

I. INTRODUCCIÓN

Los virus, como la mayoría de los parásitos, son muy específicos en relación con los hospedadores que parasitan. Algunos virus son específicos de bacterias y se denominan virus bacterianos, **bacteriófagos o fagos**. La mayoría de las bacterias son susceptibles a ataque por bacteriófagos.

Un fago está constituido por un cromosoma de ácido nucleico (DNA o RNA) rodeado por una cubierta de moléculas de proteína. Una serie de fagos bien estudiados son los que se conocen como T1, T2, etc., pertenecientes a la serie denominada fagos T-par (T2, T4, etc.). Durante la infección el fago se adsorbe a una bacteria e inyecta su material genético dentro del citoplasma. La información genética del fago pasa entonces a controlar la maquinaria de la célula bacteriana desconectando la síntesis de la bacteria hacia la fabricación de componentes del fago.

Finalmente, se liberan muchas partículas nuevas de fagos cuando la pared de la célula bacteriana se rompe. Este proceso de rotura se denomina **lisis**. Tras la lisis, los fagos descendientes infectan a las células vecinas. Este fenómeno produce un incremento exponencial en el número de células lisadas. Quince horas después del comienzo de un experimento del tipo doble placa de agar, pueden verse los efectos a simple vista: se observa un área clara, **calva o halo**, en el césped opaco de bacterias sobre la superficie de una placa de medio sólido. Dependiendo del fago, estos halos pueden ser grandes o pequeños, claros o turbios, etc. Por tanto, la **morfología del halo** es un carácter del fago que pueden ser objeto de análisis.

Otro carácter fenotípico de los fagos que puede analizarse fenotípicamente es el **rango de hospedadores**. Ciertas estirpes bacterianas son inmunes a la adsorción o inyección de material genético por fagos. Los fagos, a su vez, pueden diferir en el espectro de estirpes bacterianas a las que infectan y lisan.

El objetivo de esta práctica es detectar y cuantificar bacteriófagos específicos de *Escherichia coli* (coliformes) en una muestra de agua residual. Para esta práctica vamos a utilizar las **técnicas de recuento directo** (Doble agar layer, DAL) y la **técnica del número más probable** (NMP). Como cepa hospedadora se utilizará *Escherichia coli* C (ATCC 13706).

Los medios de cultivo utilizados para bacteriofagos han de cumplir dos condiciones:

1. Deben ser medios enriquecidos para las bacterias a las que queremos infectar, en nuestro caso ha de ser un medio enriquecido para *Escherichia coli*.
2. Dicho medio ha de estar enriquecido con iones divalentes. La función de dichos iones es la de ayudar al virus en su adsorción a la bacteria. Normalmente estos iones son calcio y magnesio.

A continuación se ensayarán diversos **métodos de descontaminación** de muestras, como son la utilización de un medio selectivo, o la aplicación de pre-tratamientos físicos o químicos. Los resultados de los ensayos de descontaminación deben expresarse como eficiencia de recuperación respecto al título fágico obtenido en el ensayo directo (considerado como 100%) así como la evaluación del grado de descontaminación.

A. Técnicas de recuento directo: DAL y NMP

B. Técnicas de descontaminación

II. MATERIAL

Medios de cultivo

1. Agar Luria:

Composición por litro de medio:

Tryptona 10g

Extracto de levadura 5g

Cloruro sódico 5g

Sulfato magnésico heptahidrato 0.125g

Agar 12g

pH 7.2

Tras esterilizar (121°C, 15 min.), enfriar aproximadamente a 50°C y añadir 10ml/l de una solución al 5% de $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ estéril.

2. Agar blando:

Composición por litro de medio:

Tryptona 10g

Extracto de levadura 5g

Cloruro sódico 5g

Sulfato magnésico heptahidrato 0.12g

Agar 7g

pH 7.2

La diferencia entre ambos medios de cultivo es que el agar base tiene mayor concentración de agar, y el agar blando hay que mantenerlo, una vez elaborado, en sobrefusión.

Instrumental para la práctica

- 6 tubos con agar blando.
- 6 placas con agar base.
- 1 tubo con cultivo en caldo del hospedador bacteriano (*Escherichia coli*).
- Tubos para realizar diluciones.
- Pipetas de 1 y 10ml.
- Mechero para esterilización.

III. MÉTODO

– Obtención de diluciones decimales seriadas de la muestra a analizar. Partimos de 10 ml de una muestra previamente diluida (10–2). Tomamos con la ayuda de una pipeta 1 ml del tubo que contiene la dilución (10–2) y lo echamos en otro tubo que contiene 9 ml de solución salina para obtener una dilución 10–3. A

continuación tomamos 1 ml del tubo que contiene la dilución 10^{-3} y lo echamos en un tubo que contiene 9 ml de solución salina para obtener una dilución 10^{-4} .

- Adicionamos 0.1 ml de una solución al 13% de $\text{Cl}_2\text{Ca}2\text{H}_2\text{O}$ estéril a tubos de agar blando mantenidos en sobrefusión (45°C).
- Inoculamos cada tubo con 0.2 ml de un cultivo en caldo (fase exponencial de crecimiento) del hospedador bacteriano que en nuestro caso es de *Escherichia coli*, y le añadimos 1 ml de la muestra (o de sus diluciones) a analizar.
- Agitamos (evitando que se formen burbujas) y vertimos sobre una placa de agar base (agar Luria) procurando una diseminación uniforme.
- Una vez solidificada la doble capa, invertimos las placas e incubamos a 37°C , 18–24h.

Cuando se trabaja con muestras de aguas residuales podemos encontrarnos con que hay un alto grado de **contaminación** (materia orgánica, bacterias, etc.). Por un lado, el hecho de que haya bacterias contaminantes puede hacer que no se produzca crecimiento homogéneo y aparezcan colonias contaminantes que no nos permitan ver las muestras, y por tanto en el recuento aparecerán en menor número que en las que en realidad hay.

Otro efecto de la contaminación de aguas residuales es el de la materia orgánica. Los bacteriofagos y los virus tienen gran capacidad de adsorción a cualquier superficie. Si estos virus se encuentran adsorbidos a una superficie no se van a unir a bacterias, no comenzarán el ciclo lítico, y por tanto no formarán placas de lisis. De este modo, al contar las placas de lisis en el ensayo estamos subestimando el número de bacteriofagos. Van a influir negativamente sobre el número de virus por lo que tenemos que someter la muestra a un proceso de descontaminación, en el que no se elimine los bacteriofagos del que son objeto el ensayo.

Hay varias técnicas de descontaminación pero nosotros vamos a ensayar varias de ellas para así poder ver cuál de ellas aporta mejores resultados. Las técnicas a ensayar son las siguientes:

1. Técnica de centrifugación.
2. Tratamiento con cloroformo.
3. Filtración a través de membrana.
4. Filtración a través de membrana previamente tratada con extracto de carne.
5. Empleo de medios selectivos.

1. Técnica de centrifugación

Tomamos 5 ml de la muestra de aguas residuales y la metemos en un tubo centrífugo a 3000×20 min. Transcurrido este tiempo encontraremos en el sobrenadante las partículas víricas. A partir éste es de donde tomamos la muestra para analizar. Hacemos 2 réplicas de cada una de las diluciones.

2. Tratamiento con cloroformo

Consiste en añadir a la muestra de aguas residuales cloroformo al 10% a 4°C . durante 20 min. Tomamos 10 ml de la muestra y la echamos en un recipiente estéril (9 ml). Le añadimos 1 ml de cloroformo y dejamos durante 20 min. El cloroformo actúa principalmente sobre los lípidos de la bacteria y los elimina.

Transcurridos los 20 min. nos encontramos con dos fases: en la parte superior aparecen las partículas víricas y en la parte inferior aparecen las bacterias. El problema es que también eliminamos las partículas envueltas. Tomamos las muestras de la parte superior (donde se encuentran las partículas víricas) y hacemos dos placas para la dilución 10^{-3} y otras dos para la dilución 10^{-4} .

3. Filtración a través de membrana

Para muchas aplicaciones los filtros de membrana han sustituido a otros tipos de filtro. Actualmente se fabrican de celulosa o de sus ésteres (nitrato o acetato de celulosa) sobre un soporte de celulosa regenerada. Entre sus ventajas se citan las siguientes:

- A. Facilidad en el manejo—son relativamente ásperos.
- B. Son lo suficientemente baratos como para utilizarlos una sola vez.
- C. Eléctricamente son neutros—las moléculas cargadas no se separan tan fácilmente de las soluciones como con otros filtros.
- D. Retención mínima del soluto
- E. Exactitud en los grados de tamaño de poro con amplia escala de los mismos.

Las porosidades están comprendidas entre 10 μ m y 5 nm. Tiene forma de disco y cada tipo retiene en su superficie todas las partículas bacterianas y celulares cuyas dimensiones excedan del tamaño del poro. Colocando el disco sobre la superficie de un medio de cultivo adecuado se consigue el crecimiento de las bacterias retenidas en aquél. Se han diseñado diferentes tipos de soportes con el fin de adaptar los discos a los equipos de tipo Seitz, o de vidrio o de metal. Hay pequeños discos que pueden encajarse en las jeringuillas para con la ayuda del embolo de la misma hacer pasar el líquido que se desea filtrar. Tras el montaje sobre el soporte adecuado la membrana se esteriliza a 121° C durante 15 min. Ciertos tipos de membrana pueden esterilizarse entre dos discos de papel y colocarse en la unidad filtrante en el momento del uso siempre que se manejen en condiciones de rigurosa asepsia. Deben evitarse temperaturas por encima de 125° C. Si durante el ciclo de esterilización se precisa utilizar el vacío debe procederse a su aplicación de manera lenta y no en un tiempo prolongado para evitar la rotura del filtro.

Para la realización de la práctica hacemos pasar 10 ml de la muestra a través de un filtro de membrana cuyo diámetro de poro es de 45 μ m. Las partículas víricas, al ser de menor tamaño que el diámetro del poro, van a pasar a través de la membrana, mientras que las bacterias, al ser de mayor tamaño, quedarán retenidas en la membrana. A partir del filtrado hacemos la técnica de la doble capa de agar para cada una de las diluciones.

4. Filtración a través de membrana previamente tratada con extracto de carne

Los virus, debido a su pequeño tamaño, pueden atravesar la membrana del filtro pero ocurre éstos tienen al mismo tiempo una gran capacidad de adsorción. Esta capacidad hace que se queden unidos al filtro no siendo reflejados posteriormente en el recuento del filtrado. La solución a esto es hacer pasar por el filtro una solución estéril de extracto de carne. Las proteínas del extracto de carne van a ocupar el sitio de unión del virus por lo que posteriormente, al hacer pasar la muestra de aguas residuales, los virus no quedarán unidos al filtro y obtendremos mayor cantidad de virus en el filtrado.

Para la realización de la práctica hacemos pasar 10 ml de una solución de extracto de carne al 3% a través del filtro. A continuación pasamos 10 ml de la muestra de agua residual a través de la membrana. Del filtrado que obtenemos hacemos diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-4} (tubos para cada una de las diluciones). Vertemos ahora sobre las placas de agar blando. Agitamos suavemente y vertemos el contenido sobre las placas de agar

base.

5. Empleo de medios selectivos

Se utilizan medios de cultivo que contienen sustancias que inhiben el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos con excepción de aquellos para los que se ha ideado, por ejemplo, el medio telurito para el bacilo de la difteria y el agar citrato-desoxicolato para los grupos *Salmonella* y *Shigella*.

Para nuestra práctica vamos a utilizar el medio de cultivo Agar mFC (Difco) como agar soporte en la técnica de DAL. Este medio selectivo permite el crecimiento de *Escherichia coli* pero no el de otras bacterias.

Agar mFC (Difco):

Composición por litro de medio

Triptosa 10g

Proteasa peptona N° 3 5g

Extracto de levadura 3g

Lactosa 12.5g

Sales biliares N°3 1.5g

NaCl 5g

Azul de anilina 0.1g

Agar 15g

pH final 7.4 ± 0.2 a 25° C

Para el ensayo echamos 0.2 ml. de *Escherichia coli* en cada uno de los tubos de agar blando. Añadimos 1 ml de cada una de las diluciones ($\times 2$) a cada uno de los tubos de agar blando. Agitamos suavemente evitando la formación de burbujas. Vertimos el contenido de los tubos sobre las placas de agar mFC.

IV. RESULTADOS

- Hacer una tabla en la que se reflejen los datos obtenidos en los diferentes ensayos.
- Hallar el título expresado como unidades formadoras de placas/ml.
- Discusión sobre cuál de las técnicas da mejores resultados.

DILUCIONES	10-2	10-3	10-4	CONTAMINACIÓN
CONTROL	117-171 / 149-144	20-16 / 12-15	4-1 / 2-2	+ + + +
CENTRIFUGACIÓN	125- 135 / 129-114	22-12 / 7-20	1-0 / 1-1	+ + + / + +
CLOROFORMO	54 / 46-60	5-11 / 13-19	1-0 / 1-3	0 / 0
FILTRACIÓN	1-2 / 6-7	0-0 / 0-0	0-0 / 0-0	0 / 0
FILTRACIÓN + EC	70-120 / 75-67	5-11 / 5-5	0-0 / 2-1	+ / ++

SELECTIVO	389-329 / DNCP	29-37 / 57-40	2-8 / 4-12	0 / +
------------------	----------------	---------------	------------	-------

Para el cálculo del título consideramos sólo los recuento significativos. Significativos son aquellos recuentos comprendidos entre 30 y 300 placas. Así:

ufp/ml="recuentos

Vxdilución

Control ! ufp/ml = $(117+171+149+144)/4$; **Control = 145.25×10²**

1× 10⁻²

Centrifugación ! ufp/ml = $(125+135+129+114)/4$; **Centrifugación= 125.75×10²**

1× 10⁻²

Cloroformo ! ufp/ml = $(54+49+60)/3$; **Cloroformo = 54.3×10²**

1× 10⁻²

Filtración ! ufp/ml = 0 **Filtración = 0**

Filtración + EC ! ufp/ml = $(70+120+75+67)/4$; **Filtración = 83×10²**

1× 10⁻²

Selectivo ! ufp/ml = $(370+570+400)/3$ **Selectivo = 446.67×10²**

1× 10⁻²

Los resultados de los ensayos de descontaminación los expresamos como eficiencia de recuperación respecto al título fágico obtenido en el ensayo directo (considerado como 100%) así como la evaluación del grado de descontaminación. Por tanto:

Control (100 %) ! 145.25×10²

x ! 125.75×10²

Centrifugación = 86.57 %

Control (100 %) ! 145.25×10²

x ! 54.3 ×10²

Cloroformo = 37.38 %

Control (100 %) ! 145.25×10²

x ! 0

Filtración = 0 %

Control (100 %) ! 145.25×10^2

x ! 83×10^2

Filtración + EC = 57.14 %

Control (100 %) ! 145.25×10^2

x ! 446.67×10^2

Selectivo = 307.22 %

Resultado: el método selectivo es el más eficaz ya que nos permite recuperar el mayor porcentaje de virus tras el proceso de descontaminación.

TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

Esta es una técnica más sensible. Se utiliza para analizar muestras bastantes diluidas en la que esperamos encontrar pocos virus. Esta técnica se divide en tres fases:

1. Fase de enriquecimiento
2. Fase de descontaminación
3. Fase confirmativa

1. Fase de enriquecimiento

– Disponemos de 3 series de tubos (3×3) cada uno de los cuales tiene 10 ml de caldo PAB (la primera serie de tubos tienen el caldo PAB a doble concentración).

Medio PAB (Phage Assay Broth)

Composición por medio litro:

Extracto de carne 3 g

Peptona 5 g

ClNa 5 g

Sulfato magnésico heptahidrato 0.2 g

Sulfato manganésico 0.05 g

pH 7.2

Tras esterilizar (121° C, 15 min.) y enfriar, añadir 1ml/l de una solución al 3% de $\text{Cl}_2\text{CaH}_2\text{O}$ estéril.

- Añadir a cada tubo 0.2 ml del cultivo del hospedador bacteriano (*Escherichia coli*)
- A los tres primeros tubos añadir 10 ml de la muestra a analizar.

- A los tres tubos siguientes añadir 1 ml de la misma muestra.
- A los tres últimos tubos añadir 0.1 ml de la muestra.
- Incubar a 37°C durante 18 h.

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------