

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL BACTERIÓFAGO ΦITL-1 EN CULTIVO CONTINUO EN DOS ETAPAS.

Julio César Cedillo, José Luis Mendoza, Jesús Hernández, María Inés Chávez. Universidad Politécnica del Estado de Morelos, Ingeniería en Biotecnología, Jiutepec, Morelos. C.P. 62550, mchavez@upemor.edu.mx

Palabras clave: Ralstonia solanacearum, fagoterapia, cultivo continuo.

Introducción. *Ralstonia solanacearum* es una bacteria fitopatógena que infecta a más de 200 especies de plantas, incluidas entre ellas algunas de importancia comercial como el jitomate, la papa, el chile y el tabaco; provocando pérdidas económicas importantes (1). Dada la necesidad del desarrollo de métodos de control sustentable de enfermedades, aunado al aumento alarmante de la resistencia de las bacterias a los antibióticos; el interés por la fagoterapia ha ido en aumento y, por lo tanto, también la necesidad para la producción a gran escala de los bacteriófagos (2). Algunas ventajas del uso de estos virus sobre los antibióticos es que son específicos por hospedero que infectan, se autoamplifican y presentan baja toxicidad para los humanos (3).

En nuestro grupo de investigación se está trabajando en el aislamiento, caracterización y producción de bacteriófagos para atacar distintas especies bacterianas patógenas. El objetivo del presente trabajo es optimizar la producción de bacteriófagos en un cultivo continuo en dos etapas empleando como modelo el bacteriófago ΦITL-1.

Metodología.

Condiciones de cultivo. Todos los experimentos se llevaron a cabo en medio mínimo mineral empleando 2g/L de glucosa como única fuente de carbono. Todas las cinéticas se llevaron a cabo en condiciones aerobias, empleando 300 rpm, 0.35VVM y 30°C. Los cultivos se llevaron a cabo en un biorreactor Biostat A (Sartorius).

Cultivo por lotes. Se realizaron cinéticas de crecimiento de *R. solanacearum* sin infectar para determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de la bacteria. Además, se llevaron a cabo cinéticas infección para evaluar la producción del bacteriófago en cultivo por lote, utilizando 3 multiplicidades de infección (MOI): 0.01, 0.1 y 1. El título viral se determinó contando las unidades formadoras de placa (PFU) empleando una modificación de la técnica de vertido en placa. La concentración bacteriana se determinó cuantificando peso seco, unidades formadoras de colonias (UFC) y absorbancia a 600 nm.

Cultivo continuo: se llevó a cabo un cultivo continuo en dos etapas. En el primer tanque se creció a *R. solanacearum* en MMG con un volumen de trabajo de 1.5L. Este biorreactor se operó a la tasa de dilución óptima calculada con la ecuación (4):

$$D_{opt} = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{k_s}{k_s + S_0}} \right)$$

En el segundo reactor se llevó a cabo la infección para amplificar el bacteriófago ΦITL-1, volumen de trabajo de 4 L. En este tanque se añadió un pulso inicial de una solución madre de bacteriófagos para iniciar con una MOI de 0.1.

Resultados.

Se obtuvieron parámetros cinéticos y estequiométricos de *R. solanacearum* y del bacteriófago ΦITL-1. *R. solanacearum* creció con una μ_{max} de 0.14 h⁻¹, y un rendimiento ($Y_{x/s}$) 0.31 g/g. La producción del bacteriófago en cultivo en lote a las diferentes MOI evaluadas se muestra en la **tabla 1**. En las cinéticas de infección por lotes se obtuvo un título viral máximo a las 12 h.

Tabla 1. Títulos virales obtenidos en cultivo en lote a diferentes MOI

MOI evaluada	Título viral máximo obtenido (PFU's/mL)	Productividad volumétrica (PFU/LH)
0.01	3.73 x 10 ⁸	3.08 x 10 ⁷
0.1	3.25 x 10 ⁸	3.66 x 10 ⁷
1	6.03 x 10 ⁸	5.02 x 10 ⁷

En el caso del cultivo continuo en dos etapas, en el primer tanque se operó a D de 0.12 h⁻¹, evaluándose 5 tasas de dilución en el 2º tanque, mayores a la velocidad de muerte ($K_d = 0.11h^{-1}$) de *R. solanacearum*, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Comparación de los parámetros de producción obtenidos a diferentes velocidades de dilución.

Tasa de dilución 2º tanque (h ⁻¹)	Tiempo de residencia (h)	Rendimiento viral PFU/UFC	Productividad volumétrica PFU/LH
0.156	6.41	20.41	2.02 x 10 ⁹
0.187	5.35	2.84	5.61 x 10 ⁸
0.219	4.57	0.83	1.46 x 10 ⁸
0.281	3.56	1.68	3.09 x 10 ⁸
0.344	2.91	0.49	9.88 x 10 ⁷

Conclusiones. En cultivo en lote, a las 12 h se obtiene el máximo título viral utilizando una MOI de 0.01, con una amplificación viral de 6 órdenes de magnitud. Los datos indican que se obtiene mayor productividad volumétrica en cultivo continuo.

Agradecimientos. A CONACYT por la beca de Maestría y al proyecto PRODEP.

Bibliografía.

- Yuliar, Asi Nion Y & Toyota K, (2015) *Microbes Environ.* vol (30), No. 1, 1-11.
- Lin D, Koskella B & Lin H, (2017) *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 8(3): 162-173.
- Jurač K, Nabergoj D & Podgornik A, (2018) *Appl Microbiol Biotechnol.* 103(2):685-694.
- Doran P. (1995) *Reactor Engineering.* En: *Bioprocess Engineering Principles*, (eds) Academic press limited, Academic press Inc. p 366.
- Mendoza J. (2018) Tesis de maestría. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.

