

# Influencia de la procedencia de los componentes del medio de cultivo en la calidad de los ensayos microbiológicos para la determinación de bacteriófagos

Annia González-Crespo, Angela E. Sosa-Espinosa\*

Laboratorio Colección Central de Microorganismos. Dirección de Seguridad y Protección. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 entre 158 y 190. Cubanacán. Playa. La Habana. Cuba.

**email:** angela.sosa@cigb.edu.cu

---

La contaminación por virus bacterianos es uno de los problemas más difíciles de evaluar en la industria biotecnológica moderna, sobre todo en las producciones de proteínas que están basadas en cepas recombinante de *Escherichia coli*. Para certificar que un banco de cepas está libre de bacteriófagos el método más recomendado sigue siendo la inducción de la fase del ciclo lítico sobre placas con medios semisólidos. En este trabajo nos propusimos evaluar medios de cultivos elaborados con bases de diferentes casas comerciales para la detección de bacteriófagos contaminantes. Para ello utilizamos un aislado de bacteriófago ambiental y la cepa sensible LE 392 y bases de las firmas OXOID, BioCen y Biolife. Después de estandarizar la metodología de ensayo se evaluó la habilidad de una preparación concentrada del aislado ambiental de formar placas de lisis en los medios elaborados con reactivos de las tres casas comerciales. La mayor cantidad de placas de lisis se obtuvo cuando se emplearon las bases provenientes del Centro Nacional de Biopreparados, el medio donde menos placas de lisis observamos fue empleando bases proveniente de la Casa comercial Biolife con dos órdenes de magnitud menos. El medio preparado con bases provenientes de la casa comercial OXOID fue el que mostró mejor consistencia entre lotes.

**Palabras clave:** bacteriófagos, contaminación, medios de cultivo.

---

## Introducción

El control de calidad de bancos de las cepas de *E. coli* utilizadas en las metodologías de la Biotecnología moderna incluye la verificación de contaminantes ambientales (1). De estos la contaminación por bacteriófagos es de las más difíciles de evaluar (2).

Los bacteriófagos son virus capaces de infectar las bacterias y no son detectables por las técnicas clásicas que se emplean en microbiología para el recuento de contaminantes ambientales. Dentro de los métodos de evaluación de la microbiología ambiental en las áreas no hay descrito una forma normalizada de evaluación de la presencia de estas entidades microbianas (3).

*E. coli* es sensible a una gran variedad de bacteriófagos. Sin embargo, los diferentes aislamientos y sus derivados tienen una susceptibilidad diferente a la infección por fagos lo que hace que los métodos moleculares, aunque más sensibles, no puedan ser empleados a menos que se conozcan todos los subtipos de bacteriófagos en el área y la capacidad de estos de infectar las cepas de un proceso biotecnológico determinado (4).

La determinación de la concentración de partículas infecciosas de fago sobre un césped de bacterias sensibles en placa con medio agarizado sigue siendo el protocolo recomendado para el trabajo con estos virus (5). La formación de las placas de lisis es un proceso que no está explicado totalmente. El desarrollo de los bacteriófagos y la habilidad de la formación de placas de lisis se han relacionado, entre otros, factores con la fisiología de la célula bacteriana y la relación de concentración fago bacteria (6).

Por lo tanto, la elección del medio de cultivo para determinar la presencia de bacteriófagos en una muestra ambiental puede influir en la visualización de las placas de lisis provocando la liberación o el rechazo por criterios de calidad de bancos contaminados con estas entidades microbiológicas. En estudios anteriores nosotros encontramos una gran variabilidad entre áreas que empleaban un mismo lisado como control del método de determinación de la presencia o no de fagos en sus procesos, a pesar de emplear la misma metodología. En el análisis de los resultados solo encontramos diferencia en los proveedores de los componentes de los medios de cultivo. Por este motivo, hemos realizado

---

\* Licenciada en Biología, Master en Microbiología, Investigador auxiliar. Especialista Principal de Seguridad biológica, química, radiológica y salvaguardia. Jefa del Laboratorio Colección Central de Microorganismos

un estudio comparativo de tres proveedores de medios de cultivo con el objetivo de analizar su influencia en la metodología de detección de bacteriófagos para la liberación de bancos de cepas o procesos fermentativos basado en cepas de *E. coli*.

## Materiales y Métodos

Para el estudio se empleó la cepa de *E. coli* sensible a bacteriófagos LE392 con genotipo *glnV44 supF58 (lacY1 o ΔlacZY) galK2 galT22 metB1 trpR55 hsdR514 (rK-mK+)* provenientes de la Colección Central de Microorganismos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

El medio de cultivo LB se utilizó para el crecimiento bacteriano en líquido (7). El mismo medio, pero suplementado con agar bacteriológico 15 g/L, se empleó para el crecimiento bacteriano en placas con medio sólido. Para la obtención y titulación de lisados fágicos se empleó agar blando (10 g/L de triptona, 2,5 g/L de NaCl y agar bacteriológico 6 g/L).

Todos los medios empleados para el establecimiento de la metodología se prepararon con componentes de la misma casa comercial. Evaluamos primeramente OXOID, se pesó para preparar medio de cultivo LB 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl y para obtener LB sólido se adicionó agar bacteriológico 15 g/L, para el agar blando se pesó triptona 10 g/L, NaCl 2,5 g/L y agar 6 g/L. Cuando evaluamos Biolife y BioCen fueron pesadas estas mismas cantidades. Se evaluaron tres lotes diferentes de cada casa comercial.

### Metodología para evaluación de la influencia de la fisiología de la cepa en el título del fago

Empleando los medios elaborados con los diferentes proveedores se evaluó la influencia del estado fisiológico del cultivo en la formación de placas de lisis. Para ello inoculamos la cepa a infectar en 5 mL de LB y se incubó a 37°C toda la noche, luego se infectó con el lisado de fago, se adicionó el agar blando, se vertió en las placas de LB y se incubaron a 37°C hasta la aparición de las placas de lisis. Un segundo ensayo consistió en inocular la cepa a infectar en 5 mL de LB e incubar a 37°C toda la noche. De este cultivo se inocularon 5 mL en medio líquido LB, se incubó en agitación a 180 rpm y 37°C hasta el inicio de la fase estacionaria (aproximadamente 6 h). Este cultivo se infectó con el lisado de fago. Luego se adicionó el medio agar blando, se vertió en placas

que contenían medio LB y se incubaron a 37°C hasta la aparición de las placas de lisis.

Ensayo de la adición de sales trazas al medio de cultivo. Todos los ensayos se llevaron a cabo adicionando a los medios preparados 3 mL por litro de una solución de sales trazas (TES) que contiene: CaCl<sub>2</sub> anhidro (0,5 g/L), ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (0,18 g/L), MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (0,1 g/L), FeCl<sub>3</sub> (8,35 g/L), CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (0,1 g/L) y CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O (0,18 g/L) (8) independientemente de la casa comercial de los componentes que se emplearon para cada ensayo.

### Metodología para evaluación de la habilidad de formación de placas de lisis de bacteriófagos en medios con componentes de diferentes proveedores

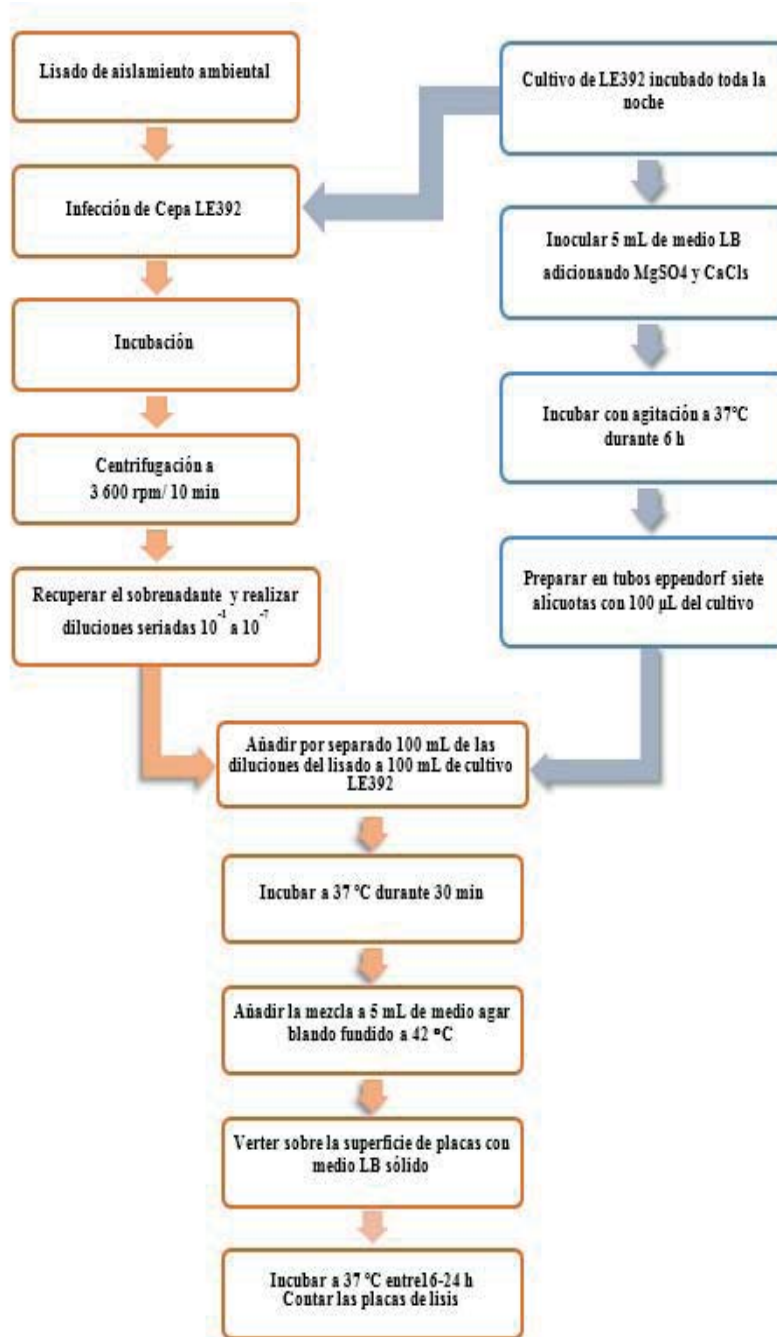
Los cultivos se inocularon en tubos de precultivos que contenían 5 mL del medio LB preparados con reactivos de las casas comerciales OXOID, Biolife y BioCen y se incubaron con agitación a 37°C durante toda la noche. A partir de este cultivo se inocularon 0,1 mL en un precultivo LB y se incubó en las mismas condiciones durante 6 h. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta 10<sup>-7</sup> de un lisado de fago.

En tubos eppendorf de 5 mL se añadieron 0,1 mL del cultivo de LE392 crecido durante 6 h y 0,1 mL de las diluciones del lisado de bacteriófagos. Después de mezclar se incubó a 37°C durante 30 min. Luego de este tiempo se añadieron 5 mL de medio agar blando fundido a 42°C y se vertieron sobre placas con medio LB. Las placas se incubaron a 37°C entre 16-24 h. Pasado este tiempo se determinó el número de Ufp/mL, donde Ufp/mL = # de placas x dilución x 10. Se realizaron 3 réplicas. La Figura 1 muestra la estrategia general seguida.

## Resultados y Discusión

Una de las verificaciones necesarias en los bancos de las cepas de *E. coli* de interés biotecnológico es la comprobación de la pureza con relación a los posibles contaminaciones con bacteriófagos provenientes de diferentes fuentes ambientales. De esta forma se evita el paso de contaminantes muy difíciles de detectar a las producciones a gran escala.

Para certificar que un banco está libre de fagos con fase de ciclo lítico es necesario inducir la lisis sobre un césped de una cepa sensible. En nuestros ensayos de rutina en el laboratorio observamos que existían incongruencias con relación a lisados de bacteriófagos aislados del ambiente cuando cambiábamos de lote de medio de cultivo o de proveedor. En el establecimiento



**Fig. 1.** Estrategia general para la titulación de bacteriófagos obtenidos de aislamientos ambientales.

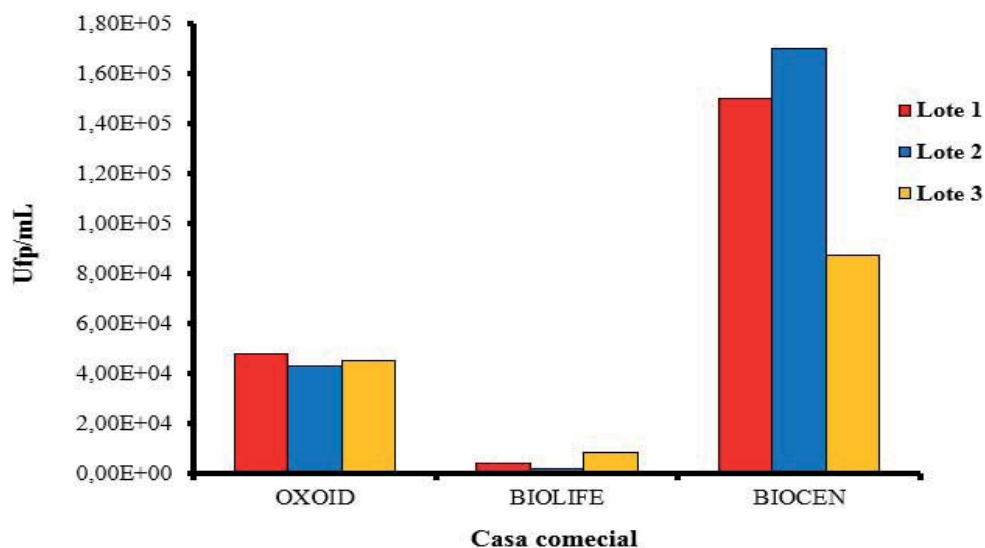
del ensayo, comprobamos que no siempre se obtenían los mismos resultados con un lisado de bacteriófagos aislados del ambiente cuando se cambiaban los lotes de medios de cultivo, por lo que la evaluación inicial del proveedor es esencial para la estandarización del método de determinación de bacteriófagos.

En base a esta observación evaluamos medios de cultivos elaborados con componentes de tres casas comerciales diferentes: OXOID, BioCen y Biolife, como única diferencia en el ensayo para la detección

de bacteriófagos contaminantes en bancos de cepas de *E. coli*.

Para ello utilizamos un lisado de fago ambiental con título de  $10^5$  unidades formadoras de placas por mL (Ufp/mL) y la cepa LE 392 sensible a la infección por fago.

Bajo las mismas condiciones de ensayo se evaluó la habilidad de formar placas de lisis de la preparación concentrada del aislado de bacteriófagos sobre césped de la cepa LE 392 en la superficie de placas de medio



**Fig. 2.** Comparación del número de placas de lisis formadas sobre un césped de la cepa de *E. coli* LE392 en medio LB preparado con reactivos de diferentes casas comerciales.

LB elaborados con bases de las tres casas comerciales OXOID, BioCen y Biolife. Los mayores por ciento de infección se obtuvieron con los lotes de bases provenientes del BioCen donde se detectó el mayor conteo de placas de lisis con  $2 \times 10^5$  Ufp/mL, el medio donde menos placas de lisis observamos fue en el Biolife (Fig. 2). Sin embargo, la mejor reproducibilidad entre lotes se encontró en medios preparados con reactivos de la casa comercial OXOID.

## Referencias

- Pérez-Reytor DC, Domínguez-Vázquez I, Olano-Ruiz E, Sosa-Espinosa AE. Estrategia de verificación de calidad de las cepas de *Escherichia coli* conservadas en la Colección del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. *Vaccimonitor* 2010;19(1):9-15.
- Marcó MB, Moineau S, Quiberoni A. Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2012;2(3):149-58.
- Los M. Minimization and prevention of phage infections in bioprocesses. In: Cheng Q. (eds) *Microbial Metabolic Engineering: Methods and Protocols*, vol 834. New York: Springer; 2012. p:305-15.
- Jorquera D, Galarce N, Borie C. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista chilena de infectología*, 2015;32(6):678-88.
- López Salguero DC. Bacteriófagos como alternativa para eliminar cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos presentes en tres hospitales del Ecuador. [Tesis doctoral]. Quito: Universidad Internacional SEK; 2015.
- Espinel CF, Dominick VF, Morillo MM. Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista Peruana de Biología* 2017;24(1):93-100.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual: second edition*. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Wilms B, Hauck A, Reuss M, Syltatk C, Mattes R, Siemann M, Altenbuchner J. High cell density fermentation for production of LNCarbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter. *Biotechnology and Bioengineering* 2001;73(2):95-103.
- González N, Zamora J, Pérez C, Salazar E, Pérez E, Pimentel E, Expósito M. Incremento en la conversión del medio de cultivo en biomasa en la fermentación de *Corinebacterium paurometabolum*. *Revista Cubana de Química*, 2005;17(1):154-5.
- Wilkinson BJ, Hindahl MS, Galbraith L, Wilkinson SG. Lipopolysaccharide of *Paracoccus denitrificans* ATCC13543. *FEMS Microbiology Letters* 1986;37(1):63-67.
- Papp-Wallace K, Maguire M. Magnesium Transport and Magnesium Homeostasis. *EcoSal Plus* 2008; 3(1): doi: 10.1128/ecosalplus.5.4.4.2.

---

## **Influence of the origin of the components of the culture medium on the quality of the microbiological assays for the determination of bacteriophages**

### **Abstract**

Contamination by bacterial viruses is one of the most difficult problems to evaluate in the modern biotechnology industry, especially in the productions of recombinant proteins that are based on *Escherichia coli* strains. To certify that a strain bank is free of bacteriophage, the most recommended method is still the induction of the lytic cycle phase on plates with semisolid media. In this work we set out to evaluate means of cultures made with bases of different commercial houses for the detection of contaminating bacteriophages. For this purpose we used an environmental bacteriophage isolate and the LE392 sensitive strain and bases of the firms OXOID, BioCen and Biolife. After standardization of the test methodology, the ability of a concentrated preparation of the environmental isolate to form lysis plates in the media made with reagents from the three commercial houses was evaluated. The largest number of lysis plates was obtained when using the bases from the National Center of Biopreparates, the means where less lysis plates were observed was using bases from the Biolife Commercial House with two orders of magnitude less. The medium prepared with bases from the commercial house OXOID was the one that showed better lot to lot consistency.

**Keywords:** bacteriophages, contamination, culture media.

---

*Recibido: Septiembre de 2017*

*Aceptado: Octubre de 2017*