

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**Aislamiento y Caracterización Biológica de Bacteriófagos
con Actividad Lítica sobre las Bacterias *Escherichia coli* y
*Salmonella spp***



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

TODO LO ILLUMINAN

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presentan:

Merari Dinorah Herrera Escobedo

Mónica Alejandra Trujillo Castro

Ciudad Obregón, Sonora

Noviembre 2016

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Merari Dinorah Herrera Escobedo** y **Mónica Alejandra Trujillo Castro**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



Dra. Norma Patricia Silva Beltrán
Directora de Tesis



Dra. Luz Angélica Ávila Villa
Secretario

Vocal

Dr. Cristóbal Chaidez Quiróz

Suplente

Q. F. B. Sandra Mirada Mauricio

DEDICATORIAS

A nuestros padres

Dedicamos esta tesis con mucho amor a nuestros padres Domitila Escobedo, Marcelino Herrera, Lidia Castro y Loreto Trujillo por ser una parte importante en nuestro camino, porque gracias a ellos tuvimos la oportunidad de formarnos como profesionistas y gracias a sus esfuerzos hemos podido culminar una etapa muy importante de nuestras vidas.

A mi hijo y esposo

Dedico con mucho amor y cariño esta tesis a mi hijo Ivan Eduardo Álvarez Trujillo por haber sido el motivo por el cual termine una etapa importante de mi vida. Gracias por tu paciencia en esperar los momentos en que estaba ocupada realizando mis estudios y no podía estar contigo, por brindarme su amor, su inocencia y motivarme que cuando uno tropieza en el camino hay que levantarse con la frente en alto y seguir cumpliendo mis metas. Gracias por enseñarme lo más hermoso en la vida ser madre. Te amo hijo.

A mi esposo Ivan Eduardo Álvarez Jiménez por su amor, comprensión y apoyo incondicional en todos los aspectos.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por bendecir nuestros caminos durante el transcurso de nuestra carrera, por habernos ayudado a culminar esta etapa de nuestra vida.

A la Universidad de Sonora por darnos la oportunidad de estudiar y culminar nuestra carrera.

Agradecemos incondicionalmente a nuestra directora de tesis Dra. Norma Patricia Silva por brindarnos su apoyo, creer en nosotros de poder realizar esta investigación, por su atención y paciencia durante el tiempo que realizamos nuestro proyecto.

A nuestros sinodos Dr. Cristóbal Chaidez, Dra. Angélica Ávila y Q.F.B. Sandra Miranda por su apoyo en la elaboración de nuestra tesis.

A nuestros hermanos Virginia Herrera, Berenice Herrera, Marcelino Herrera, Diana Herrera, Carlos Trujillo y Lorena Trujillo, agradecemos su apoyo que nos ayudó a culminar nuestra profesión, porque cuando ocupábamos ayuda económicamente siempre estuvieron dispuestos a apoyarnos en lo que podían. Gracias por que siempre confiaron en nuestras ganas de salir adelante y estuvieron presentes hasta donde estuvieron sus posibilidades, mil gracias.

A mis suegros Margarito Álvarez y María Jiménez agradezco su apoyo incondicional, que me brindaron durante mi profesión, por creer en mi capacidad de salir adelante y quererme como una hija.

A mi abuela Candelaria Orozco por haber creído en mí todo el tiempo, que aun que ya no esté con nosotros siempre estuvo apoyándome y dándome ánimos a seguir adelante.

A mis sobrinas Danna Trujillo, Gissell Trujillo y Alexia Trujillo por haber sido parte de mi alegría y apoyo en decirme que era su ejemplo a seguir.

A mi mejor amigo Jonathan Mendoza porque cuando tuve malos momentos de estrés siempre estuvo para sacarme una sonrisa y darme ánimos de seguir adelante.

A mi tía Elvira Escobedo por su motivación y cariño por que gracias a su ejemplo de cuando hay momentos difíciles siempre hay que salir adelante y por el amor a su trabajo que me sirvió de motivación de tomar una carrera con enfoque al área de la salud.

Al Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental CIIBA por otorgarnos el acceso a las instalaciones de éste centro y al Dr. Saúl Ruíz, quién nos permitió trabajar en el laboratorio de microbiología para la realización del presente proyecto.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. CIAD por su colaboración en el desarrollo del presente proyecto, en especial a los Doctores Osvaldo López y Cristóbal Chaidez por estar siempre atentos a nuestras dudas y brindarnos su apoyo.

Al Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en especial al Dr. Víctor Gonzales Zúñiga por darnos la oportunidad de realizar una parte muy importante de nuestro proyecto en sus instalaciones.

A nuestros amigos que nos acompañaron a lo largo de nuestra carrera Nallely Espinoza, Janeth Sañudo, Daniela Valenzuela, Christian Rodríguez, Missael López, Luis Morales, Josué Grajeda, Román Machado y Héctor Portela por su amistad y apoyo durante este proyecto.

Al encargado de laboratorio UNISON Campus Cajeme Waldo Ramírez y Ramón Valdez por sus atenciones y brindamos su apoyo durante nuestra estancia en el laboratorio.

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	2
DEDICATORIAS	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	15
REVISIÓN DE LA LITERATURA	16
Bacteriófagos	16
Ciclo del Bacteriófago.....	17
Productos Comerciales de Fagos como Agentes de Biocontrol.....	19
Fagoterapia	20
Bacteriófagos como Indicadores de Contaminación Viral	21
Virus como Indicadores de Calidad Sanitaria en el Agua	21
Calidad Microbiológica del Agua de Consumo Humano	23
Bacterias Huésped de Bacteriófagos	23
<i>Escherichia coli</i>	23
<i>Salmonella spp</i>	24
Electroforesis en la Identificación de Bacteriófagos	25
METODOLOGIA	28
Protocolo para la Obtención de Bacteriófagos a partir de Muestras Ambientales Utilizando la Técnica del Doble Agar	28
Toma de la Muestra Ambiental.....	28
Preparación de Medios.....	29
Propagación de las Cepas Hospederas	29
Preparación de la Muestra de Agua	29
Propagación y Purificación de Bacteriófagos a partir de la Muestra	30
Inoculación de Bacteria para el Doble Agar.....	31
Filtración de Muestra Enriquecida	31
Técnica de Doble Agar.....	32
Recuperación y Purificación del Bacteriófago.....	32

Protocolo para la Extracción de ADN de los Fagos	34
Protocolo para la Lectura del DNA por Electroforesis.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Aislamiento de Bacteriófagos	38
Detección de Bacteriófagos.....	38
Perfil Genómico de los Bacteriófagos	44
CONCLUSIÓN.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición de los Buffer	35
2	Digestión DNA	36
3	Enzima de restricción	36
4	Colorante	36
5	Reactivos para la electroforesis	36
6	Primer muestreo realizado al agua de riego y agua residual de los poblados del Alto de Jecopaco y Colonia Allende	39
7	Segundo muestreo realizado al agua de riego y agua residual de los poblados del Alto de Jecopaco y Colonia Allende	40
8	Tercer muestreo realizado al agua de riego y agua residual de los poblados del Alto de Jecopaco y Colonia Allende	41
9	Fagos aislados	43
10	Concentración de ADN obtenido en cada uno de los fagos aislados en muestras de agua del Valle del Yaqui	44
11	Enzimas de restricción que digirieron el ADN	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos	17
2	Esquema de los ciclos líticos y lisogénicos	18
3	Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa	26
4	Sitio de muestreo Altos de Jecopaco agua residual y de riego	28
5	Sitio de muestreo dren Allende	29
6	Preparación de la muestra para centrifugar	30
7	Bacteria enriquecida en matraces	31
8	Filtración de bacteria + muestra	31
9	Doble agar	32
10	Crecimiento de unidades formadoras de placas (UFP)	33
11	Desprendimiento de la capa suave de la superficie	33
12	Filtrado con nitrocelulosa	34
13	UFP del fago DAF1 O157	42
14	UFP del fago DJNoF O157	42
15	UFP del fago DANoF O157:H7	43
16	Electroforesis del corte de enzima de restricción (Hindi III, Eco RV y Bam HI), de los bacteriófagos Av08, DAF1, DAF2 y DJNoF en gel de agarosa	46
17	Electroforesis del corte de enzima de restricción (Hindi III, Eco RV y Eco RI), de los bacteriófagos Av08, DAF1, DAF2 y DJNoF en gel de agarosa	48
18	Electroforesis del corte de enzima de restricción (Eco RI, Bam HI, Eco RV e Hindi III), del bacteriófago DJNoF en gel de agarosa	49

RESUMEN

Los bacteriófagos o fagos son virus que parasitan bacterias y se consideran las entidades más abundantes de la biosfera. Una particularidad interesante de los bacteriófagos lo constituyen sus ciclos líticos al producir partículas virales y la subsecuente lisis celular de la bacteria que parasita. En las zonas rurales del sur de Sonora se han presentado brotes de enfermedades entéricas. Existe suficiente evidencia científica sobre la efectividad de los fagos como agentes de biocontrol, para eliminar bacterias entéricas como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Estos agentes, han sido aprobados como GRAS (Generalmente reconocido como seguro, siglas en inglés). El objetivo de esta investigación es el aislamiento y caracterización biológica de bacteriófagos líticos propios del sur de Sonora, que tengan capacidad infectiva contra *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Para el aislamiento de estos organismos se tomaron muestras ambientales de aguas residuales y de riego de las comunidades rurales del sur de Sonora (colonia Allende y Alto de Jecopaco), los fagos se replicaron en doble agar, utilizando como cepas hospederas a las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis*. La purificación de los bacteriófagos se realizó con lavados utilizando solución buffer SM [Tris-HCl, 50 mM, pH7.5; MgSO₄ · 7H₂O 8mM; NaCl, 100mM; Gelatina porcino 0.002% (p/v)] y ultracentrifugaciones. El ADN de los bacteriófagos fue extraído y purificado utilizando el mini kit QIAGEN lambda. Las muestras de los fagos fueron digeridas con enzimas de restricción endonucleasas (Hind III, Eco RV, Bam HI, Eco RI), los fragmentos de ADN, fueron separados por electroforesis y visualizados con un trasn iluminador de UV. Los resultados mostraron la presencia de tres bacteriófagos infectivos líticos, formando entre 150-400 UFP (Unidades Formadoras de Placa). Los bacteriófagos fueron designados por su origen (DAF1, DAF2 pertenecientes de agua residual y líticos de *Escherichia coli* O157 (EC-48) y DJNoF perteneciente de agua superficial y lítico de *Salmonella choleraesuis* ATCC (10708). El fago DAF1, mostró un alto polimorfismo cuando fue digerido por las enzimas Hind III, Eco RV y Eco RI, el fago DAF2 fue el que presentó mayor polimorfismo al ser digerido por las cuatro enzimas. En contraste el fago DJNoF, mostró menor polimorfismo. Estos resultados muestran las diferencias genéticas de los fagos líticos para las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis* y sugieren que pueden ser estudiados para el control de enfermedades infecciosas.

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos o fagos son virus que parasitan bacterias y son las entidades más abundantes en el medio ambiente (Goya, 2006). Su descubrimiento constituyó un gran avance en la microbiología y la virología al permitir estudiar y analizar diversos comportamientos biológicos. Una particularidad interesante de los bacteriófagos los constituyen sus ciclos líticos y lisogénicos. En el ciclo lisogénico el bacteriófago se fija a la bacteria, le inyecta el ácido nucleico que se incorpora al genoma bacteriano (fase de profago) transformando la función de la bacteria. Posteriormente cada bacteria de la nueva generación es portadora de la información genética entregada originalmente por el bacteriófago. Por otro lado, el ciclo lítico, después de múltiples generaciones de bacterias lisogénicas, el profago se convierte en fago vegetativo, se sintetizan nuevos fagos en la bacteria, la cual se lisa, y los deja en libertad, con capacidad para infectar otras células bacterianas (Romero, 2007).

La habilidad que presentan los fagos para matar específicamente a las células bacterianas que infectan, es lo que permite emplearlos como biocontrol ya sea como agentes terapéuticos o de control en los alimentos (Barrow y Soothil, 1997; Huff y col., 2005; Skurni y Strauch, 2006). Los fagos son específicos para una bacteria en particular y no puede atacar a otra bacteria (Hagens y Offerhaus, 2008). Aparte de dicha especificidad, los fagos presentan otras características apreciables como la autoreplicación y, al mismo tiempo, la autolimitación. Además, cuando se encuentran en exceso también son capaces de lisar las células bacterianas por un fenómeno conocido como "muerte por nadie", donde el elevado número de partículas desestabiliza las envueltas celulares, provocando la muerte de la bacteria, adicionalmente los bacteriófagos presentan un mecanismo de acción totalmente diferente a la de los antimicrobianos, lo que hace a los fagos efectivos incluso frente a bacterias resistentes a múltiples antibióticos (Spricigo, 2011).

Los bacteriófagos (virus naturales o "fagos") son los microorganismos más abundantes en el ambiente y están presentes en grandes cantidades en agua y alimentos de varios orígenes. Los fagos son inofensivos para los humanos, animales y plantas. Durante varios milenios, los humanos se han expuesto rutinariamente a niveles altos de fagos a través de alimentos, agua y el medio ambiente, sin efectos adversos. En ciertos alimentos, se pueden llegar a encontrar 100 millones de fagos/g; y en ecosistemas acuosos, hasta 1,000 millones de fagos/mL (Hagens y Offerhaus, 2008).

La alta incidencia de bacteriófagos, ha motivado el empleo de los mismos con fines terapéuticos (fagoterapia). Después de la II Guerra Mundial, se inició el uso de fagos en forma

de preparaciones poco purificadas, lo que condujo al abandono de estas terapias. No obstante, la terapia con fagos ha continuado en algunos países como Polonia y en Georgia (Sulakvelidze y cols., 2001). Este último país, ha sido el productor de cepas de fagos para la antigua Unión Soviética. Asimismo, Polonia ha proporcionado datos convincentes sobre el tratamientos con fagos en infecciones bacterianas supurativas (enfisemas, peritonitis, osteomielitis y otras) en humanos, donde implican a bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella* (Sulakvelidze y col., 2001).

Los bacteriófagos también proveen una alternativa atractiva para el control de enfermedades originadas por bacterias patógenas, que dan origen a Enfermedades de Transmisión en Alimentos (ETAs) y que se presentan cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento. Las ETAs plantean una preocupación muy seria en el ámbito de la salud pública y pueden manifestarse a través de síntomas muy variados, tales como diarreas, vómitos, trastornos neurológicos. (Donato, 2007).

Las bacterias que aparecen con mayor frecuencia asociadas a brotes de ETAs son *Campylobacter*, *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 (CDC, 2000). Recientemente, la FDA ha aprobado el uso de bacteriófagos para el control de algunas bacterias patógenas, como *Escherichia coli* y *Listeria* que son Enterobacterias que pueden causar infecciones gastrointestinales al contaminar agua o alimentos (Le y Popoff, 1987).

Algunas investigaciones aseguran que las infecciones por *salmonella* en los Estados Unidos se incrementaron en un promedio de 40 000 incidentes anuales. El Centro de Vigilancia de Enfermedades Transmisibles del Reino Unido señala que en 1989 aumentaron las infecciones gastrointestinales producidas por *Salmonella* y *Campylobacter*. De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos se estimó que en 1987 las ETAs ocasionaron grandes pérdidas económicas; y el costo ocasionado por ellas fue de 4 billones de dólares anuales. En los países subdesarrollados las enfermedades gastrointestinales constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Parrilla y col., 1993).

En México, este tipo de infecciones, son una de las causas más importantes de morbimortalidad entre niños menores a 5 años. Las últimas estadísticas en México señalan a Sonora dentro de los primeros 7 estados de la república con mayor tasa de mortandad, ocasionada por enfermedades diarreicas agudas (SINAVE, 2014). Las zonas rurales del sur de Sonora presentan prevalencia de patógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella*. Por lo tanto, encontrar fagos propios de la región y altamente específicos a estas bacterias resulta una opción de biocontrol, ya que los bacteriófagos también pueden ser utilizados en los procesos de desinfección y en la protección de alimentos de origen animal y vegetal (García y col., 2008).

En las comunidades rurales del Valle de Yaqui, sur de Sonora se consume agua procedente de canales que se abastecen de pozos, norias y de pozos profundos, dichas fuentes están ubicadas en zonas agrícolas que son irrigadas con mezclas de aguas agrícolas y aguas residuales, lo cual representan focos de infección para agua de consumo humano. Estudios previos han reportado que el 57.5% de los pozos de agua del Valle de Yaqui sobrepasan el límite máximo permisible de coliformes fecales y comunidades del sur de Sonora, como el municipio de San Ignacio Rio Muerto y Emiliano Zapata han mostrado la presencia de bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua de pozo para consumo humano (Labrada, 2007). Así mismo, las comunidades como el Alto de Jecopaco y colonia Allende del Valle del Yaqui obtienen su fuente de agua a partir de canales que se abastecen de pozos y que en pocas ocasiones es tratada por el organismo operador de agua potable. Estos acontecimientos ponen de manifiesto la necesidad de mantener la calidad microbiológica del agua para consumo humano y agua para el lavado de hortalizas, ya que el agua es el principal vehículo de sustancias contaminantes.

Por otra parte, no existen estudios de aislamiento e identificación de fagos líticos para las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* presentes en el agua del sur de Sonora. Sin embargo, en el Valle del Yaqui Sonora, se han detectado bacteriófagos como MS2 y PRD-1, en muestras de agua para uso agrícola, aguas negras y aguas de pozo para consumo humano. Así mismo, estudios realizados por Gortáres y col. 2008, han detectado también presencia de bacteriófagos en las aguas residuales de Cd. Obregón, reportando una alta presencia de colifagos en el influente del agua residual con una remoción del (99.4091%), por el proceso de tratamiento de aguas. Es por ello que nos surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Es posible aislar bacteriófagos propios de la región, con capacidad lítica a *Escherichia coli* y *Salmonella*?, con el fin de proponerlos en el biocontrol de estos organismos ya sea en fagoterapias o biocontrol en agua o de alimentos. Por tal motivo, la primera etapa de la investigación, requiere la obtención y aislamiento de fagos propios de la región, a partir de muestras ambientales como el agua residual y agua de riego. En este contexto, la importancia de este trabajo radica en la búsqueda de bacteriófagos, con acción biológica sobre bacterias que atentan contra la salud pública y que a su vez estos fagos puedan ser utilizados en diversos procedimientos que sean beneficiosos a la salud humana. Así mismo, la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, para la utilización de productos de fagos como Listex P100 que es un producto seguro y natural con amplio espectro hacia la *Listeria monocytogenes* y que puede utilizarse en los productos alimenticios (Oliveira y col., 2014), proporciona el impulso para investigar más a fondo las

aplicaciones de fagos. Todos estos antecedentes motivan la búsqueda de bacteriófagos regionales que se puede utilizar en cualquier ámbito de la salud humana.

OBJETIVOS

General

Aislar y caracterizar biológicamente los bacteriófagos líticos propios del sur de Sonora que tengan capacidad infectiva contra *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

Específicos

- Determinar la presencia de bacteriófagos que infectan a bacterias de *Escherichia coli* O157 (EC-48) y *Salmonella choleraesuis* ATCC (American Type Culture Collection) (10708) de agua residual y agua de riego agrícola de las comunidades rurales de las colonias Allende y Altos de Jecopaco del Valle del Yaqui Sonora.
- Aislar los bacteriófagos detectados con actividad lítica, utilizando la técnica de doble agar.
- Concentrar bacteriófagos líticos de *Escherichia coli* O157 (EC-48) y *Salmonella choleraesuis* ATCC (10708)
- Caracterizar biológicamente los bacteriófagos con un perfil genómico

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Bacteriofagos

Los bacteriófagos fueron observados por primera vez en 1896, cuando Ernest Hankin, un bacteriólogo británico reportó haber observado una marcada actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae*, en aguas tomadas de los ríos Ganges y Junna en la India y sugirió la existencia de una sustancia no identificada que pasaba a través de poros finos y lábil al calor responsable de éste fenómeno. Dos años después Gamaleya un bacteriólogo ruso observó un fenómeno similar; sin embargo fue hasta 1915, cuando Frederick Twort, un médico bacteriólogo británico, reportó haber observado la presencia de agentes filtrables y fue él quien aventajo la hipótesis de que podrían ser virus, no obstante debido a diversas circunstancias algunas de ellas financieras Twort no continuó con sus experimentos, y fue hasta dos años después cuando se consideró a los fagos oficialmente descubiertos cuando el Francocanadiense Félix d'Herelle les dio nombre por primera vez en 1917 (Segundo y col., 2010).

D'Herelle experimentó por primera vez con la actividad antibacteriana de los fagos, primero en animales aislando fagos a partir de heces de pollos tratando exitosamente una plaga de disentería de pollo y luego en humanos, éstos estudios fueron desarrollados en el Hospital de Enfants-Malades en París en 1919, el mismo d'Herelle tomó una preparación para garantizar la inocuidad antes de administrarle dicha preparación a un niño de 12 años con disentería severa tras lo cual los síntomas del paciente cesaron con sólo una administración del fago, es decir, el niño se recuperó totalmente a los pocos días. De igual manera tres pacientes adultos se recuperaron de la misma enfermedad en sólo 24 horas después de haber ingerido la preparación. Así mismo, en 1921 Richard Bruynoghe y Joseph Maisin usaron un tratamiento a base de bacteriófagos para tratar infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus* (Segundo y col., 2010).

Los fagos son los agentes biológicos más abundantes de la tierra, estimados en un total de 1,030 a 1,032 en todo el planeta, y juegan un rol determinante en el balance de los ecosistemas bacterianos Existen 13 familias de fagos que se clasifican de acuerdo a la naturaleza de su genoma y a sus características morfológicas (Figura 1) (Ackermann, 2003; Goyal, 2006, Kutter y Sulakvelidze, 2005).

Morfotipo	Forma	Ácido nucleico	Familia	Particularidades
A1 a A3	Fagos con cola	ADN dc, L	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil
B1 a B3			<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil
C1 a C3			<i>Podoviridae</i>	Cola corta
D1	Fagos poliédricos	ADN sc, C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros sobresalientes
D3		ADN dc, C, S	<i>Corticoviridae</i>	Cápside compleja, lípidos
D4		ADN dc, L	<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipídica, pseudocola
E1		ARN sc, L	<i>Leviviridae</i>	
E2		ARN dc, L, seg.	<i>Cystoviridae</i>	Cubierta lipídica
F1	Fagos filamentosos	ADN sc, C	<i>Inoviridae</i>	a- filamentos largos
F2				b- bastones cortos
F3		ADN dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	Cubierta lipídica
F4		ADN dc, L	<i>Rudiviridae</i>	Similar al virus del mosaico del tabaco
G1	Fagos pleomórficos	ADN dc, C, S	<i>Plasmaviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside
G2		ADN dc, C, S	<i>Fuseoviridae</i>	Cubierta lipídica, sin cápside, en forma de limón

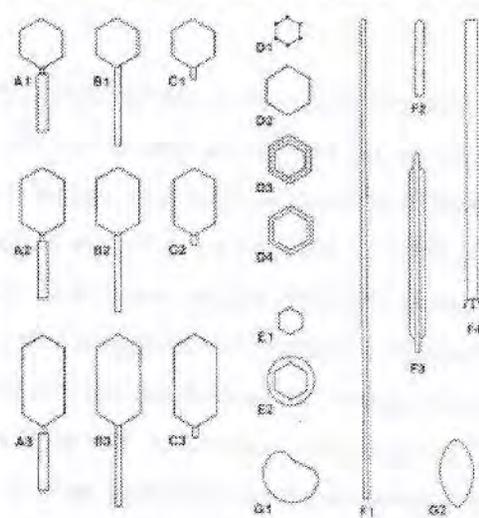


Figura 1. Morfotipos y características básicas de las diferentes familias de fagos.

Sc. Simple cadena, dc: doble cadena, C: circular, S: super helicoidal, L: lineal, seg: segmentado. Imagen obtenida del trabajo publicado por H.W. (Ackermann, 2005).

Según el trabajo publicado por H.-W., de los aproximadamente 5,100 bacteriófagos analizados por microscopía electrónica desde el año 1959, los fagos con cola representan el 96% del total y dentro de este grupo la distribución de los aislados es de 25.1% perteneciente a la familia *Myoviridae*, 60.8% a la *Siphoviridae* y 14.1% a la *Podoviridae*. (Ackermann, 2007).

Ciclo del Bacteriófago

Ciclo lítico: El fago se replica en el interior de la bacteria y el proceso finaliza con la lisis del huésped inducida por el fago y la liberación de la progenie. Cada uno de los pasos implicados en el ciclo lítico del fago juega un papel determinante en el predominio de un fago específico por sobre otros que poseen el o los mismos huéspedes en un ecosistema determinado. En líneas generales predominarán los fagos capaces de infectar al mayor número de huéspedes diferentes, que generen la mayor proporción de bacterias infectadas, y la mayor cantidad de

viriones por célula en el menor tiempo posible. Los parámetros del ciclo lítico se determinan a través de un ensayo de lisis en un ciclo, donde se analiza el número de partículas de fago liberadas en un ciclo lítico. Las etapas de la infección que se relacionan con cada parámetro del ciclo lítico se detallan en la Figura 2, donde también se involucra al ciclo lisogénico del fago y donde se incluyen etapas como reconocimiento y adsorción: rango de huésped y eficiencia de adsorción. La adsorción del fago a la superficie de la bacteria huésped puede producirse en uno o varios pasos, en este último caso se produce una unión reversible por interacción de las fibras de la cola con moléculas de la superficie de la bacteria que sirve para posicionarse correctamente y posteriormente generar una unión irreversible de otra proteína de la cola a una molécula receptora diferente (Pimienta, 2013).

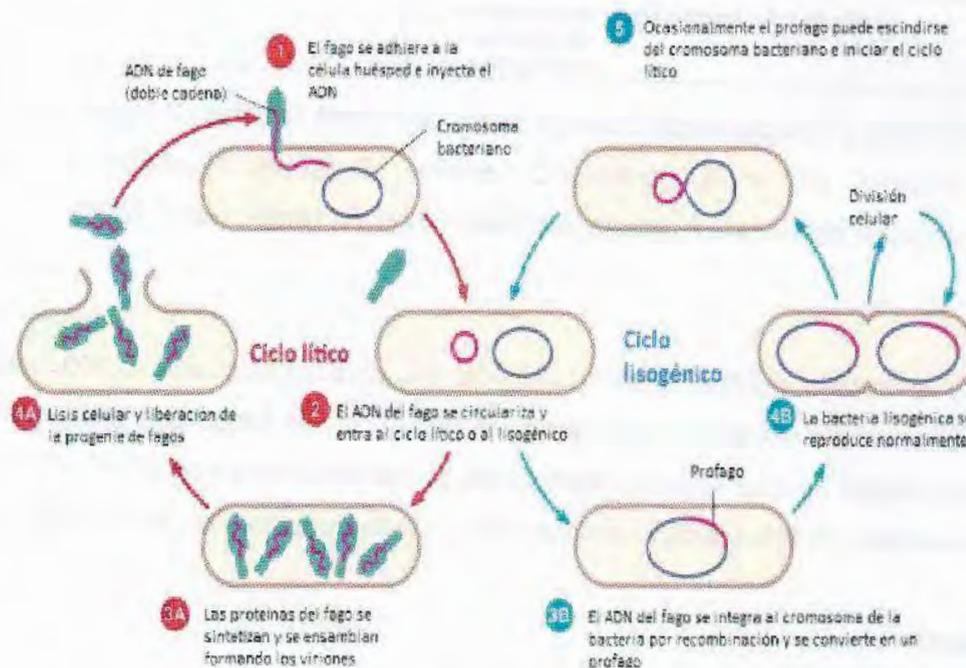


Figura 2. Esquema de los ciclos líticos y lisogénicos (Tortora y col., 2010).

Los bacteriófagos se encuentran en grandes cantidades en el medio ambiente y una de las fuentes más abundantes, son las aguas residuales y las aguas potencialmente recuperables, tales como las excedentes del riego agrícola o las generadas en las zonas urbanas y que representan una alternativa de recuperación de bacteriófagos. Investigaciones

previas en aguas tratadas del municipio de Cajeme, han descrito estudios del impacto microbiológico y han incluido presencia de colifagos en los vegetales que son irrigados con aguas tratadas (Gortáresy col., 2008). Así mismo, es conocido que estas aguas también poseen altas concentraciones de fagos por la elevada presencia de bacterias (Ortega y Airola, 2005; Pettygrove y Asano, 1985).

Productos Comerciales de Fagos como Agentes de Biocontrol

Los bacteriófagos se empezaron a utilizar ampliamente entre 1930 y 1940, alrededor de todo el mundo como antibióticos en humanos, sin embargo, su uso no progresó debido a la falta de información de su biología. Ahora con el amplio conocimiento de la biología celular y molecular, su uso se está extendiendo a otras áreas de aplicación, como el área de alimentos, en donde se ha demostrado su efectividad. Recientemente, la FDA ha aprobado el uso de bacteriófagos para el control de algunas bacterias patógenas que generan grandes problemas de inocuidad alimentaria. Hace unos años, en Estados Unidos se aprobaron varias aplicaciones de bacteriófagos. En el 2006, EBI Food Safety Listex, una sustancia natural y orgánica de fagos anti-*Listeria* que se puede usar como ayuda en el procesamiento en todos los productos alimenticios susceptibles a *Listeria monocytogenes*, se aprobó como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA y el Departamento de Agricultura (León y Chaidez, 2011).

Existen actualmente en el mundo varias empresas dedicadas a la fabricación de productos comerciales con diferentes funciones, donde utilizan a los bacteriófagos. Las aplicaciones de los bacteriófagos cada vez son mayores, dado que los resultados obtenidos en los experimentos realizados, han sido buenos, su uso además de ser propuesto en el ámbito de la salud también se ha extendido a la industria alimentaria (Spricigo, 2011).

Un revisión realizada por Segundo y col., 2010, señala que la compañía Intralix por ejemplo tiene dos productos aprobados por la FDA para su uso en productos de consumo humano (ListShield que actúa específicamente contra *Listeria monocytogenes* y Ecoshield contra *Escherichia coli*), del mismo modo, EBI food Safety, una compañía estadounidense dedicada a la investigación y desarrollo de la fagoterapia, es dueña de la segunda marca de lisados fágicos para la prevención de infecciones causadas por *Listeria monocytogenes* que fue aprobada por la FDA para su venta y uso en peces y queso (Segundo y col., 2010). Además cuenta con los siguientes productos:

- Ecoshield contra *Escherichiacoli* O157:H7
- Salmshield contra *Salmonella*

- ShigActive contra *Shigella*
- SAP 100 contra *Staphylococcus aureus*, incluyendo a los meticilina resistentes, y vancomicina resistentes.
- ABPP-100 contra *Acinetobacter baumannii*.

Fagoterapia

El concepto de fagoterapia, implica el uso de fagos específicos de bacterias patógenas en el tratamiento de infecciones, y fue planteado por primera vez por Félix d'Herelle en 1917, como un posible tratamiento de *Shigella dysenteriae* en el tratamiento de enfermos de difteria, y es una práctica que se ha utilizado tradicionalmente desde principios del siglo XX en los países de Europa del este. El instituto Eliava de bacteriófagos, microbiología y virología, fue fundado en 1923 en la ciudad de Tbilisi, de la república de Georgia, por el científico Giorgi Eliava con la colaboración de Félix d'Herelle y es actualmente uno de los principales institutos de investigación y desarrollo de productos comerciales de fagos. Este instituto, en sus comienzos, producía grandes cantidades de fagos para el tratamiento de infecciones bacterianas durante y después de la segunda guerra mundial. La cantidad de tratamientos que se han efectuado desde entonces es enorme, pero la mayoría de los resultados obtenidos se difundieron sólo a nivel local y no han sido correctamente documentados, por lo que los trabajos que se pudieron recuperar posteriormente han recibido fuertes críticas por sus diseños experimentales, falta de información detallada y por carecer de controles (Kropinski, 2006).

Los ensayos clínicos más claramente documentados sobre el uso de fagos como agentes terapéuticos fueron publicados por el Instituto de inmunología y terapia experimental (también conocido como "Instituto Hirszfeld") fundado en 1952 en Wroclaw, Polonia (Inal, 2003). Este instituto es el segundo más grande de Europa Oriental en investigación y desarrollo de terapia con fagos y se han publicado numerosos artículos que abarcan, en total, datos sobre aproximadamente 2000 pacientes infectados con una variedad de patógenos (predominantemente resistentes a antibióticos) que fueron tratados con fagos y cuyos resultados, en forma global, fueron exitosos entre del 60 al 90% de los casos (Inal, 2003).

En los países de Occidente, la producción y el uso masivo de antibióticos a partir de la década del 40's anularon casi por completo el desarrollo de la fagoterapia. La producción de algunas formulaciones de fagos se continuó sólo en forma aislada y a muy pequeña escala durante los años 50's y 60's. El uso de antibióticos en forma masiva trajo aparejada la selección de bacterias resistentes a ellos, y el desarrollo de nuevos antibióticos y la aparición de bacterias

multirresistentes. Una de las bacterias que genera mayor preocupación por la capacidad de adquirir resistencia a múltiples antibióticos es *Staphylococcus aureus*, un patógeno oportunista que causa numerosas muertes por infecciones intrahospitalarias. En 1944, cuando en EEUU la penicilina dejó de producirse exclusivamente para la armada y comenzó a comercializarse la fagoterapia (Kutter y Sulakvelidze, 2005).

La comercialización exitosa de fagos terapéuticos para tratar infecciones bacterianas en humanos comenzó en la década del 40's del siglo pasado en Francia por d'Herelle y en los Estados Unidos por la compañía farmacéutica Eli Lilly. Siguiendo este éxito, varias compañías en los Estados Unidos, Alemania y Francia produjeron grandes cantidades de preparaciones de lisados de fagos. La terapia con fagos floreció en la antigua Unión Soviética (URSS) donde estos permanecieron como una terapia estándar del sistema de salud; aun cuando el uso de los antibióticos estaba en su esplendor en el oeste. En ese estado, las preparaciones de fagos se usaron en la terapia, profilaxis o el diagnóstico de infecciones bacterianas como disentería, diarreas, fiebre tifoidea, infecciones sépticas-purulentas relacionadas con quemaduras, inflamación de órganos y heridas (Pimienta, 2013).

Bacteriófagos como Indicadores de Contaminación Viral

Actualmente los estudios antivirales han sido de gran interés. Se han estado desarrollando investigaciones con el fin de erradicar padecimientos como hepatitis A, rotavirus, adenovirus entre otros, así mismo, las investigaciones de sustancias antivirales en la actualidad utilizan indicadores de virus entéricos, como los bacteriófagos que son sustitutos ideales a estos enterovirus, como ejemplo son calcivirus felino, FCV-F9, norovirus, MNV-1 y el bacteriófago MS2 .Otro ejemplo son los bacteriófagos calcivirus felino (CVF, CVF-F9), norovirusmurino (NVM, MNV-1) y de bacteriófagos (MS2 y phiX174) (Davis y col., 2012;Elizaquível y col., 2013; Li y col., 2012;Su y col., 2009; Su y D'Souza, 2011, 2013). Algunos de los ejemplos claros del uso de bacteriófagos como indicadores de contaminación, son los modelos de fagos utilizados para evaluar la presencia de virus entérico en las aguas residuales o aguas contaminadas.

Virus como Indicadores de Calidad Sanitaria en el Agua

A finales de la década de los 30's se demostró que los virus no solo se podían aislar a partir de la médula espinal, sino que se excretaban durante semanas en grandes cantidades a través de las heces de individuos infectados. A partir de entonces comenzó a considerarse como una

enfermedad entérica, posiblemente transmitida por el agua contaminada. Durante 1940-1945 se estudió la posibilidad de transmitir la infección a primates mediante inoculación de concentrados de aguas residuales, demostrando así la presencia de partículas infecciosas (virus) en el ambiente, aunque no la vía de transmisión fecal-oral (Abedon, 2008).

Se han descrito importantes brotes de hepatitis víricas en diversos países, como el acontecido en Nueva Delhi entre diciembre de 1955 y enero de 1956, que afectó a 230.000 personas. El origen de la epidemia fue la contaminación del río que servía de fuente de abastecimiento de la planta potabilizadora de aguas para el consumo doméstico. Durante el período de la contaminación el agua fue tratada con altas dosis de alúmina y cloración posterior para prevenir la aparición de enfermedades infecciosas de origen bacteriano y algunas de origen vírico, aunque no se pudo impedir la propagación de la hepatitis vírica (Abedon, 2008).

Se ha reportado una incidencia de un 4.7% de brotes epidémicos de origen vírico transmitidos por el agua en Estados Unidos Americanos, por sus siglas en Inglés (USA,) entre 1975 y 1979, frente a un 56.3% de brotes relacionados con aguas contaminadas de etiología desconocida (Cliver, 1984).

Otras investigaciones han documentado brotes producidos *Coxsackievirus*, *Echovirus*, los virus de la hepatitis A y E, rotavirus y virus de *Norwalk* relacionados con aguas de distribución, que se han vinculado al mal funcionamiento de los sistemas de depuración aplicados o a la contaminación del sistema de distribución con aguas residuales, demostraron la presencia de rotavirus y enterovirus en aguas sometidas a un proceso de potabilización en los que se cumplan con los valores estándar de calidad para aguas potables (0 UFC coliformes/100 mL, concentración de cloro libre superior a 0.5 mg/L). En el mismo estudio se describe un brote de gastroenteritis que afectó a 7,900 individuos, y 36 casos de hepatitis A relacionados con la contaminación de los pozos de suministro con aguas residuales. El agua de los pozos se sometía habitualmente a un proceso de cloración antes de distribuirse por la red. Los exámenes virológicos permitieron identificar *Coxsackievirus* B2 y B3, y VHA en el agua residual de la comunidad y en el agua de pozo, así como *Coxsackievirus* B3 en el agua de distribución clorada. Los exámenes bacteriológicos no indicaban contaminación fecal en el agua clorada, aunque los virus podían sobrevivir al proceso (Gerba y col., 1984; Hejkal y col., 1982; Hopkins y col., 1984; Kaplan y col., 1982).

Por otro lado, en el caso de la agricultura la utilización de aguas residuales depuradas o no, y la utilización de lodos como abono podría conducir a la contaminación viral de los vegetales cultivados ya sea por contacto directo o con aerosoles, dando origen a ETAs. Además, se ha descrito la incorporación de virus por parte de las plantas irrigadas con aguas

residuales a través de raíces o tallos dañados. Los virus son transportados de forma pasiva a través del sistema conductor de la planta hacia las partes aéreas (Katzenelson y Mills, 1984).

Calidad Microbiológica del Agua de Consumo Humano

El agua es un vehículo importante de agentes patógenos causales de enfermedades diversas en el humano, dentro de los que destacan bacterias como el *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, virus como el de la hepatitis A y de Norwalk, protozoos importantes como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium parvum*. (Chover y col., 1995; Godoy y col., 2003; Pacsa y col., 1998; Salinas y col., 2000; Sanchez y col., 2000).

El control de la calidad del agua ha sido prioritario principalmente en zonas Urbanas, para verificar una adecuada potabilización del agua, o cuando se presentan brotes de enfermedades diarreicas en la población consumidora, donde una vez detectado el problema en el suministro de agua se resuelve a corto plazo mejorando las condiciones de desinfección de la misma (Flores y col., 1995; Isaac y col., 1994). En el caso de la calidad del agua potable en Cd. Obregón, Sonora, cumple con las especificaciones de la norma oficial Mexicana para agua para consumo humano (MODNOM-127-SSA1-1994).

Sin embargo, las comunidades rurales han estado al margen de la verificación de la calidad del agua que utilizan para consumo humano, ya que existen reportes de comunidades con altas incidencias de enfermedades gastrointestinales y parasitarias, donde el origen de las mismas se le ha atribuido a la deficiencia en la calidad del agua de pozo que utilizan para consumo (Welch y col., 2000). En México se tienen problemas de abastecimiento de agua en todos los niveles, y en cuanto a calidad de agua para consumo humano es por la insuficiencia de los sistemas de distribución de agua tratada; lo anterior repercute principalmente en las comunidades rurales, las cuales se abastecen de agua de pozo, pero sin una verificación regular de su calidad. Debido a lo anterior en el presente estudio se evaluó la calidad microbiológica del agua de pozo que abastece a algunas comunidades rurales del Sur de Sonora.

Bacterias Huésped de Bacteriófagos

Escherichia coli

Escherichia coli forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1985). Ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. Incluye microorganismos generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Son inhibidos por KCN e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Son H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y decarboxilan la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de su LPS, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación (Nataro y Kaper, 1998).

Escherichia coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio (Drasar y Hill, 1974). Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos y por lo tanto su presencia en alimentos, ambiente o paciente no certifica la etiología de una infección intestinal o un brote de ETAs. *Escherichia coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización, y los bacteriófagos que eliminan a este tipo de bacterias se les denominan comúnmente como colifagos (Nataro y Kaper, 1998).

Salmonella spp

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y comprende bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y móviles por flagelos peritricos, con excepción de las serovariedades *Gallinarum* y *Pollorum*. Estas bacterias son capaces de crecer a temperaturas de siete a 45°C y a pH entre cuatro punto cinco y nueve, son también resistentes a la desecación y a la congelación (Wilcock y Schwartz, 1993). En general, no fermentan la lactosa, pero algunas veces lo hacen lentamente (Libby y col., 2008). Bioquímicamente son indol negativas, producen ácido sulfhídrico y tienen la capacidad de utilizar el citrato como única

fuente de carbono, no hidrolizan la urea y descarboxilan la lisina y ornitina (Holt y col., 1994). En la actualidad el género *Salmonella* está dividido en tres especies: *Salmonella entérica*, *Salmonella bongori* y *Salmonella subterránea* (Shelobolina y col., 2004; Su y Chiu, 2007).

Actualmente, la superpoblación de las granjas de producción animal propicia un contacto estrecho entre los individuos. Esta proximidad junto con el consiguiente estrés genera unas condiciones óptimas para que *Salmonella entérica* cause infecciones y se disemine rápidamente dentro de la manada. La diseminación entre los individuos también ocurre durante el transporte de los animales y en el corral de espera antes de su sacrificio. De este modo los animales introducen estos patógenos en la planta de procesamiento, dando lugar a su dispersión en dicha planta por contaminación cruzada (Spricigo, 2011).

En el caso de los productos de origen vegetal, la contaminación por *Salmonella* está asociada principalmente a fertilizantes de origen animal y al agua de irrigación que puede estar contaminada por heces (Natvig y col., 2002; Islam y col., 2004). La contaminación en estos productos también puede ocurrir durante su procesamiento, transporte y comercialización (Lapidot y col., 2006).

Electroforesis en la Identificación de Bacteriófagos

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN de los bacteriófagos en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones.

La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizar la técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a VinThorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se obtenían de partículas purificadas de polyomavirus. Su razonamiento era que una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción permitiría el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN. Éste es exactamente el principio en que se basa la electroforesis de ácidos nucleicos. Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta

negativa del ADN y el ARN hará que estos se muevan en dirección al ánodo (Figura 3). Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Del mismo modo, moléculas de ADN o ARN con topologías o estructuras tridimensionales diferentes también se comportarán de forma diferente ante la fricción con la malla del polímero, permitiendo su separación.

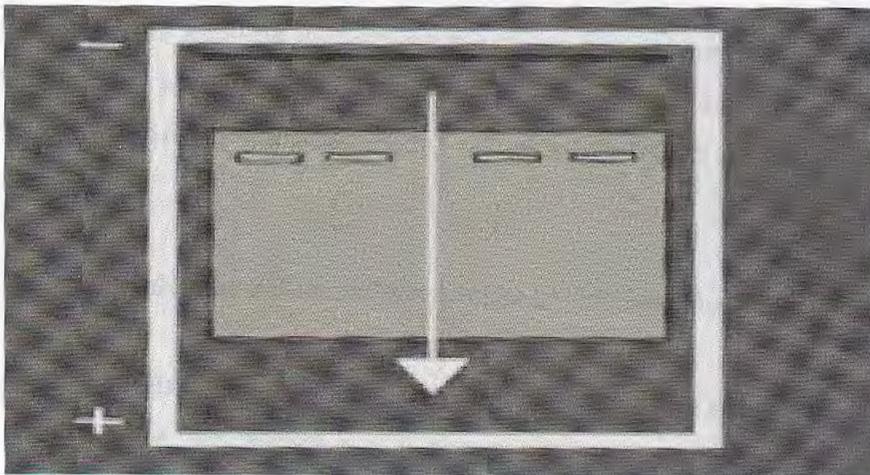


Figura 3. Esquema del sistema de electroforesis convencional en gel de agarosa. El rectángulo representa la cámara de electroforesis con los electrodos positivo y negativo, y en el centro en gris más claro el gel de agarosa con sus pocillos. La flecha indica la dirección de migración del ADN (Fierro, 2014).

La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida. Ambos tienen características diferentes en cuanto a sus propiedades y modo de preparación, por lo que se utilizará uno u otro en función de la aplicación y objetivos que persigamos. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un sólo par de bases. Los geles de poliacrilamida se

corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación.

Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Este rango de tamaños hace a los geles de agarosa ideales para analizar el producto de digestiones con enzimas de restricción, lo que puede combinarse con otras técnicas como el Southernblot, así como para analizar los productos de una reacción de PCR. Los geles de agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante. La electroforesis en gel de agarosa tiene un límite superior de unas 40-50 kb en el tamaño de las moléculas de ADN que puede separar. Por lo tanto, no es posible separar el producto de digestiones con enzimas de restricción de corte infrecuente, como NotI o SfiI, y menos aún separar cromosomas enteros (los cromosomas de eucariotas inferiores tienen tamaños de entre 0.2 y 12 Mb). Reducir la concentración de agarosa hasta un 0.1 o 0.2% puede incrementar el límite de separación hasta los 750 pb, sin embargo estos geles son extremadamente frágiles y muy difíciles de manipular (Fierro, 2014).

METODOLOGIA

Protocolo para la Obtención de Bacteriófagos a partir de Muestras Ambientales Utilizando la Técnica del Doble Agar

Toma de la Muestra Ambiental

Se realizó la toma y procesamiento de la muestra de acuerdo con Gavira y col. (2012). Donde cuatro litros de agua residual y/o agua de riego de las comunidades del Alto de Jecopaco (Figura 4) y Colonia Allende, del Valle del Yaqui Sonora (Figura 5), se depositó la muestra en botellas de plástico estériles. Se almacenó a 4°C en una nevera de poliestireno expandido y luego se transportó al laboratorio para su procesamiento.



Figura 4. Sitio de muestreo Altos de Jecopaco agua residual y de riego.



Figura 5. Sitio de muestreo dren Allende.

Preparación de Medios

Se preparó TSB caldo de soya tripticaasa, TSB-agarosa 0.4% (segunda capa de doble agar) en tubos falcon con 3 mL y TSA Agar de Soya Tripticaasa (primera capa de doble agar) este último se almacenó en caja Petri con 10 mL de agar en cada una.

Propagación de las Cepas Hospederas

Se inocularon las bacterias *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* O157:H7 (EC-48) y *Salmonella choleraeius* ATCC (10708), en tres matraces Erlenmeyer con 50 mL de TSB caldo de soya tripticaasa, se dejaron incubar por 24 horas a 37°C. Esto para la propagación del bacteriófago a partir de la muestra ambiental.

Preparación de la Muestra de Agua

Para la recuperación de bacteriófagos a partir de las muestras ambientales se desarrolló la siguiente metodología. Se utilizaron las muestras de agua procedentes de agua residual y agua de riego, el agua se trataron de la siguiente manera: Se tomaron 15 mL de alícuota depositándola en tubos falcón por duplicado y se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó por decantación. Se realizaron dos repeticiones de la

muestra de agua recolectada, siguiendo lo establecido por Rojas M, (2005) (Figura 6) y Talledo (1994, 1998). Esto se realizó para brindar una mayor confiabilidad de los resultados en cuanto a la estandarización de la técnica. En el caso de la muestra de un tubo esta se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa poro 0.45 μm , mientras que la otra se dejó solamente centrifugada.



Figura 6. Preparación de la muestra para centrifugar.

Propagación y Purificación de Bacteriófagos a partir de la Muestra

En los matraces Erlenmeyer con 50 mL de TSB caldo de soya tripticasa se propagaron las bacterias (*Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* O157:H7 (EC-48) y *Salmonella choleraeius* ATCC (10708), de manera independiente, en una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL, a la cual se le agregó 6 mL muestra de agua previamente centrifugada y filtrada. Se dejó incubar a 37°C por 24 horas.



Figura 7. Bacteria enriquecida en matraces.

Inoculación de Bacteria para el Doble Agar

Se preparó la cepa hospedera para realizar el doble agar, para ello se inoculó bacteria (*Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* O157:H7 (EC-48) y *Salmonella choleraesuis* ATCC (10708)) en TSB y se incubó por 24 horas a 37°C (Figura 7).

Filtración de Muestra Enriquecida

El matraz con 50 mL de TSB + bacteria + muestra, una vez incubado se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa (Whatman, USA) con tamaño de poro 0.45 μm y se almacenó en refrigeración a 4°C (Figura 8).

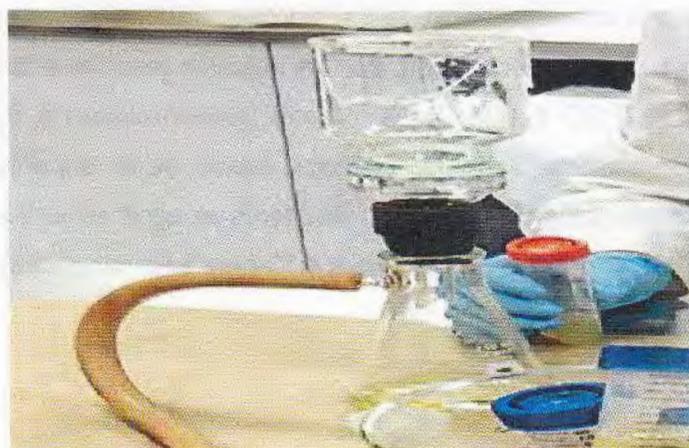


Figura 8. Filtración de bacteria + muestra.

Técnica de Doble Agar

Para la propagación del bacteriófago se utilizó el método descrito por Jamalludeen y col., 2009. Se mezcló 200µL del bacteriófago (muestra filtrada) con 1 mL de la bacteria hospedera (*Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* O157:H7 (EC-48) y *Salmonella choleraesuis* ATCC (10708)) en un tubo con 3 mL de TSB-agarosa 0.4%. La mezcla se vertió sobre cajas Petri con 10 mL de TSA (Agar de Soya Tripticasa), como se observa en la figura 9; una vez solidificado el medio de cultivo, la caja se incubó durante 18-24 horas a 37 °C. Una muestra positiva formaba calvas como se observa en la figura 10l.



Figura 9. Doble agar.

Recuperación y Purificación del Bacteriófago

Después de 24 de incubación a 37°C, se tomó lectura con la finalidad de observar la formación de calvas o placas comparándolas con un control positivo. Las muestras positivas se manipularon realizando una recuperación de bacteriófagos de la siguiente manera (Figura 11): A cada placa positiva se le añadieron 6 mL de una solución amortiguadora llamada buffer SM compuesta de (MgSO₄·7H₂O 8 mM, NaCl 100mM, gelatina porcino 0.002% C P/V) y se agitaron por oscilación durante 3 horas. La capa suave de la superficie se recuperó por remoción con un asa bacteriológica y el diluido resultante se vació en un tubo estéril, enseguida se centrifugó a 10,000 RPM durante 15 minutos a 4 °C para eliminar el detritus de la bacteria.

El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa (Whatman, USA) con tamaño de poro 0.45µm, como se observa en la figura 12 y el filtrado se ultracentrifugó a 50,000 RPM durante 2 horas a 4 °C. Se obtuvo una pastilla la cual se conservó en buffer SM.



Figura 10. Crecimiento de unidades formadoras de placas (UFP).



Figura 11. Desprendimiento de la capa suave de la superficie



Figura 12. Filtrado con nitrocelulosa

Protocolo para la Extracción de ADN de los Fagos

1. Se puso a crecer en un tubo de 5 ml $PY_{CaMg} NaI^{20}$ con la cepa de interés y se dejó incubar durante 20-24 hrs a $30^{\circ}C$ c/agitación.
2. Se leyó la densidad óptica del cultivo y ajustó para obtener 0.2-0.15 en 2 tubos de 6ml c/u de $PY_{CaMg} NaI^{20}$
3. Por ejemplo: $(DO)(x) = (6 \text{ ml})(0.15)$, considerando una DO de 1.00, $X=0.9 \text{ ml}$
4. Se puso el volumen de cepa adecuado, en este caso 0.9 ml directamente, y el resto de $PY_{CaMg} NaI^{20}$ para un volumen total de 6 ml, en este caso 5.1 ml.
5. Se añadieron 100 μl del fago a cada tubo, mezclando gentilmente y se incubo 16-18 hrs a $30^{\circ}C$ c/agitación. Se puso también un tubo control sin fago.
6. Se verificó la disminución de densidad óptica comparando con tubo control. Se añadió 0.3 ml de cloroformo a cada tubo con fago, se agitó con vortex e incubó 15 min $30^{\circ}C$ c/agitación. Se pasó el volumen de 6 ml con fago a los 2 tubos falcon y se centrifugó 10 min a 10000 rpm y $4^{\circ}C$.
7. Se transfirió el sobrenadante a nuevo tubo falcon y se volvió a centrifugar 10 min a 13000 rpm y $4^{\circ}C$. Se recuperaron 10 ml del sobrenadante en un nuevo falcon.
8. Se añadió buffer L1 (DNAsa/RNAsa), 100 μl al falcon. Se mezcló por inversión y se incubo a 1 hr a $37^{\circ}C$ c/agitación. Se añadieron otros 100 μl de L1 al falcon y seguido incubando otras 2 hrs a $37^{\circ}C$ c/agitación (también puede ser toda la noche).
9. Se añadió buffer L2 frío (PEG/NaCl), 2-4 ml al falcon, se mezcló gentilmente 4-6 veces por inversión e incubó en hielo overnight ó 2 hrs.

10. Se centrifugó a 20 min a 10000 rpm y 4°C. Descartando el sobrenadante y se dejó escurriendo por 1 minuto.
11. Se resuspendió el pellet con buffer L3 (Tris/EDTA), 1 ml al falcon, utilizando una pipeta para resuspender completamente (arriba y abajo).
12. Se pasó a un tubo de ensayo de vidrio. Se añadió buffer L4 (SDS 4%), 1 ml al tubo, se mezcló gentilmente y se añadió 5 µl proteínasa K, se mezcló nuevamente 4-6 veces por inversión e incubar 1 hr a 50°C y 10 min a 70°C. Se pasó a hielo 2 min.
13. Se regresó a un tubo falcon, añadiendo buffer L5 (acetato de K), 1 ml al falcon, se mezcló gentilmente por inversión 4-6 veces se centrifugo 30 min a 12000 rpm y 4°C.
14. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo falcon y se centrifugó nuevamente 10 min a 12000 rpm y 4°C.
15. Se transfirió el sobrenadante del paso anterior a eppendorfs con 1 ml c/u, se añadió 0.7 ml de isopropanol a c/u, se mezcló bien por inversión y se centrifugó 30 min a 12000 rpm y 4°C.
16. Se decantó con mucho cuidado el sobrenadante para no perder el pellet, se añadió 1 ml de etanol 70% a cada eppendorf, mezclando con vortex rápido y centrifugando 10 min a 12000 rpm y 4°C. Se repitió lo anterior, decantando el sobrenadante y se secó el pellet 5 min en savant.
17. Se resuspendió el pellet de DNA con 35 µl de agua. Se dejó en refrigeración toda la noche para resuspender totalmente.
18. Se juntó el DNA de los eppendorf del fago en un solo tubo eppendorf. En este punto puede quedar así el DNA o puede hacerse una limpieza con fenol/cloroformo.

Tabla 1. Composición de los Buffer.

Buffer	Composición	Almacenamiento
Buffer L1	300 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 Mm EDTA; 0.2 mg/ml BSA; 20 mg/ml RNAsa A; 6 mg/ml DNAsa I	4°C
Buffer L2	30% Polyethyleneglycol (PEG 8000); 3M NaCl	Temperatura ambiente o 4°C
Buffer L3	100 mM Tris-HCl pH 8.0; 25 mM EDTA	Temperatura ambiente
Buffer L4	4% SDS	Temperatura ambiente
Buffer L5	3 M acetato de potasio pH 5.5	Temperatura ambiente
TE	10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA	Temperatura ambiente

Protocolo para la Lectura del DNA por Electroforesis

1. Se preparó agarosa 1% con buffer tris 1X y se diluyo en microondas por 1:30 minutos
2. Se realizó la siguiente mezcla para la digestión del DNA y se incubó por 2 horas.

Tabla 2. Digestión DNA.

17 mL	DNA
2 mL	Buffer tris 1X
1 mL	Enzima

Tabla 3. Enzimas de restricción.

Enzimas de restricción	Sitios que corta	(Secuencia producida)
Hind III	A/ AGCTT	<i>Klaemophilis</i> ln 4
Eco RV	GAT/ ATC	<i>Escherichia coli</i>
Bam HI	GGATCC/CCTAGG	<i>Bacillus</i>
Eco RI	G/AATTC	<i>Escherichia coli</i>

3. Preparación del colorante

Tabla 4. Colorante.

0.125%	Bromofenol
0.125%	Xilenno
30%	Glicerol

4. Mezcla para electroforesis

Tabla 5. Reactivos para la electroforesis.

3 mL	Colorante
7 mL	Muestra digerida

4 mL	Marcador DNA (O'GeneRuler DNA Ladder Mix, ready- to-use #1173)
-------------	---

5. Se inyectaron 10 L de la mezcla anterior, se deja la corrida por aproximadamente 40 minutos.
6. Se tiñó con bromuro de etidio y se dejó en agitación por aproximadamente 10 minutos, transcurrido el tiempo se lava con agua por 5 minutos

Equipos que se utilizaron para los ensayos de DNA:

1. G BOX Syngene (Transiluminador)
2. Horizon 58 Model 200, life technology (Electroforesis)
3. Sigma 4KI5C (Centrifuga)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de Bacteriófagos

La selección de fagos se realizó llevando a cabo diferentes muestreos ambientales, así como aislamientos y propagaciones con el fin de observar su estado biológico lítico, en la tabla 6 se pueden observar los diferentes resultados de la propagación de los bacteriófagos y la variación del fago en su estado lítico y lisogenico. Este estudio se realizó con la finalidad de seleccionar el punto de muestreo y con la intención de obtener los fagos líticos de interés. Por último, a la selección de fagos líticos se les realizó un perfil genómico

Detección de Bacteriófagos

Se realizaron tres muestreos en las comunidades rurales del sur de Sonora como el Ejido Allende y Alto de Jecopaco, a cada muestreo se le realizaron diversas propagaciones, esto significa que una vez aislados los bacteriófagos se volvían a replicar utilizando la misma técnica del doble agar. Las muestras se nombraron de acuerdo al lugar donde fueron obtenidas: Muestra de agua de dren 1 (D1), muestra de agua de dren 2 (D2), muestra de agua de riego y residual (RR), muestra de agua de riego (R), muestra de agua de riego para tratar 1 (RP1), muestra de agua de riego para tratar 2 (RP2).

La Tabla 6 muestra los resultados del primer muestreo donde se puede observar que en la propagación 1 se encontraron bacteriófagos infectivos contra las cepas *Escherichia coli* O157 y *Salmonella choleraesuis* aproximadamente 83% con calvas definidas en ambos casos. En la propagación 2 se muestra que en la cepa de *Escherichia coli* O157 el 17% calvas definidas y en la cepa de *Salmonella choleraesuis* 83% de las muestras con calvas definidas. En la propagación 3 se muestra que en la cepa de *Escherichia coli* O157 el 66% con calvas definidas y en *Salmonella choleraesuis* el 33% con calvas definidas.

Nuestros resultados coinciden con previos estudios realizados en las zonas rurales del sur de Sonora y el área metropolitana de Monterrey donde se han encontrado la presencia de fagos en muestras ambientales como el agua residual donde se asilaron fagos de *Salmonella typhi* ATCC 19430 (Hernández y col, 2009; Labrada, 2007).

En la actualidad son pocos los estudios realizados en las zonas rurales del Valle de Yaqui con el fin de encontrar fagos líticos. Labrada (2007), reportó la presencia de fagos PRD-1 que infecta a *Salmonella* spp ATCC 23564 y el fago MS-2 que infecta a *Escherichia coli* ATCC

15597 utilizando un método indirecto para determinar si las aguas procedentes de comunidades rurales de San Ignacio Río Muerto Sonora, se encuentran infectadas con virus entéricos. Así mismo estudios realizados en el estado de Baja California Sur han reportado la presencia de vibriófago en camarón y se ha evaluado como agentes de biocontrol de *Vibrios* spp (Quiroz, 2005; Makarov, 2011 y Márquez, 2013). Por otra parte, en Sinaloa se ha registrado el aislamiento, identificación y caracterización a nivel biológico, morfológico y genético de bacteriófagos provenientes de la zona centro de Sinaloa con gran efectividad para destruir cepas de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 sobre superficies de hortalizas, piel de pollo y carne de res (Chaidez, 2015), también en este mismo estado, López y col (2011) encontraron bacteriófagos infectivos para varios serotipos de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 aislados de heces frescas de bovinos, cerdos y aves de corral.

En general, en la Tabla 6 se muestra los resultados obtenidos de las propagaciones de fagos a partir de los diferentes puntos de muestreo, donde se pudo observar que en la mayoría de las muestras se obtuvieron calvas definidas que se representan con el signo (+) para las cepas hospederas de *Escherichia coli* y *Salmonella choleraesuis* así mismo, se observó que algunas muestras no desarrollaron UFP definidas las cuales se muestran con el signo (-). A partir de este primer muestreo se decidió realizar la toma de muestra en los puntos de muestreo con mayor incidencia en calvas definidas.

Tabla 6. Primer muestreo realizado al agua de riego y agua residual de los poblados del Alto de Jecopaco y Colonia Allende.

Cepa Muestra	Propagación 1		Propagación 2		Propagación 3	
	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Salmonella choleraesuis</i>
D1	+	+	-	+	+	-
D2	+	+			-	-
RR	+	+	+	+	+	-
R	-	+	-	+	+	-
RP1	+	+	-	+	+	+
RP2	+	-	-	-	-	+

+ Presencia de fagos con calva definida - Presencia de fagos con calva no definida

Por otro lado, la Tabla 7 observamos que para las tres cepas hospederas (*E. coli* O157, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella choleraesuis*) en las diferentes muestras ambientales el 100% no presentó calvas definidas. Por fuentes interpersonales se informó que cuando se realizó el muestreo el drenaje de la comunidad presentaba un problema técnico, reduciendo la cantidad de materia orgánica y bacterias hospederas disponibles para la replicación del bacteriófago. Así mismo, estudios realizados en aguas, señalan que las bacterias del tracto intestinal no suelen sobrevivir en el medio acuático, ya que están sometidas a un estrés fisiológico y pierden gradualmente la capacidad de producir colonias. Su velocidad de mortalidad depende de la temperatura del agua, los efectos de la luz solar, las poblaciones de otras bacterias presentes, y la composición química del agua, lo anterior podría responder a nuestro resultados (Fernández y col, 2001).

Tabla 7. Segundo muestreo realizado al agua de riego y agua residual de los poblados del Alto de Jecopaco y Colonia Allende.

Cepa Muestra	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> <i>choleraesuis</i>
D	-	-	-
RR	-	-	-
R	-	-	-
RP	-	-	-
P	-	-	-

+ Presencia de fagos con calva definida - Presencia de fagos con calva no definida

El tercer muestreo se desarrolló tomando en cuenta los puntos con mayor incidencia en resultados positivos. La Tabla 3 muestra que en la propagación 1 para la cepa de *Escherichia coli* O157 y O157:H7 el 60% de las muestras fueron calvas definidas y 20% para *Salmonella choleraesuis*. La propagación 2 para *Escherichia coli* O157 el 40% con calvas definidas, el 60% para *Escherichia coli* O157:H7 y el 20% para *Salmonella choleraesuis*. En la propagación 3 para la cepa de *Escherichia coli* O157 el 40% calvas definidas, para las cepas *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella choleraesuis* el 20% con calvas definidas. Por último la

propagación 4 para la cepa de *Escherichia coli* O157 el 40% con calvas definidas, para las cepas *Escherichia coli* O157:H7 el 0% y *Salmonella choleraesuis* el 20% con calvas definidas.

Se tomaron los fagos con calva definida y se propagaron para obtener una mayor concentración con el fin de realizar un perfil genómico. No fue posible identificar una razón para la pérdida de viabilidad de algunos fagos en este muestreo, ya que en ocasiones algunos bacteriófagos mostraban en estado lítico y después se mostraron débiles o no se encontraban en ese estado. Se cree que se relacione a la naturaleza del fago y a las condiciones de la manipulación en el laboratorio, así como las condiciones de luz, fueron las determinantes para la viabilidad de dichos virus (Fiorentin y col, 2004).

Tabla 8. Tercer muestreo realizado al agua de riego y agua residual de los poblados del Alto de Jecopaco y Colonia Allende.

Cepa Muestra	Propagación 1			Propagación 2		
	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella choleraesuis</i>
DAF1	+	+	-	+	+	-
DAF2	+	-	-	+	-	-
DANoF	-	+	-	-	+	-
DJF	-	-	-	-	-	-
DJNoF	+	+	+	-	+	+
Propagación 3			Propagación 4			
DAF1	+	-	-	+	-	-
DAF2	+	-	-	+	-	-
DANoF	-	-	-	-	-	-
DJF	-	-	-	-	-	-
DJNoF	-	+	+	-	-	+

+ Presencia de fagos con calva definida

-Presencia de fagos con calva no definida

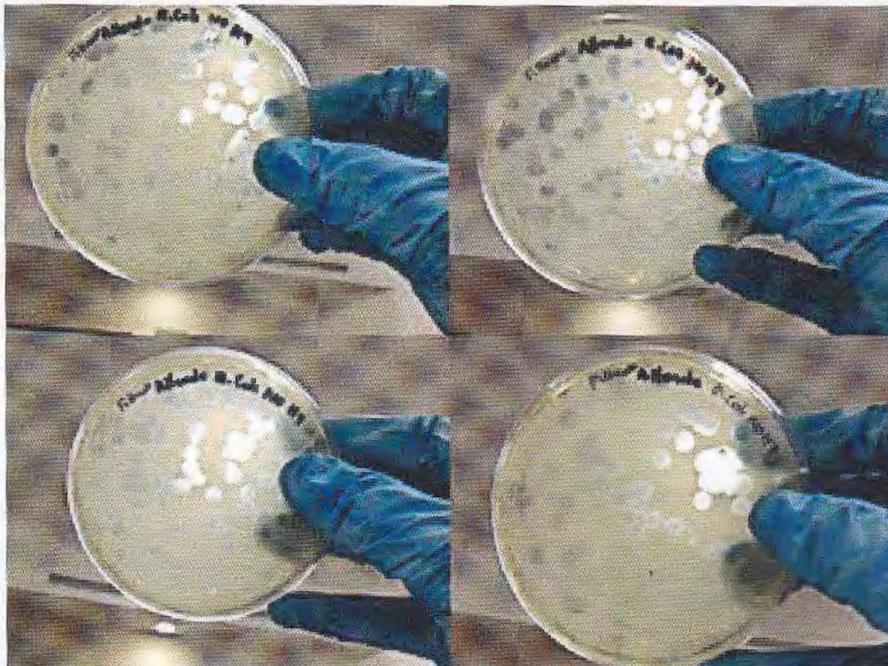


Figura 13. UFP del fago DAF1 O157

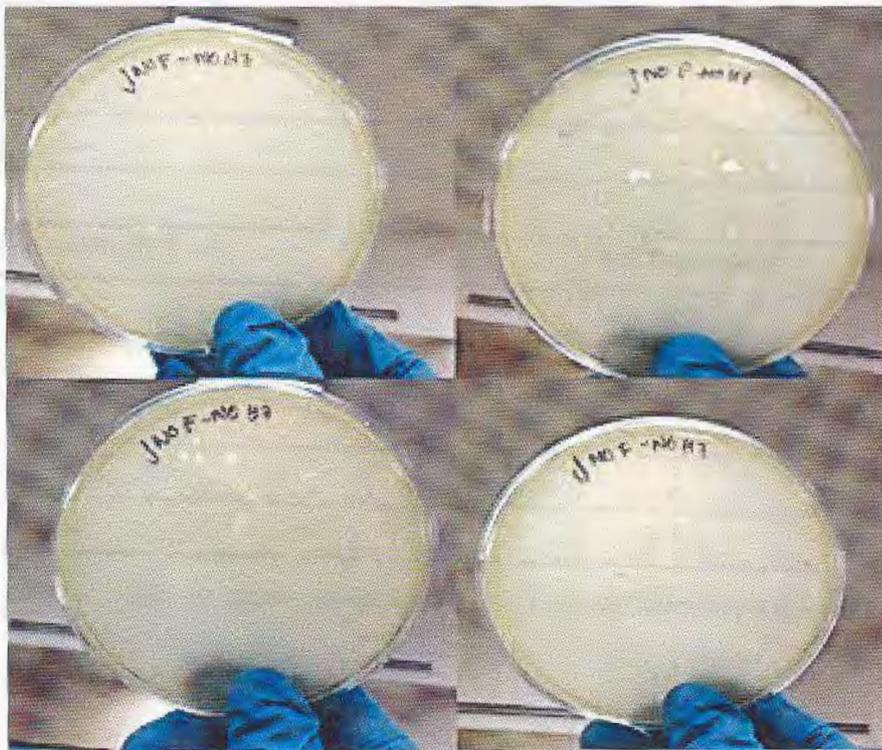


Figura 14. UFP del fago DJNoF O157

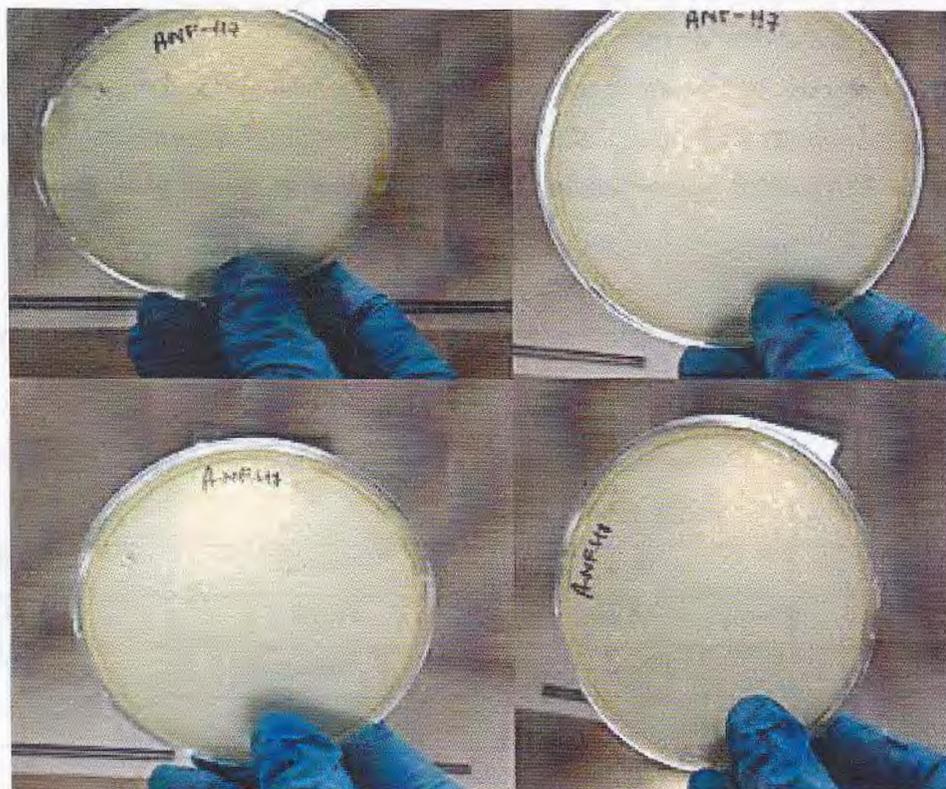


Figura 15. UFP del fago DANoF O157:H7

Se obtuvieron un total de 3 fagos líticos y aislados para dos cepas diferentes *Escherichia coli* O157 EC-48 y *Salmonella choleraesuis* (10708), los fagos DAF1 y DAF2 son infectivos para la cepa *Escherichia coli* O157 EC-48 y el fago DJNoF es infectivo para la cepa de *Salmonella choleraesuis* (10708), como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Fagos aislados

Nombre del aislado	Cepa Huésped del enriquecimiento
DAF1	ATCC (O157 EC- 48)
DAF2	ATCC (O157 EC- 48)
DJNoF	ATCC <i>Salmonella choleraesuis</i> (10708)

Perfil Genómico de los Bacteriófagos

Se realizó la caracterización de los fagos seleccionados a través de análisis del perfil genómico, utilizando diferentes enzimas de restricción.

A cada uno de los bacteriófagos se les extrajo su ADN, la concentración obtenida del ADN de los fagos fueron 15.5 ng/ μ L, 32.8 ng/ μ L, 690.8 ng/ μ L y 4.9 para las muestras control Av08, DAF1, DAF2 y DJNoF respectivamente. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Concentración de ADN obtenido en cada uno de los fagos aislados en muestras de agua del Valle del Yaqui.

Muestra	Concentración de ácido nucleico	Unidad	Tipo de muestra
Control Av08	15.5	ng/ μ L	DNA
DAF1	32.8	ng/ μ L	DNA
DAF2	690.8	ng/ μ L	DNA
DJNoF	4.9	ng/ μ L	DNA

El ADN de los bacteriófagos se sometió a la digestión con las enzimas de restricción Hind III, Eco RV, Bam HI y Eco RI. La Tabla 11 muestra los fagos digeridos por estas enzimas, se observa que los tres fagos son diferentes entre ellos. En el caso del control Av08 se observó que solo pudo ser digerido por la endonucleasa Hind III observándose un corto polimorfismo en su DNA, el fago DAF1 mostró más amplio polimorfismo al ser digerido por las enzimas Hind III, Eco RV y Eco RI, el fago DAF2 fue el que mostro mayor polimorfismo al ser digerido por las cuatro enzimas y en el caso del fago DJNoF se observó que la mayoría de las enzimas no pudieron digerir al ADN del fago porque no tiene sitios diana para estas enzimas; sin embargo, la enzima Bam HI mostró un patrón de bandas restringido (Krylov, 2006). Nuestros resultados coinciden con previos estudios realizados donde las enzimas Hindi III y Eco RV digieren los bacteriófagos ADN (López y col, 2011).

Tabla 11. Enzimas de restricción que digirieron el ADN.

Núm. de muestra	Hind III	Eco RV	Bam HI	Eco RI
Control de Av08	✓	✓	-	-
DAF1	✓	✓	-	✓
DAF2	✓	✓	✓	✓
DJNoF	-	-	✓	-

Por otra parte, se analizaron los perfiles genómicos utilizando el marcador GIBCO con el colorante Bromuro de etidio para saber que enzimas digerían a los diferentes fagos. Como se muestra en la figura 16, las enzimas que se trabajaron son tres tipos de enzimas: Hindi III, Eco RV y Bam HI; para el control Av08 las enzimas que digirió el DNA del fago fueron Hindi III, la Eco RV y la Bam HI, respectivamente. Al fago DAF1 y DAF2 lo digirieron las mismas enzimas: Hindi III, Eco RV y Bam HI. Por último se aprecia que al fago DJNoF ninguna enzima pudo digerir el DNA.

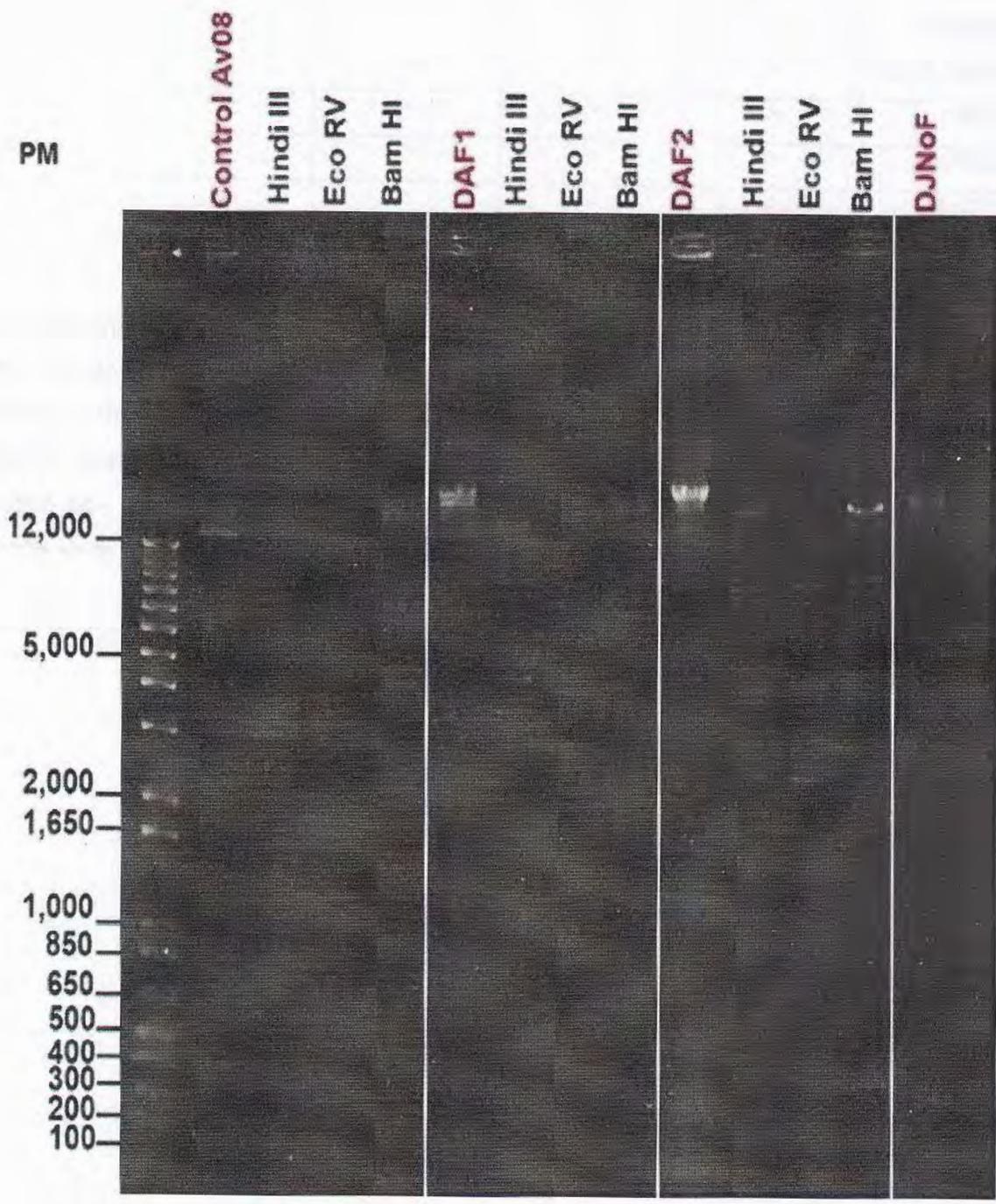


Figura 16. Electroforesis del corte de enzima de restricción (HindIII, EcoRV y BamHI), de los bacteriófagos Av08, DAF1, DAF2 y DJNoF en gel de agarosa.

Con la finalidad de confirmar los resultados se realizaron repeticiones de la evaluación del perfil genómico utilizando el marcador O'GeneRuler DNA LadderMix, ready-to-use #1173 con el colorante Bromuro de etidio, donde se utilizaron las siguientes enzimas: Hindi III, Eco RV y se añadió una nueva Eco RI.

Los resultados del cálculo de los pesos moleculares corresponden a una recolección de ambas corridas del perfil genómico dependiendo en donde se apreciaran mejor las bandas. Para el control Av08 las enzimas que digirieron el ADN son: Hindi III con un total de peso molecular 2,300 Kb y Eco RV con un total de 3,000 Kb. Para el fago DAF1 las enzimas que digirieron el ADN son: Hindi III con un total de 23,950Kb, Eco RV con un total de 19,700Kb y Eco RI con un total de 8,500Kb. El en el caso del fago DAF2 las enzimas que digirieron el ADN son: Hindi III con un total de 25,000Kb y Eco RV con un total de 35,500Kb. Para el fago DJNoF se realizó la corrida para verificar la cantidad de ADN existente del bacteriófago, como se muestra en la figura 17. Nuestros resultados coinciden con un estudio realizado por López y col (2011) donde evaluaron muestras ambientales del estado de Sinaloa México y utilizaron las enzimas Eco RI, Bam HI, Hindi III y Eco RV para la caracterizaron genómica de bacteriófagos infectivos para *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 de heces de bovinos, cerdos y aves de corral, en esta investigación solo las enzimas Hindi III y Eco RV pudieron digerir bacteriófagos ADN mientras que Eco RI y Bam HI no pudieron digerir cualquier fago ADN..

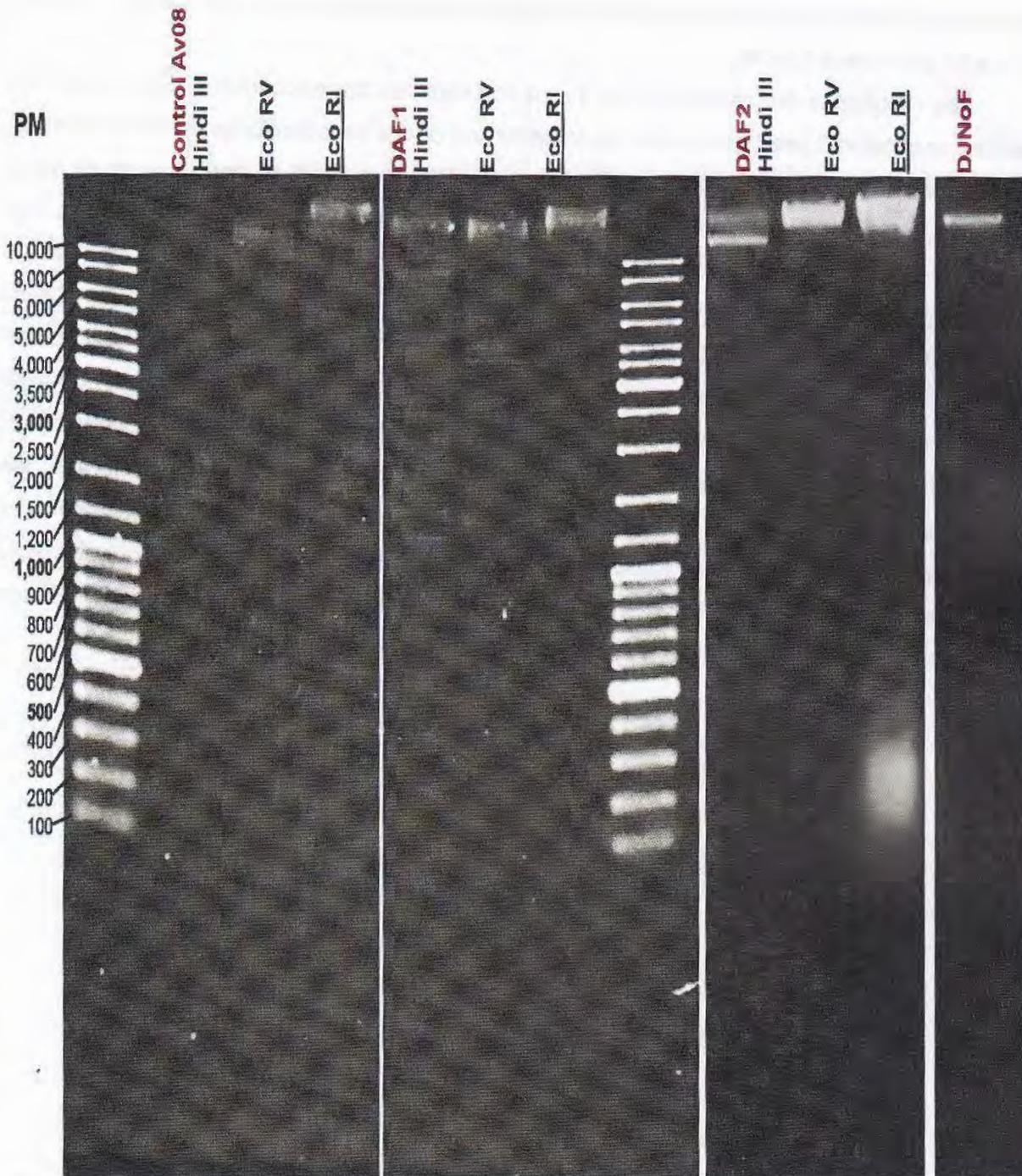


Figura 17. Electroforesis del corte de enzima de restricción (HindIII, EcoRV y EcoRI), de los bacteriófagos Av08, DAF1, DAF2 y DJNoF en gel de agarosa.

Una vez verificada la cantidad de ADN en el bacteriófago DJNoF se realizó una tercera corrida con la finalidad de digerir el ADN del fago DJNoF. Sin embargo en la figura 18 muestra la incapacidad para digerir el ADN del fago DJNoF por las enzimas Eco RI, Bam HI, Eco RV e Hindí III, esto puede ser debido a la falta de sitios diana para las enzimas de restricción probados (Krylov y col, 2006). Sin embargo, la enzima Bam HI mostró una digestión parcial. En Chile se realizó la caracterización de un bacteriófago capaz de lisar *Salmonella enteritidis*, cortando los sitios de ADN bicatenario con la enzima de restricción Eco RI (Santander y Robeson, 2000).

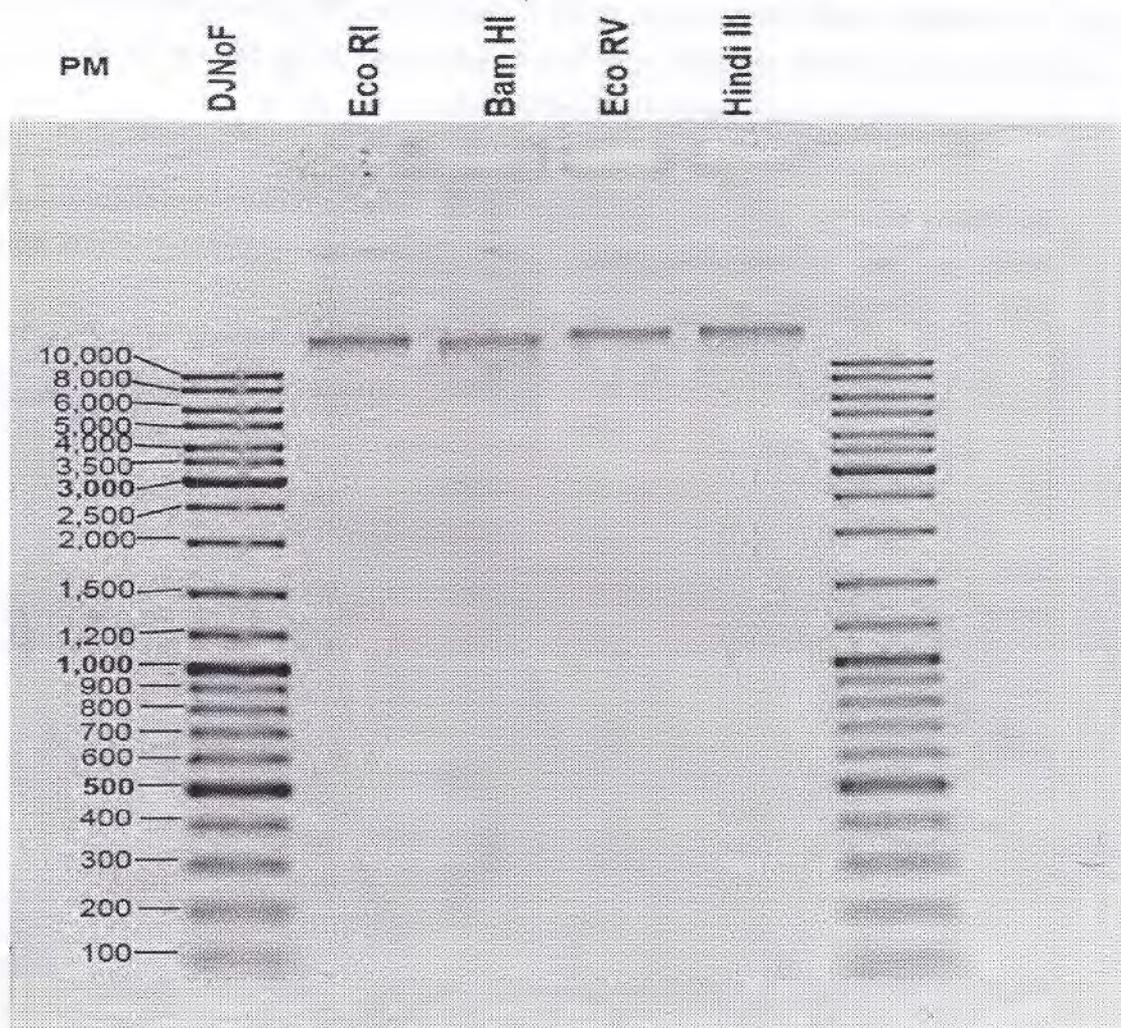


Figura 18. Electroforesis del corte de enzima de restricción (Eco RI, Bam HI, Eco RV e Hindí III), del bacteriófago DJNoF en gel de agarosa.

CONCLUSIÓN

- Se aislaron en total tres bacteriófagos provenientes de las comunidades de Allende y Altos de Jecopaco del sur de Sonora. Los fagos ADN (DAF1 y DAF2) fueron capaces de lisar la bacteria de *Escherichia coli* O157 EC-48, mientras que el fago ADN (DJNoF) fue infectivo para la bacteria *Salmonella choleraesuis* (10708), en el caso de *Escherichia coli* O157:H7 no se encontraron bacteriófagos capaces de lisar esta bacteria.
- Los bacteriófagos ADN bicatenarios aislados mostraron diferencias genéticas, esto al realizar una comparación en los fragmentos de ADN, viendo las diferencias en el peso molecular mostrado en cada banda de electroforesis.
- Los resultados sugieren que los bacteriófagos líticos aislados pueden ser utilizados para el control de las bacterias patógenas como *Salmonella choleraesuis* (10708) y *Escherichia coli* O157 EC-48.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abedon S. 2008. Bacteriófago ecología: el crecimiento demográfico, la evolución y el impacto de los virus bacterianos, p. xviii, 508 p. Universidad de Cambridge, Cambridge; Nueva York.
2. Ackermann H. 2003. Observaciones bacteriófagos y evolución. La investigación en Microbiología, 154 (4): 245-251.
3. Ackermann H. 2005. Clasificación bacteriófago, pp. 67-89. En: Kutter E., Sullakvelidze A. (editores). Los bacteriófagos: Biología y aplicaciones. Centro de Recursos de Carreras Universidad de Florida, Florida, EE.UU.
4. Ackermann H. 2007. 5500 Fagos examinados en el microscopio electrónico. Archivos de virología, 152: 227-243.
5. Barrow P, Soothill J. 1997. Los bacteriófagos terapia y profilaxis: redescubrimiento y renovada evaluación de potencial. Tendencias en Microbiología, 5 (7): 268 a 271.
6. CDC, Centros de Control y Prevención de Enfermedades. 2000. Cuidado de la salud Internet. pp. 82. Disponible en: <http://www.cdc.gov>
7. Chaidez C. 2015. Virus que combaten la contaminación alimentaria. Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
8. Chover J, Pastor S, Roig F, Roselló M, Salvo C, Castellanos I. 1995. Brote de Gastroenteritis asociado al consumo de agua, posiblemente producido por virus tipo Norwalk o semejantes. Revista Española. Salud Pública. Volumen 69 No.2: 243-254.
9. Cliver D. 1984. Importancia del agua y el medio ambiente en la transmisión del virus de la enfermedad. Monograma de Virología, 15: 30-42.

10. Davis R, Zivanovic S, D'Souza D, Davidson P. 2012. Eficacia de quitosano en la inactivación de sustitutos virales entéricos. *Microbiología de Alimentos*, 32: 57-62.
11. Donato A. 2007. Enfermedades alimentarias. Disponible en: <http://salud.bioetica.org/enfalimentarias.htm>. (Fecha de acceso: 11 de diciembre de 2015).
12. Drasar B, Hill M. 1974. Flora humana intestinal. Prensa académica, Londres, Reino Unido.
13. Ewing WH. 1985. Identificación de bacterias. 4th. Edition, El sevier, 1985.
14. Elizaquível P, Azizkhani M, Aznar R, Sánchez G. 2013. El efecto de los aceites esenciales sobre sustitutos de Norovirus. *Control de Alimentos*, 32: 275-278.
15. Fernández A, Molina M, Álvarez A, Alcántara M, Espigares A. 2001. Transmisión fecohídrica y virus de la hepatitis A. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 1: 8-24.
16. Fierro F. 2014. Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Primera edición. Páginas 43-68.
17. Fiorentin L, Vieira N, Barioni J y Barros S. 2004. Propiedades de caracterización In vitro e In vivo de bacteriófagos líticos de *Salmonella* aisladas a partir de estratos de corral.
18. Flores JJ, Suarez GJ, Puc MA, Hereida MR, Vivas ML, Franco J (1995). Calidad bacteriológica del agua potable de la Ciudad de Mérida, México. *Revista Salud Pública de México*. Volumen 37 No. 3:236-239.
19. García P, Martínez B, Obeso J, Rodríguez A. 2008. Los bacteriófagos y su aplicación en la seguridad alimentaria. *Las letras en Microbiología Aplicada*, 47:479-485.
20. Gaviria G, González M, Castaño J. 2012. Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* DH5 α a partir de aguas residuales. *Revista, MVZ*

21. Gerba C, Keswick B, DuPont H, Campos H. 1984. Aislamiento de rotavirus y virus de Hepatitis A partir de agua potable. *Monografías de Virología* 15: 119-125.
22. Godoy P, Borrull C, Palà M, Caubet I, Bach P, Nuñ C, Espinet L, Torres J, Mirada G. 2003. Brote de gastroenteritis por agua potable de suministro público. *Gaceta Sanitaria* Volumen 17 No.3: 204-209.
23. Gortáres, Castro L, Mondaca P, Meza M, Balderas J, López J y Lares F. 2008. Patógenos emergentes como restricción para el reusó de las aguas residuales municipales tratadas de Cd. Obregón, Sonora, *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 5 (1): 9-21, 2009.
24. Goyal S. 2006. *Los virus en los alimentos*, p. xvii, 345 pp. Springer, Nueva York.
25. Hagens S, Offerhaus M. 2008. Bacteriófagos: Nueva Arma para la Seguridad Alimentaria. *Tecnología de alimentos*. Volumen 62, Número 4.
26. Hejkal T, Keswick B, LaBelle RL, Gerba C, Sánchez Y, Dreesman G, Hafkin B, Melnick J. 1982. Los virus en un suministro de agua de la comunidad asociada con un brote de gastroenteritis y hepatitis infecciosa. *Periódico Asociación Americana de Trabajos con el Agua*, 74: 318-321.
27. Hernández R, Pla R y Jiménez Z. 2009. Obtención de fago de *Salmonella* sp a partir de aguas residuales, como potencial biocontrol en alimentos. Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública. Universidad Autónoma de Nuevo León, México; Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
28. Holt J. 1994. *Manual de la bacteriología determinativa*, 9ª ed. Williams y Wilkims, Nueva York.
29. Hopkins R, Gaspard G, Williams F, Karlin R, Cukor G, Blacklow N. 1984. Un brote gastroenteritis transmitidas por el agua de la comunidad: Pruebas para el rotavirus como agente. *Revista Panamericana de Salud Pública*, de 74: 263-265.

30. Huff W, Huff G, Rath N, Balog J, Donoghue A. 2005. Alternativas a los antibióticos: utilización de bacteriófagos para tratar Colibacilosis y evitar alimentos patógenos. *PoultryScience*, 84 (4):655-659.
31. Isaac A, Lezama C, Ku P, Tamay P. 1994. Calidad sanitaria de los suministros de agua para consumo humano en Campeche. *Salud Publica de México*, Volumen 36, No. 6:655-661.
32. Islam M, Morgan J, Doyle M, Phatak S, Millner P, Jiang X. 2004. La persistencia de *Salmonella* entérica serovariedad *typhimurium* en la lechuga y el perejil, y en suelos en los que se cultivan en los campos tratados con compost de estiércol contaminados o agua de riego. *Alimentos patógenos y enfermedades*, 1 (1): 27-35.
33. Inal J. 2003. Fototerapia: una reevaluación de los bacteriófagos como antibióticos. *Archivo de inmunología y terapias experimentales (Warsz)* 51: 237-244.
34. Jamalludeen N, Johnson R, Shewen P. 2009. Evaluación de bacteriófagos para la prevención y tratamiento de la diarrea debido a la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica experimental. *Veterinario microbiológico* 136:135-141
35. Kaplan J, Goodman R, Schonberger L, Lippy E, Gary G. 1982. La gastroenteritis por virus Norwalk: un brote asociado con un sistema de agua municipal. *El periódico de enfermedades infecciosas*, 146(2):190-197.
36. Katzenelson E, Mills D. 1984. La contaminación de verduras con virus animales a través de las raíces. *Monograma de Virología*, 15: 216-220.
37. Kropinski A. 2006. La terapia de fagos - Todo lo viejo es nuevo otra vez. *Diario Medico canadiense de enfermedades microbiológicas infecciosas*. 17: 297-306.
38. Krylov V, Miller S, Rachel R, Biebl M, Pleteneva E y Schuetz M. 2006. Bacteriófagos ambivalentes de diferentes especies activas en *Escherichiacoli*K12 y cepas de *Salmonella* sp. 106-114. Doi: 10.1134-S1022795406020025.

39. Kutter E, Sulakvelidze A. 2005. Bacteriófagos: biología y aplicaciones, p. 510. Prensa CRC, Boca Ratón, FL.
40. Labrada R. 2007. Determinación de bacteriófagos PRD-1 y MS-2 como indicadores de contaminación en aguas procedentes de comunidades rurales de San Ignacio Rio Muerto. Tesis que para obtener el título de Ingeniero Biotecnología. Instituto Tecnológico de Sonora.
41. Lapidot A, Romling U, Yaron S. 2006. La formación de biopelículas y la supervivencia de *Salmonella typhimurim* en perejil. Revista internacional de microbiología de los alimentos, 109: 229-233.
42. Le L, Popoff M. 1987. Solicitud de una opinión. Designación de *Salmonella* entérica sp. Como la especie tipo y sólo del género *Salmonella*. Revista internacional de la bacteriología sistemática 37: 465-468
43. León J, Chaidez C. 2011. Caracterización biológica, morfológica y genética de bacteriófagos como agentes de biocontrol de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7 en frutas y hortalizas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)
44. Li D, Baert L, Zhang D, Xia M, Zhong W, Van Coillie E, Jiang X, Uyttendaele M. 2012. Efecto del extracto de semilla de uva en Norovirus Humano GII. Norovirusmurino 4 y 1 en suspensiones virales, en discos de acero inoxidable, y en lavados de lechuga con agua. Microbiología aplicada y ambiental 78: 7572-7578.
45. Libby S, Hasey T, Altier C, Potter J, Gyles C. 2008. Patogénesis de bacterias infecciosas en animales, 3rd ed. Publicación Blackwell, Ames, Iowa, USA. Pp. 143- 168.
46. López O, Castro N, León J, Gonzales A y Chaidez C. 2011. Caracterización de bacteriófagos con un efecto lítico en varios serotipos de *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7. Pag 1052-1051. Doi: 2.10.1139-W11-099.

47. Markarov R. 2011. Vibriófagos en el cultivo larvario del camarón y su relación con la incidencia y virulencia de *Vibrio*. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz Baja California Sur.
48. Márquez A. 2013 Farmacocinética de los vibriófagos Vpms1 y FPL14D en juveniles de Camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y su potencial terapéutico para el control de vibriosis. Universidad Autónoma de Baja California Sur, Área de Conocimiento de Ciencias del Mar, Departamento Académico de Biología Marina.
49. MODNOM-127-SSA1-1994. Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México D.F.
50. Nataro J, Kaper J. 1998. *Escherichia coli* diarreogénica. Microbiología clínica. Rev. 11: 142-201.
51. Natvig E, Ingham S, Ingham B, Cooperband L, Roper T. 2002. *Salmonella* entérica serovariedad *Typhimutium* y *Escherichia coli* contaminación de raíz y hoja de verduras cultivadas en suelos con estiércol bovino incorporado. Microbiología aplicada y ambiental, 68(6):2737-2744.
52. Oliveira M, Viñas I, Colás P, Anguera M, Usall J, Abadias M. 2014. Efectividad de un bacteriófago en la reducción de *Listeria monocytogenes* en las frutas frescas cortadas y zumos de frutas. Microbiología de los alimentos. 38: 137-142.
53. Ortega S y Airola V. 2005. Calidad microbiológica del agua del canal bajo al mezclarse con el efluente de la planta sur de tratamiento de aguas residuales. Tesis que para obtener el título de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto Tecnológico de Sonora.
54. PacSa M, Arnedo A, Benedicto J, Arranz A, Águila V, Guillén F (1998). Brote epidémico por *Salmonella richmond* en Castellón, España Revista Panamericana. Salud Pública, Volumen 3 No.2: 96-101.

55. Parrilla M, Vazquez L, Saldate E, Nava L. 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Pública Mexicana* 1993; Volumen 35(5):456-463
56. Pettygrove S, Asano T. 1985. El riego con aguas residuales municipales recuperadas un manual de orientación. Editores de Lewis. Estados Unidos de América.
57. Pimienta E. 2013. Tratamiento con bacteriófagos como una alternativa antimicrobiana potencial. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, volumen 44, página 7.
58. Quiroz E. 2005. Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz Baja California Sur.
59. Rojas M. 2005. Bacteriófagos específicos para *Rhodobacters phaeoides*: Aislamiento, caracterización y potenciales transductores. Tesis doctorado en ciencias. Oviedo: Universidad de Oviedo.
60. Romero R. 2007. Microbiología y parasitología humana. 3ra ed. México (DF): Editorial Médica Panamericana. 221 pp.
61. Santander J y Robeson J. 2000. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos activos contra *Salmonella enteritidis* y su ensayo en *Salmonella pullorum*. Universidad católica de Valparaíso. Instituto de Biología. Laboratorio de bacteriología. Proyecto D.I.U.CV 122.759.2000
62. Salinas E, Aragon A, Allue M, Lópaz M, Jiménez M, Domínguez M. 2000. Brote de Criptosporidiosis en Guadarrama (Comunidad Autónoma de Madrid). *Revista Española. Salud Pública*. Volumen 74 No. 5-6: 527-536.
63. Sánchez H, Vargas M, Méndez J. 2000. Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. *Revista Salud Pública de México*. Volumen 42 No. 5:397-406.

64. Segundo N, Hernández E, López O, Torres O. 2010. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(3):17-26.
65. Shelobolina E, Sullivan S, O'Neil K, Nevin K, Lovley D. 2004. Aislamiento, caracterización y U (VI) -la reducción potencial de un anaerobio facultativo, Bacteria resistente a los ácidos de pH bajo, nitratos y U (VI) – sedimentos contaminados del subsuelo y la descripción de *Salmonella sp* subterránea. Noviembre. *Microbiología ambiental y aplicada*, 70: 2959-65.
66. SINAVE/DGE/SALUD. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Perfil epidemiológico de las enfermedades infecciosas intestinales. 2014. Secretaria de Salud en México.
67. Skurni M, Strauch E. 2006. Fagoterapia: hechos y ficción. *Revista Internacional de Microbiología Médica*, 296: 5-14
68. Spricigo D. 2011. La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis doctoral.
69. Su L, Chiu C. 2007. *Salmonella*: importancia clínica y la evolución de su nomenclatura. *Periódico Medico Chang Gung*, 30: 210-219.
70. Su X, D'Souza D. 2011. El extracto de semilla de uva para el control de virus entéricos humanos. *Microbiología ambiental y aplicada*, 77: 3982-3987.
71. Su X, D'Souza D. 2013. Extracto de semilla de uva para la reducción de virus transmitidos por los alimentos en los productos. *Microbiología de Alimentos*, 34: 1-6.
72. Su X, Zivanovic S, D'Souza D. 2009. Efecto del quitosán sobre la infectividad de Norovirusmurino, *Calicivirus felino*, y bacteriófago MS2. *Periódico de protección de alimentos*, 72: 2623-2628.

73. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. 2001. Terapia de bacteriófagos. Agentes antimicrobianos y quimioterapia, 45(3):649-659.
74. Tortora G, Funke B, Case C. 2010. Microbiología: una introducción, p. 1 v. (varias páginas). Pearson Benjamín Cummings, San Francisco, CA.
75. Talledo M, Gutierrez S, Merino F. 1994. Una alternativa para la detección de *Vibrio Cholerae* en aguas. Revista de Perú Epidemiología, 7:30-34.
76. Talledo M, Gutierrez S, Merino F, Rojas N. 1998. Detección, cuantificación y caracterización morfológica de *Vibrio cholerae* indicador de bacteriófagos, Revista Perú Biología 5:12-16.
77. Welch P, Joanna D, Clarke W, Trinidad A, Pender D, Bernstein S, MacDougall L, Adesiyun A. 2000. La calidad microbiana del agua en las comunidades rurales de Trinidad. Revista Panamericana Salud Pública, volumen 8 No.3: 172-180.
78. Wilcock B, Schwartz K. 1993. La salmonelosis. En: Enfermedades LEMAN A.D. de cerdos. 7ª ed. Wolfe, Londres, pp. 570-583.

T-170024