

Verificación rápida de la pureza microbiológica de bancos de *Escherichia coli* K12

Diliana Celeste Pérez-Reytor, Lázaro Yoel Campos Ramos,
Iveltris Domínguez Vázquez, ✉ Angela Estela Sosa Espinosa

Laboratorio Colección Central de Microorganismo Departamento de Seguridad y Ambiente.
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. PO Box 6162, Cubanacán, Playa, Habana, Cuba.
Telefax: (53-7) 218070 / 336008; Email: angela.sosa@cigb.edu.cu

RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* K12 son muy utilizadas en la investigación biotecnológica por lo que comúnmente se emplean en muchos institutos y centros dedicados a la investigación molecular. Generalmente estas cepas son evaluadas para fijar sus características de calidad y viabilidad. Los métodos de determinación de pureza combinan el crecimiento de diferentes diluciones de los bancos sobre placas que contienen medios no selectivos como el Agar Nutriente o el Agar Triptona Soya con la observación al microscópico del cultivo teñido mediante el método descrito por Gram. En la experiencia de los autores este procedimiento no permite discriminar los contaminantes de crecimiento lento o de apariencia muy similar a la *E. coli*. Debido a esto se estudiaron los contaminantes más frecuentes en el laboratorio y se diseñó una estrategia de verificación de pureza que combina diferentes procedimientos y criterios de identificación. La metodología se basa en: a) el empleo de placas con medios de cultivos indicadores y generales que se emplean con otros fines en microbiología clínica. b) el uso del método de siembra de trazas de dilución, c) la verificación fenotípica y d) el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Esta metodología detecta contaminantes en una proporción de 1 contaminante por 10^9 unidades formadoras de colonias del microorganismo de interés. Esta estrategia de trabajo es aplicable a la evaluación de bancos de *E. coli* y permite la caracterización rápida y el control simultáneo de un gran número de cepas.

Palabras claves: verificación *E. coli*, método simplificado pureza, pureza bacteriana

Biotecnología Aplicada 2003;20:231-237

ABSTRACT

***Escherichia coli* K12 banks microbiologic purity rapid verification.** *E. coli* K12 strain are very useful in biotechnological researches and they are commonly used by many centers and institutes. Generally these strains are submitted to frequent verifications in order to know their qualities, the viability. Usually for checking purity degree several ten-fold dilutions of a fresh *E. coli* liquid culture are poured on Nutrient Agar plates or on Tryptone Soy Agar plates. The microbial growth and the cell morphological characteristics are analyzed by Gram stain. However, in our experience this method doesn't discriminate nor the low-growth contaminants nor the *E. coli* like bacteria. For this reason we studied the most common contaminants of the lab and designed a strategy for the verification of the purity of the banks, the viability and the phenotypic attributes. This procedure combine several methods and identification criteria, such as: a) the use of selective and different culture media, b) the use of track dilution sowing method, c) the phenotypic verification, and d) the Polymerase Chain Reaction (PCR), which is able to detect one contaminant in a 10^9 cfu/mL *E. coli* liquid culture. This strategy let us a fast and secure characterization of *E. coli* K12 strains banks with a minimum of resources.

Keywords: *E. coli* verification, single method purity, bacterial purity

Introducción

Los investigadores en los institutos que se dedican a la manipulación de genes, tienen colecciones relativamente grandes de cepas de *E. coli* K12 que se utilizan en el estudio molecular o como hospederos en la expresión de proteínas recombinantes. Diferentes casas comerciales y colecciones comercializan estas cepas o son obtenidas en el propio laboratorio [1, 2, 3].

Para el investigador es importante establecer una estrategia que garantice la calidad de sus bancos de trabajo (BCT) que se confeccionan a partir de réplicas de las cepas comerciales o de bancos primarios que se obtienen en el laboratorio. De la calidad de estos bancos depende en gran medida la calidad de la investigación.

La completa caracterización de los bancos primarios y BCT en las colecciones incluye diferentes procedimientos, entre los que se encuentran métodos de detección bioquímicos, moleculares y microbiológicos, acompañados de métodos de microscopía [4].

El chequeo de bancos de células procariotas en general se basa en la identidad, pureza del cultivo y estabilidad genética. La confirmación de la identidad como especie y del genotipo-fenotipo puede incluir: análisis del crecimiento en medios selectivos, requerimientos nutricionales, resistencia a antibióticos y caracterización bioquímica; porcentaje de células que portan el plásmido de interés; número de copias del plásmido; secuencia de ADN plasmídica y caracterización de los mismos por restricción. La pureza se determina mediante la demostración de la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos; la estabilidad genética se comprueba comúnmente por verificación de mutaciones listadas en los fenotipos [4].

Colecciones conocidas como la Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms (BCCM) garantiza una confiable identificación y caracteriza-

1. Catálogo de cultivos. Bacterias. Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms. BCCM. Bélgica;2000.

2. Catálogo American Type Culture Collection. ATCC. USA;2000.

3. Catálogo Life science Promega. USA; 2002.

4. Hill LR, Kirsop BE. Bacteria. New York: Cambridge University Press;1991.

ción de las cepas que comercializan, usan un extenso número de análisis fenotípicos tales como: reacciones bioquímicas, patrones electroforéticos de proteínas celulares, determinación de poliaminas, perfiles de residuos de aminoácidos celulares, entre otros. Análisis genotípicos tales como: determinación del porcentaje de G+C, análisis de la secuencia de ADNr 16S, hibridación de ADN con ADN de referencia; y métodos de ADN finger printing [1].

Todas estas evaluaciones llevan a una caracterización de la cepa de interés pero sería muy trabajoso realizarlas en cada laboratorio por los investigadores que utilizan el microorganismo. Por otra parte, en la extensión y la confección del BCT a partir del original se pueden introducir una serie de contaminantes que pueden provenir del ambiente del laboratorio o de problemas de esterilización de los medios de cultivos.

Mientras las colecciones realizan extensas verificaciones para garantizar la calidad de las cepas que comercializan; no se han descrito métodos de verificación de bancos de trabajo confeccionados en el laboratorio por el propio investigador. Contar con un método que permita un criterio de la pureza de forma rápida y confiable, le daría la posibilidad al investigador de descartar con un mínimo de tiempo y manipulación la presencia de contaminantes introducidos en la replicación de los bancos.

La pureza microbiológica es un valor relativo a la sensibilidad de los métodos que se utilizan por lo que es importante descartar contaminantes de especies relacionadas que pueden encontrarse en una baja concentración.

Los autores monitorearon los contaminantes ambientales en el laboratorio, se incluyeron también muestras del agua. A partir del conocimiento de los contaminantes, se diseñó una estrategia rápida de control de la pureza que combinó la verificación de propiedades generales y específicas de las cepas.

La metodología se basa en el empleo de placas con medios de cultivos indicadores y generales que se emplean con otros fines en microbiología clínica [5, 6].

El método combina además el procedimiento de siembra en forma de trazas de la dilución [7] donde pueden inocularse seis cepas diferentes en cada placa; lo que disminuye la manipulación y el costo de los controles. Se utilizó también el método de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) mediante el cual se autentifica el serotipo K12 de las cepas [8]. La estrategia de trabajo que se estableció para la verificación de los bancos permitió la caracterización y el control de un gran número de cepas con el empleo de un mínimo de tiempo y manipulación.

Materiales y métodos

Material biológico

Las bancos que se utilizaron son todos de *E. coli* serotipo K12, obtenidos de la Colección Central de Microorganismos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, Cuba, las características genotípicas de las cepas se describen en la tabla 1.

Para la siembra se emplearon placas Petri de cristal redondas de 100 mm de diámetro.

Tabla 1. Cepas de *Escherichia coli* que se utilizan comúnmente en los trabajos de clonaje y/o expresión de genes

Cepa	Similar	Genotipo	Referencia
CMIB0002	BJ5183	F ⁻ , <i>endA</i> , <i>sbcB</i> , <i>recBC</i> , <i>galK</i> , <i>met</i> , <i>str^r</i> , <i>thi-1</i> , <i>bioT</i> , <i>hsdR</i> , F	14
CMIB0007	C600	F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>supE44</i>	16
CMIB0008	C600Hfl	Hfl, <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA21</i> , <i>supE44</i>	17
CMIB0010	DH5 α	[F' <i>f80d lacZDM15</i>], <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> , I ⁻	12
CMIB0013	GC366	[F' <i>lac^q</i> , <i>lacZDM15 proAB</i>] <i>dam13::Tn9 D(lac-pro)</i>	18
CMIB0014	HB101	F ⁻ <i>hsdS20</i> (<i>r_B</i> : <i>m_B</i>) <i>supE44 recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	19
CMIB0016	JM101	[F ⁻ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac^qZDM15</i>], <i>thi</i> , <i>D(lac-proAB)</i> , <i>supE</i>	20
CMIB0018	JM109	[F ⁻ , <i>traD6</i> , <i>proAB</i> , <i>lac^qZDM15</i>] <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-</i> , <i>mk+</i>) <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>D(lac-proAB)</i> ,	20
CMIB0019	LE 392	F ⁻ , <i>supF</i> , <i>supE</i> , <i>hsdR</i> , <i>galK2</i> , <i>trpR</i> , <i>metB1</i> , <i>lacY1</i> , <i>tonA</i> , <i>hsdR</i>	21
CMIB0021	MC1061	F ⁻ , <i>D(ara-leu)7696</i> , <i>araD139</i> , <i>DlacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>hsdR</i> , <i>rpsL</i>	12
CMIB0029	RRI	F ⁻ <i>hsdS20</i> (<i>r_B</i> : <i>m_B</i>) <i>supE44 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	15
CMIB0030	TG-1	[F ⁻ , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac^qZDM15</i>], <i>thi</i> , <i>D(lac-proAB)</i> , <i>supE</i> , <i>hsdS</i> .	12
CMIB0031	W3110	F ⁻ , <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> in (<i>rrnD-rrnE</i>).	22
CMIB0032	W3110 trpA905	F ⁻ , <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> in (<i>rrnD-rrnE</i>), <i>trpA905</i>	23
CMIB0035	XL-1 Blue	[F ⁻ , <i>proAB</i> , <i>lac^qZDM15</i> , <i>Tn10</i>], <i>endA</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> .	24

Obtención de microorganismos ambientales

Para el muestreo ambiental se escogieron 24 sitios diferentes en un laboratorio de 50 m². Las superficies se hisoparon y se sembró por descarga directa en las placas con medios agarizados diseñados para el aislamiento de hongos y bacterias.

Para el control de las pruebas bioquímicas se usaron las cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Escherichia coli* W3110.

Para el aislamiento de las bacterias se empleó el ATS (Biocen, Cuba), se clasificaron según sus características culturales y se realizó tinción de Gram [9, 10]. En el caso de los hongos se utilizó el Agar Glucosa Saboureaud (Merck, Alemania). Para la identificación se prepararon frescos de cada cultivo y fueron observados al microscopio óptico, la clasificación se hizo según Deschesnes [11].

Para la clasificación de los aislamientos y la realización de pruebas complementarias se utilizaron los medios Caldo Cerebro Corazón (Biocen, Cuba), Agar Manitol Sal (Merck, Alemania), Agar Nutriente (Merck, Alemania), Agar Vogel-Johnson (Biocen, Cuba), Agar Citrato de Simons (Oxoid, Inglaterra), Medio de Hugh Leifson (Merck, Alemania), Agar Almidón (Biocen, Cuba), Agar Kligler (Biocen, Cuba), Agar Mac Conkey (Biocen, Cuba), Agar Base Sangre (Biocen, Cuba). En todos los casos los medios se prepararon según las instrucciones del fabricante [5, 6].

Verificación de la pureza microbiológica

Para la verificación de las cepas se utilizaron los medios Luria-Bertani (LB) que se preparó según describe Sambrook y colaboradores [12], medio Agar Mac Conkey No.3, Agar Eosina Azul de Metileno, Agar Citrato de Simmons y ATS que se prepararon según las recomendaciones del fabricante [5, 6].

El medio mínimo M9 se preparó según Sambrook y colaboradores [12] y se confeccionaron placas de M9

5. Catálogo de medios de cultivo. Merck, Alemania;1999.

6. Catálogo de medios de cultivo. Centro Nacional de Biopreparados. Cuba;2001.

7. Pérez-Reytor DC, Domínguez I, Sosa AE. Evaluación del método de siembra en placa "traza de la dilución" en el control de calidad de bancos de *Escherichia coli* K12. Biotecnología Aplicada 2002;19:169-73.

8. Kuhnert P, Nicolet J. Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* Strains. Appl and Environ Microbiol;1995; 61:4135-9.

9. Cowan ST, Steel KJ. Manual for the identification of medical bacteria. 3ra. edition. New York:Cambridge University Press;1993.

10. Bergey, Holt JG, Krieg NR, Sneath P, Bergy D. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9na. edition. USA;1994.

11. Pamela D Deschesnes. Environmental monitoring of viables: surface testing, the program and its application. Wyeth-Ayerst laboratories, Inc. USA;1990.p.79-82.

12. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ra. edition. Cold Spring Harbor: Ed Cold Spring Harbor University Press;2000.

13. Kuneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina;1992.

14. Hanahan D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmid. J Mol Biol 1983; 166:557-80.

15. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Ed Cold Spring Harbor University Press;1982.

+ glucosa, M9 + lactosa, M9 + xilosa, M9 + arabinosa, M9 + manitol, todas a una concentración de 0,2 %.

Verificación de la viabilidad de los bancos

Para la verificación de la viabilidad de los bancos se hicieron diluciones seriadas de 10^1 hasta 10^6 en solución salina (NaCl 0,9 %) y se sembraron en medio LB según el método descrito por Pérez-Reytor y colaboradores [7]. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h, después de este tiempo las colonias fueron contadas. El número de viables se definió como la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) contadas en cada traza multiplicado por 100 y por la dilución para definir las como ufc/mL.

Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN cromosomal se purificó según Sambrook y colaboradores [12]. Para la cuantificación del ADN se hicieron diluciones de la muestra en H₂O hasta 10^2 . La muestra se resolvió en un gel de agarosa al 0,8 % por electroforesis sumergida. Se utilizó un sistema tampón Tris Borato a un voltaje constante de 120 V.

Para la verificación del serotipo K12 de *E. coli* se utilizó la técnica PCR. [8]. Se utilizaron un primer par de oligos que amplifican una región del *orf264* (K12-R 5'ATCCTGCGCACCAATCAACAA 3') y (K12-L 5'TTCCACGGACATGAAGACTACA 3) y un segundo par de oligos que amplifican una zona típica del serotipo K12 de *E. coli* correspondiente al elemento de inserción IS5 que incluye el K12-R y (K12IS-L 5'CGCGATGGAAGATGCTCTGTA 3')

Como control del PCR se utilizó un tercer par de oligos que amplifican el gen *pal* que codifica para una lipoproteína asociada al peptidoglicano. Este gen es conservado en *E. coli* y común en las enterobacterias. (Ecpal-L 5'GGCAATTGCGGCATGTTCTTCC 3'; Ecpal-R 5'CCGCGTGACCTTCTACGGTGAC 3')

Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 3 min a 94 °C seguidos por 35 ciclos a 94 °C de 30 seg y 72 °C durante 1,5 min. Los productos del PCR se analizaron mediante electroforesis sumergida en gel de agarosa al 0,8 % con bromuro de etidio (10 mg/mL).

Verificación de fenotipos de vías sintéticas, degradativas y resistencia a antibióticos

De los bancos de trabajo de las cepas se hicieron diluciones seriadas desde 10^1 hasta 10^6 en solución salina (NaCl 0,9 %) y se sembraron por el método traza de la dilución modificado [7] en medio LB al cual se le adicionó cloranfenicol o estreptomina a 25 mg/mL. En el caso de los controles auxotróficos al medio M9 se le adicionó glucosa al 0,1 % y metionina, leucina, prolina, tiamina y triptofano, según el genotipo de la cepa a verificar cada uno a 25 mg/mL. Para el control de los marcadores catabólicos se utilizó el medio M9 suplementado con los aminoácidos de auxotrofia según la cepa a verificar y arabinosa, xilosa y manitol en todos los casos al 0,1%. Para el chequeo de los mutantes de vías degradativas de galactosa y lactosa se utilizó medio MacConkey No.3. Los medios utilizados para el control se describen en la tabla 2. Las cepas se sembraron por triplicado.

Verificación de la pureza de los bancos

Para la verificación de la pureza se utilizó el método convencional. De cada una de las cepas se tomaron viales de los bancos directamente del congelador y

Tabla 2. Combinación de medios empleados para la verificación fenotípica de cepas de *E. coli*

Medio	Cepas sembradas
M9 + glu	W3110, W3110 trpA905, XL-1 Blue, RRI, HB101, JM101, JM109, TG-1, DH5 α , C600, C600 Hfl, BJ5183, GC366, LE392, MC1061
M9 + glu + trp	W3110 trp905
M9 + glu + thi	GC366, JM101, JM109, XL-1 Blue, C600, C600 Hfl, RRI, TG1, DH5 α , HB101, BJ5183
M9 + glu + met	GC366, LE392, BJ5183
M9 + glu + met + thi	BJ5183
M9 + glu + pro	GC366, RRI, HB101
M9 + glu + leu	C600, C600Hfr, HB101, MC1061, RRI
M9 + glu + pro + leu	GC366, RRI y HB101
M9 + glu + pro + leu + thi	HB101
M9 + glu + thi + leu	C600, C600Hfl
M9 + gal + met	GC366, LE392, BJ5183
M9 + gal + pro + leu	GC366, RRI, HB101, MC1061
M9 + gal + thi	BJ5183
M9 + gal + thi + met	BJ5183
M9 + gal + leu	MC1061
M9 + ara + leu	MC1061
M9 + ara + pro + leu	GC366, RRI, HB101, MC1061
M9 + xil + pro + leu	GC366, RRI y HB101
M9 + mtl + pro + leu	GC366, RRI y HB101

se hicieron diluciones seriadas en solución salina hasta 10^6 , se sembraron por el método de trazas de dilución modificado [7] y por extensión [4] en placas que contenían los medios de cultivos Agar Citrato de Simmons, Agar Mac Conkey, Eosina Azul de Metileno, Agar Triptona Soya (ATS) y Medio Salino M9. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h. Las colonias se contaron, se le realizó tinción de Gram según describió Kuneman y colaboradores [13] y se analizaron por inspección visual al microscopio estereoscópico.

Procesamiento de los datos

Todos los experimentos se realizaron a partir del mismo banco de cepas. De cada experimento se hicieron tres réplicas. Para el análisis de los métodos de control de pureza se comparó la media, la desviación estándar y se calculó la relación de contaminantes por cada muestra a partir de la diferencia en la promoción de los medios.

Resultados y Discusión

Las cepas de *E. coli* K12 son muy empleadas en la investigación biotecnológica por lo que son comúnmente utilizadas en muchos institutos y centros dedicados a la investigación molecular.

Por lo general, estas cepas son mutantes comercializados por diferentes colecciones. Cuando se adquiere

16. Huynh T, Young RA, Davis R. Constructing and Screening cDNA Libraries. DNA Cloning, Oxford, UK: IRL Press Ltd; 1985:1-49.

17. Woodcock DM, Croether PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, et al. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinant. Nucl Acid Res 1989;17:3469-78.

18. Carlioz A, Touati D. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*. Is superoxide dismutase necessary for aerobic life? EMBO J 1986; 5:623-30.

19. Lacks S, Greenberg B. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. J Mol Biol 1977; 114:153-68.

20. Yanish-Perron C, Viera J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 1985;33:103-99.

21. Murray NE, Brammar WJ, Murray K. Lamphoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol Gen Genet 1977;150:53-61.

el vial que contiene la cepa se hace necesario la elaboración de un banco de trabajo que permita conservar el microorganismo durante el tiempo que dura la investigación. No se han descrito métodos de verificación de los bancos confeccionados por el propio investigador y que brinde la posibilidad de descartar con un mínimo de tiempo y manipulación la presencia de contaminantes introducidos en la replicación de los mismos.

Identificación de cepas ambientales

Para diseñar un método rápido de verificación de los bancos de trabajo de *E. coli* se monitoreó el ambiente de laboratorio y de los pasillos externos. De esta forma se identificaron los microorganismos más frecuentes dentro y fuera el ambiente de trabajo.

Los aislamientos se realizaron por hisopaje y la identificación se hizo teniendo en cuenta los caracteres culturales, morfológicos y bioquímicas de los mismos. Finalmente se verificó la distribución de los microorganismos ambientales y se siguieron diferentes criterios de clasificación taxonómicas [9,10,11]. La estrategia y el esquema de trabajo que se utilizaron para la identificación de los aislamientos se esquematiza en la figura 1.

En los pasillos de circulación se aislaron bacterias pertenecientes a las especies: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus subtilis*, *Chysemonas luteola*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Micrococcus kristinae*, *Micrococcus lylae*, No fermentadores, *Aerococcus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Pseudomonas maltophilia*, que son microorganismos comunes en ambientes cerrados. Las cepas que se identificaron son en su mayoría citrato positiva.

Los hongos aislados se encontraron asociados principalmente a los conductos de ventilación, en el ambiente de mayor tráfico de personal. Según las características culturales y por observación al microscopio los aislamientos pertenecen en todos los caso a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

Debido a la certeza de posibles contaminantes que no son detectables por los procedimientos que se emplean de rutina en el laboratorio, se probaron medios selectivos que dieran criterio de diferenciación.

Para esto se utilizaron medios indicadores donde la *E. coli* puede crecer con características que la diferencie de otros microorganismos como el Mac Conkey o donde se inhibe su crecimiento como el Citrato de Simmons.

Evaluación de medios de cultivo empleados en la clínica

Uno de los medios que se evaluó fue el Agar Mac Conkey que comúnmente se emplea en la clínica para el aislamiento de bacterias coliformes de muestras de orina y de heces fecales. Las colonias de *E. coli* en este medio presentan una coloración rosado intenso debida a su habilidad de fermentar la lactosa y acidificar el entorno alrededor de la colonia lo que ocasiona el viraje al rojo de un indicador de pH presente en el medio.

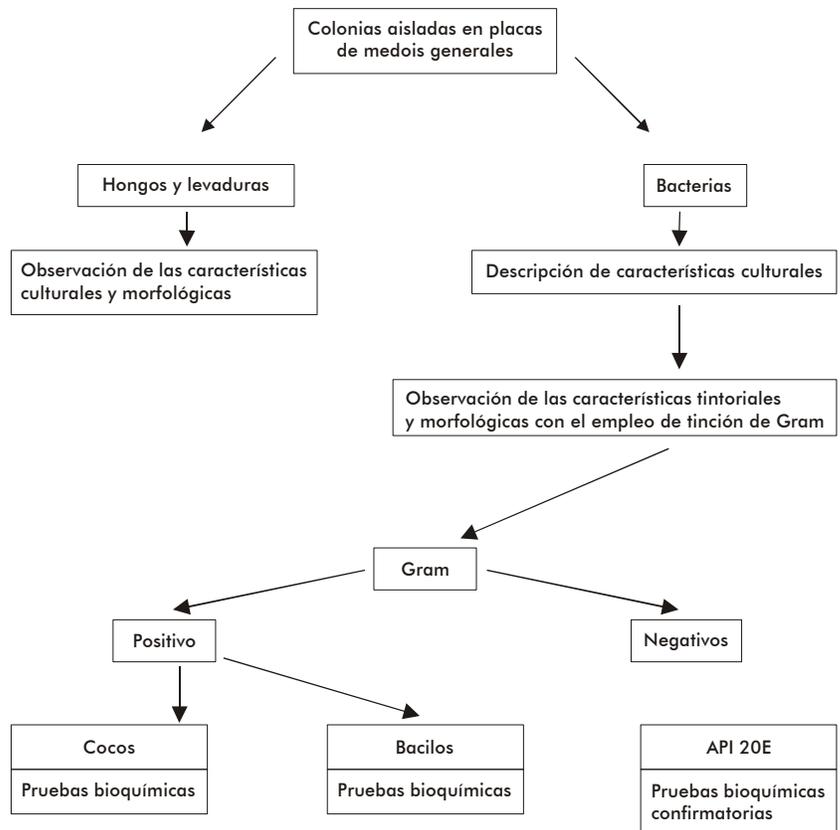


Figura 1. Estrategia para la identificación de aislamientos ambientales

Además otra característica típica es la aparición de un halo turbio alrededor de la colonia debido a la precipitación de las sales biliares.

La mayoría de las cepas que se utilizaron en la investigación molecular fueron mutantes Lac⁻ por lo que en este medio el fenotipo no coincidió con el esperado para *E. coli*. Las colonias de los mutantes se observan de un tono naranja y con el halo turbio. La aparición de colonias rojas en la placa indicó la presencia de otros coliformes contaminantes. La presencia de sales biliares y violeta cristal en este medio inhibió los gérmenes Gram positivos, de forma que se tomó como criterio de contaminantes Gram negativos, fundamentalmente coliformes que pudieran provenir de la manipulación o de fallos en la esterilización.

Otro medio que fue evaluado fue el Eosina Azul de Metileno el cual se emplea para el aislamiento de enterobacterias. La selección de *E. coli* en este medio se basa también en su habilidad de fermentar lactosa pero emplea colorantes diferentes que el Mac Conkey y no inhibe el crecimiento de los gérmenes Gram positivos por lo que complementa los resultados al ser comparados con este otro medio. Este permitió descartar la presencia de contaminantes de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.

El medio Agar Citrato de Simmons se utilizó para diferenciar entre *E. coli*, que no utiliza el citrato como fuente de carbono de cualquier otro microorganismo citrato positivo como: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*.

22. Hill CW, Harnish BW. Transposition of a chromosomal segment bounded by redundant rRNA genes in *Escherichia coli*. J Bacteriology 1982;149:449-57.

23. McKane M, Milkman R. Transduction, restriction and recombination patterns in *Escherichia coli*. Genetics 1995;139:35-43.

24. Maurizi MR, Trisler P, Gottesman S. Insertional mutagenesis of the lon gene in *Escherichia coli*: lon is dispensable. J Bacteriol 1985;164:1124-35.

Muchas de las cepas de *E. coli* son mutantes auxotróficos o sea que no tiene la habilidad de crecer en un medio salino. El chequeo fenotípico en el medio mínimo M9 también se empleó como criterio de pureza de los bancos. Todas las combinaciones de aminoácidos correspondientes a cada cepa se emplearon para elaborar placas donde la cepa no debía crecer, esto indicó la presencia de contaminación o en algunos casos de una posible aparición de revertantes de los marcadores genéticos.

La combinación de medios indicadores dio un criterio del grado de contaminación de la muestra y diferenció el contaminante con relación a la *E. coli* en cuanto a inhibición de crecimiento, utilización de fuente de carbono, morfología y color de la colonia (Fig. 2).

El medio ATS se tomó como el 100 % de los microorganismos presentes en la muestra mientras que los medios Agar Eosina Azul de Metileno y Agar Mac Conkey permitieron diferenciar las colonias por color. El Mac Conkey dio un criterio adicional de presencia de Gram positivos al comparar el número de viables en este medio con los crecidos en ATS. El medio Agar Citrato de Simmons en el cual *E. coli* no debe crecer, permitió detectar la presencia de contaminantes citrato positivos presentes en la muestra.

Para tener un criterio de crecimiento de la *E. coli* K12 en los diferentes medios se evaluó promoción con relación a la cepa W3110, el medio ATS se tomó como el 100 % y se comparó el número de viables de una siembra cultivada por 12 h sobre la superficie del resto de los medios. La promoción de esta cepa a las 24 h del cultivo fue en Eosina Azul de Metileno 95 %, medio M9 98 % y Agar Mac Conkey 94 %.

Como control adicional se cultivaron los contaminantes encontrados en los medios evaluados para definir las características de crecimiento de las colonias (Tabla 3).

La diferencia en la promoción de los medios y las características de crecimientos de los contaminantes

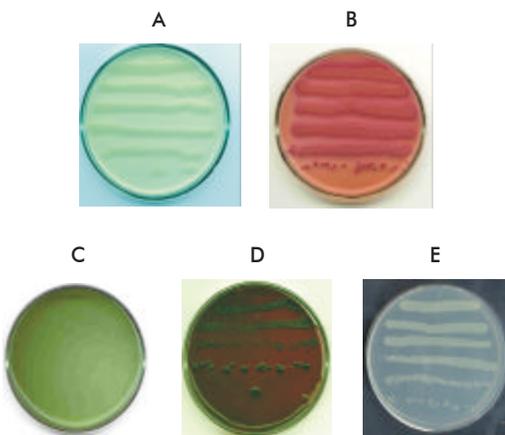


Figura 2. Método directo aplicado a la determinación de pureza microbiológica de un banco de la cepa de *E. coli* K12 W3110. En todos los casos se sembraron por traza 10 µL de las diluciones 10⁻¹-10⁻⁶ en placas que contienen medios A) Agar Tripton Soya, B) Agar McConkey, C) Agar Citrato de Simmons, D) Agar Eosina Azul de Metileno, E) Medio mínimo M9 al cual se adicionó 0,2% de glucosa.

Tabla 3. Crecimiento de diferentes especies microbianas que pueden encontrarse como contaminantes en cultivos de *E. coli*.

Medio	Características	Aislamientos
TSA	Colonias grandes de borde regular, color cremas.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Chysemomonas luteola</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aerococcus</i>
	Colonias cremas y pigmentadas	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Micrococcus lylae</i>
	Colonias amarillas	<i>Micrococcus kristinae</i>
	Colonias doradas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
MacConkey	Colonias rosa intenso	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i>
	Colonias semitransparentes a incoloras de borde regulares	<i>Flavimonas oryzihabitans</i> , <i>Pseudomona fluorescens</i> , <i>Pseudomonas maltophilia</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i>
	Colonias rosa claro	<i>Serratia marcescens</i>
Eosina Azul de Metileno	Colonias violetas con brillo verde metálico	<i>Escherichia coli</i>
	Colonias violetas con centro oscuro	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	Crecimiento débil a nulo con colonias incoloras y puntuales	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , no fermentadores
	Colonias rosa claro	<i>Serratia marcescens</i>
M9	Colonias blancas	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Flavimonas oryzihabitans</i> , <i>Micrococcus kristinae</i> , <i>Micrococcus lylae</i> , No fermentadores, <i>Aerococcus</i> , <i>Pseudomona fluorescens</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> y <i>Pseudomonas maltophilia</i>
	Crecimiento con cambio de coloración del medio a azul	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Chysemomonas luteola</i> , <i>Flavimonas oryzihabitans</i> , <i>Pseudomona fluorescens</i>
Citrato de Simmons	Medio sin cambio de color (crecimiento inhibido)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas maltophilia</i> , no fermentadores

hizo necesario probar diferentes diluciones de la muestra en cada medio seleccionado.

Evaluación del método de siembra

Se observó que existían contaminantes que sólo eran visibles cuando un banco contaminado se cultivaba a diluciones de 10³ UFC/mL y no a menores diluciones. Tal es el caso de las especies relacionadas con *Pseudomonas*, se supone que esto se deba a que al estar mezcladas con *E. coli* que es un microorganismo de crecimiento rápido y productor de ácido, el pH en la vecindad de la colonia inhiba su crecimiento (Fig. 3).

Para no perder sensibilidad y mantener las ventajas de poco gasto de materiales y la menor manipulación posible, se incluyó en la metodología la forma de siembra en placa de traza de la dilución modificado [7] lo cual permitió sembrar seis diluciones en cada placa.

Otro aspecto evaluado fue la siembra directa del vial de conservación y la comparación de los resultados con los obtenidos al cultivar del banco de trabajo a 28 °C por 24 h. Esto es una técnica frecuentemente utilizada para enriquecer el contaminante con relación a la *E. coli*.

Se utilizó una temperatura de incubación donde la velocidad de crecimiento de la *E. coli* fue menor y

medio Caldo Triptona Soya y se pudo observar que no había diferencias con el resultado que se obtuvo al sembrar las diluciones del cultivo o hechas directamente del banco sobre medio ATS. Sin embargo, cuando se sembraron en las placas de medios indicadores seleccionados en este estudio con las diluciones hechas directamente del banco, se comprobó la presencia de contaminantes que no se observaron cuando se propagó el cultivo en medio líquido.

En el momento de verificar un banco no se conoce la posible naturaleza de los contaminantes por lo que es muy difícil tener un criterio de selección de un buen medio de cultivo que favorezca el crecimiento del contaminante y limite el crecimiento de *E. coli*.

Validación del método propuesto

Para validar el método propuesto, se evaluaron 15 bancos de distintas cepas de *E. coli* con diferentes tiempos de conservación y que habían sido liberados como puros por observación al microscopio después de tinción de Gram y por criterio de morfología y apariencia de las colonias en medio ATS. A estos bancos también se les había controlado el fenotipo en placas de medio M9.

Para la verificación se tomó una muestra directamente del bulbo de conservación y se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , estas se sembraron en los medios Mac Conkey, Citrato de Simmons, Eosina Azul de Metileno, ATS y M9 como se describe en el acápite Materiales y Métodos, a esta técnica se le llamó *Método Directo* ya que se obtienen los resultados directamente del vial de conservación después de 24 h de cultivo.

De los bancos ensayados, en un 50 % se encontraron contaminantes en una proporción muy baja 1×10^7 células de *E. coli*, todos citrato positivos y con la habilidad de crecer en medio M9.

La incubación de las placas hasta 72 h después de sembradas no dio ninguna diferencia con las incubadas por 24 h.

Verificación del serotipo K12 mediante la técnica de PCR

De las 15 cepas analizadas una es protótrofa, esta fue evaluada adicionalmente mediante PCR para comprobar su serotipo K12 ya que no se puede discriminar si corresponde a una *E. coli* salvaje contaminante o a la cepa de interés. Para esto se partió de una simple colonia en una placa y se procedió como se describe en el acápite de Materiales y Métodos. Como control del PCR se utilizó una *E. coli* aislada de aguas residuales que solo amplifica la banda perteneciente al gen *pal* conservado en enterobacterias y una W3110 recombinante utilizada en la producción de estreptoquinasa recombinante. (Fig. 4).

Las cepas K12 son consideradas seguras para el trabajador y se incluyen en el grupo de riesgo 1, sin embargo, dentro de los coliformes contaminantes algunas cepas son clasificadas dentro del grupo 2 de riesgo ya que pueden provocar enfermedades en el hombre o los animales. Por lo que se consideró que la verificación del serotipo es además un elemento de seguridad para garantizar no propagar involuntariamente posibles cepas patógenas durante la manipulación de rutina en el laboratorio.

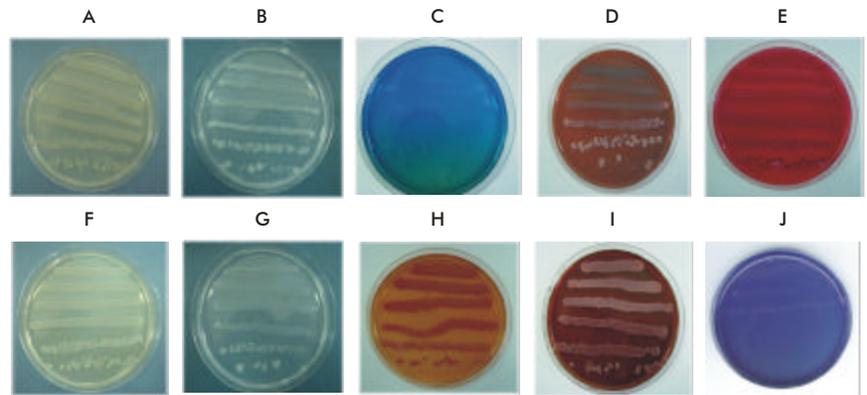


Figura 3. Crecimiento en placa de las cepas W3110 (parte superior) y XL-1 Blue (parte inferior) contaminadas intencionalmente con *Enterobacter aerogenes* en una proporción 10:1 respectivamente. En todas las placas se sembraron por traza $10 \mu\text{L}$ de las diluciones 10^{-1} - 10^{-6} . Los medios utilizados fueron AF) Agar triptona soya, BG) medio M9 suplementado con tiamina, CH) medio Agar McConkey, DI) Eosina azul de metileno y EJ) Citrato de Simmons.

Para validar el método y comprobar que en el caso de mutantes es suficiente el criterio de crecimiento en placas de medios indicadores y medio mínimo el resto de los bancos se verificaron por PCR [8]. De las cepas verificadas, todas amplificaron las tres bandas correspondiente al *orf264*, al elemento de inserción IS5 y al gen *pal*. El hecho de que la metodología de PCR sea muy sensible hace que se deba combinar con metodologías de siembra en placas que permiten demostrar la presencia de contaminantes.

Como conclusiones de este trabajo se implementó una nueva estrategia de chequeo rápido para la verificación de la pureza de los bancos de *E. coli* basada en: análisis del serotipo K12 de las cepas mediante PCR; evaluación de la pureza por el *Método Directo*; chequeo de auxotrofia y determinación de viables. Esta estrategia permitió una mayor homogeneidad genética y garantía de pureza en los bancos de la colección del laboratorio central de microorganismos del CIGB.

La técnica de PCR como primer criterio de pureza de los bancos de *E. coli* permitió hacer una determinación del serotipo K12. El *Método Directo* de determi-

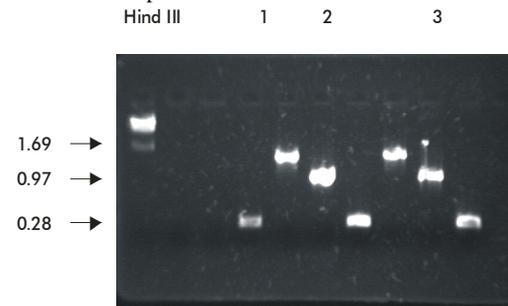


Figura 4. PCR que identifica la presencia de *E. coli* K12. Patrón de peso molecular HindIII; 1, *Escherichia coli* aislada de aguas residuales; 2, W3110 CMIB0031; 3, W3110 producción de SK recombinante. El fragmento de 0,97 kb resulta de la amplificación del elemento de inserción IS5 con los oligonucleótidos K12-R-K12IS-L; la amplificación perteneciente al gen *orf264* resulta en la banda de 1,69 kb; la amplificación del gen *pal* típico de enterobacterias con los oligonucleótidos ECPAL-L – ECPAL-R resulta en una banda de 0,28 kb.

nación de pureza permitió: detectar contaminantes a bajas concentraciones y contaminación con especies muy relacionadas semejantes en las características culturales, una mayor homogeneidad de los resultados al sembrar todas las diluciones en una misma placa, cuantificar la contaminación, seleccionar el medio donde la cepa se observó más pura para lograr un aislamiento en caso necesario, reducir el número de materiales a utilizar y la manipulación sobre la muestra. A pesar de que este procedimiento es más rápido resultó ser mucho más sensible que el método convencional de crecimiento en placas de medio no selectivos y tinción

de Gram. El procedimiento permitió detectar si existía contaminación con especies muy relacionadas, se logró discriminar entre cepas pertenecientes a una misma especie al tratarse de mutantes que dan un fenotipo específico y permitió la cuantificación de la contaminación al aparecer esta en diluciones determinadas. El método tiene como desventaja la utilización de la PCR con algunas cepas, este método es costoso, requiere de equipamiento y no es utilizable en cepas con otro serotipo, sin embargo, solo es necesario su empleo como confirmación cuando la cepa de *E. coli* K12 analizada es protótrofa.

Recibido en enero de 2003. Aprobado en octubre de 2003.