyer de 250 ml y calentar al menos hasta alcanzar la temperatura ambiente (el crecimiento de la bacteria hospedadora es más rápido si el caldo se precalienta hasta 37°C).
4. Seleccionar de 3 a 5 colonias lactosa positivas (color rosado) del agar MacConkey e inocular el material de cada una de esas colonias en el matraz con MSB.
5. Incubar 5 ± 1 h. a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación suave.
6. Añadir 10 ml de glicerol y mezclar bien.



ADAPTARES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



7. Distribuir en tubos tipo eppendorf a razón de 1,2 ml y conservar a $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ o en nitrógeno líquido (se puede conservar a -20°C , pero es necesario refrescar los cultivos cada varios meses). Estos viales son los cultivos de trabajo que se utilizaran en el proceso analítico.
8. En el caso de que se vayan a realizar un elevado número de análisis se pueden inocular varios matraces en paralelo.

8.2.2. Calibración de medidas de absorbancia para recuentos de microorganismos viables

1. Tomar un vial de cultivo stock del congelador y dejarlo atemperar hasta que alcance la temperatura ambiente ($15-30^{\circ}\text{C}$).
2. Añadir 50 ml de MSB a un matraz erlenmeyer de 250 ml y calentar al menos hasta temperatura ambiente (el crecimiento de las bacteria hospedadora es más rápido si el caldo se precalienta hasta 37°C).
3. Llenar una cubeta de espectrofotómetro con el MSB de este matraz para ajustar la lectura del espectrofotómetro a 0.
4. Inocular el MSB del matraz con 0,5 ml de cultivo de trabajo e incubar a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ en agitación suave durante 3,5 h.
5. Cada 30 min. extraer, de forma aséptica, 1 ml del cultivo para el recuento de células viables, para lo cual se mide la absorbancia a 600 nm, teniendo en cuenta que el matraz debe permanecer fuera de la estufa el periodo de tiempo más corto posible.
6. Realizar diluciones seriadas a partir de este mililitro hasta la dilución 10-7, utilizando APS. Utilizar las diluciones 10-5, 10-6, 10-7 para el recuento.
7. Un mililitro de cada una de las diluciones elegidas se mezclan en un tubo de vidrio estéril con 2,5 ml de ssMSA. Se vierten en placas de MSA, y se distribuyen por toda la superficie de la placa. Se deja solidificar sobre una superficie horizontal. Este procedimiento hay que realizarlo por duplicado para cada dilución.
8. Las placas se incuban a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 20 ± 4 h.
9. Contar el total de colonias (en la superficie y en el interior del agar) en aquellas placas que contengan entre 30 y 300 colonias. Hacer las medias entre las placas de la misma dilución. Calcular el número de UFC/ml.

* Este procedimiento debería repetirse 2-3 veces para establecer la relación entre las medidas de absorbancia y el número de UFC/ml.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



* Si no se alcanza una densidad de 10^8 UFC/ml a las 3,5 h, se puede trabajar con 1 ml de inóculo en lugar de 0,5 ml.

8.2.3. Cultivo y mantenimiento del bacteriófago ϕ X174

1. Introducir 25 ml de MSB en un erlenmeyer de 250 ml e inocular con un vial de cultivo de trabajo de la cepa de E. coli (1 ml). Incubar a 37°C 20 ± 4 h. en agitación.
2. Añadir 25 mL de MSB a un erlenmeyer de 300 ml, atemperarlo e inocular 0,25 ml del cultivo anterior.
3. Incubar durante 90 min. y añadir el bacteriófago de una solución stock para tener una concentración final aproximada de 10^7 UFP/ml.
4. Incubar durante 4-5 h. Añadir 2,5 ml de cloroformo, mezclar bien y dejar toda la noche a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.
5. Decantar la fase acuosa en un tubo de centrifuga y centrifugar a un mínimo de $3000g$ 20 min.
6. Pipetear el sobrenadante cuidadosamente y conservar a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.
7. Titular la suspensión obtenida que debería estar en torno a 10^9 ml⁻¹. Para ello, a partir de esta suspensión se preparan diluciones seriadas y se cultiva según el procedimiento de doble capa que se describe a continuación. Guardar las diluciones en refrigerador.
8. Añadir 10 ml de glicerol al sobrenadante y mezclar bien.
9. Distribuir en tubos tipo eppendorf a razón de 1,2 ml y conservar a $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ o en nitrógeno líquido (se puede conservar a -20°C , pero es necesario refrescar los cultivos cada varios meses). Estos viales son los cultivos de trabajo del bacteriófago que se utilizaran en el proceso analítico.

8.3 Técnica analítica

8.3.1 Preparación de inóculos

1. Tomar un vial de cultivo stock y dejar atemperar a temperatura ambiente ($15-30^{\circ}\text{C}$).
2. Añadir 50 ml de MSB a un matraz erlenmeyer de 250 ml y dejar que alcance al menos la temperatura ambiente (el crecimiento de la bacteria hospedadora es más rápido si el caldo se precalienta hasta 37°C).
3. Ajustar espectrofotómetro a cero.
4. Inocular 0,5 ml del cultivo de trabajo al matraz con el MSB.
5. Incubar a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ con agitación suave durante 3,5 h. aproximadamente.



ADAPTaRES

Uso Eficiente da Água e sua Reutilização para a Adaptação às Mudanças Climáticas na Macaronésia



MAC 2014-2020
Cooperação Territorial



Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



6. Medir absorbancia cada 30 min.
7. Al alcanzar la absorbancia correspondiente con una densidad de 108 UFC/ml, colocar el erlenmeyer con el inóculo en un baño de agua-hielo.
8. Usar el inóculo el mismo día.

** Alternativa de preparación menos controlada:*

- a) Inocular 0,5 ml de un cultivo de trabajo en un recipiente adecuado con 50 ml de MSB precalentado a temperatura ambiente o 37°C.
- b) Incubar 3±1h a 36±2 °C con agitación suave.

8.3.2. Preparación de la muestra

1. Con ayuda de un jeringuilla desechable filtrar 5 ml de muestra a través de un filtro de jeringa de baja absorción proteica, para eliminar la flora bacteriana acompañante. En el caso de que el agua contenga una alta cantidad de sólidos y el filtro se obture, utilizar los filtros necesarios.
2. En caso de que se prevea una contaminación fecal elevada, realizar diluciones seriadas hasta 10⁻⁶.

8.3.3. Procedimiento estándar

1. Fundir botes de 50 ml de ssMSA en un baño de agua hirviendo o en microondas.
2. Añadir asépticamente 300 µl de la solución de CaCl₂ a temperatura ambiente.
3. Distribuir alícuotas de 2,5 ml de ssMSA en tubos de ensayo con tapas y colocarlos en un baño de agua a 45±1°C.
4. Añadir 1 ml de la muestra original filtrada o dilución a temperatura ambiente. Por cada muestra o dilución debe realizarse este proceso por duplicado.
5. Anadir 1 ml del inóculo a cada tubo con ssMSA con muestra/dilución, mezclar minuciosamente con vórtex evitando la formación excesiva de burbujas y verter el contenido en una placa de 90 mm con MSA (medio completo) a temperatura ambiente.
6. Distribuir por toda la superficie de la placa mediante giros en todas las direcciones. Dejar solidificar en una superficie horizontal con la tapa ligeramente abierta de forma aséptica.
7. Incubar las placas boca abajo a 36±2 °C durante 18±2 h (no apilar más de 6 placas).
8. Contar todas las placas/calvas de lisis presentes en cada placa dentro de las 4 h. posteriores a finalizar el periodo de incubación. Hacer la media entre las dos placas correspondientes a cada muestra o dilución.

12



9. Con cada serie de muestras, añadir al ensayo un blanco utilizando diluyente estéril como muestra y un control de los colifagos somáticos, utilizando un cultivo del bacteriófago ϕ X174 también como muestra.

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Seleccionar placas con placas/calvas de lisis bien separadas, preferiblemente aquellas en que hayan más de 30 colonias.
 - Si hay <30, escoger aquellas placas inoculadas con el mayor volumen de muestra.
 - Por el nº colonias contadas, calcular el número de partículas formadoras de colonias (PFP) o unidades formadoras d placa (UFP) de colifagos somáticos en 1 ml de muestra:

$$pfp/ml = \frac{N}{(n1 \cdot V1 \cdot F1) + (n2 \cdot V2 \cdot F2)}$$

donde: N = número total calvas contadas.

n1, n2 = número de réplicas contadas por dilución F1, F2.

V1, V2 = volumen usado con dilución F1, F2.

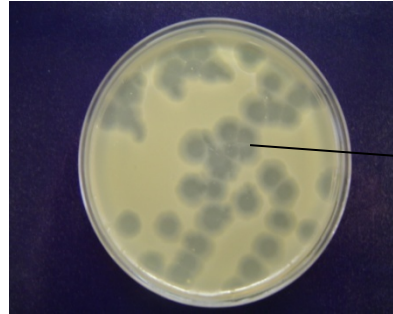
F1, F2 = factor dilución/concentración usada por test V1, V2 (F=1 para muestras sin diluir, F=0,1 para una dilución 1/10, F=10 para una muestra concentrada 10 veces).

- Si sólo se usa una dilución/concentración, se simplifica la fórmula:

$$pfp/ml = \frac{N}{n \cdot V \cdot F}$$



10.OBSERVACIONES



Calvas de lisis

Colifagos somáticos (calvas de lisis) sobre un cultivo de *E. coli* WG5 en MSA