



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Posgrado en Ciencias Químicas**

**“Activación de bacteriófagos, como uso potencial en el tratamiento de bacterias resistentes a antibióticos”**

Tesis que para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Químicas**

Presenta:

**Alvarez Reyes Maria Fernanda**

Director de Tesis:

**Dr. Jaime Ruiz García**

Codirector de Tesis:

**Dra. María Verónica Villagrana Escareño**

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: JULIO 2025



**UASLP-Sistema de Bibliotecas**  
**Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Activación de bacteriófagos, como uso potencial en el tratamiento de bacterias resistentes a antibióticos © 2025 por Alvarez Reyes Maria Fernanda tiene licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Este proyecto se realizó en el Instituto de Física adscrito a Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre enero de 2023 y marzo de 2025, bajo la dirección de Dr. Jaime Ruiz García y Dra. María Verónica Villagrana Escareño y fue apoyado por recursos propios del Dr. Jaime Ruiz García, beca SECIHTI 1275678 para la realización del trabajo.

El programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del SECIHTI, registro 000519. Número de la beca otorgada por SECIHTI: 1275678. Número de CVU: 1275678.

Los datos del trabajo titulado *“Activación de bacteriófagos, como uso potencial en el tratamiento contra bacterias resistentes a antibióticos”* se encuentran bajo el resguardo de la y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

## Solicitud de Registro de Tesis Maestría

San Luis Potosí, S.L.P. a 06/ día /2025

### Comité Académico

#### En atención a: Coordinador/a del Posgrado

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de tema de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: “Activación de bacteriófagos, como uso potencial en el tratamiento contra bacterias resistentes a antibióticos”

que desarrollará el/la estudiante: Alvarez Reyes Maria Fernanda

bajo la dirección y/o Co-dirección de: Dr. Jaime Ruiz García y Dra. María Verónica Villagrana Escareño.

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

( ) Sí debido a que:

( ) No

(X) No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

**A T E N T A M E N T E**

---

Nombre y firma del estudiante

---

Nombre y firma del/la Director/a de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Posgrado en Ciencias Químicas**

**“Activación de bacteriófagos, como uso potencial en el  
tratamiento de bacterias resistentes a antibióticos”**

Tesis que para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias Químicas**

Presenta:

**Alvarez Reyes Maria Fernanda**

**SINODALES:**

**Presidente: Dra. María Verónica**

**Villagrana Escareño**

**Secretario: Dr. Jaime Ruíz García**

**Vocal: Dra. Ruth Elena Soria Guerra**

**Vocal: Dr. Pablo Luis Hernández**

**Adame**

---

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

FECHA: JULIO 2025

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO**

Dr. Jaime Ruiz García: Director de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. María Verónica Villagrana Escareño: Codirector de tesis. Adscrito al Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Jaime Ruiz García: Tutor de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dra. Ruth Elena Soria Guerra: Asesor externo de la Facultad de Ciencias Químicas. Adscrito al Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Pablo Luis Hernández Adame. Sinodal suplente. Adscrito al Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P.

## Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a 06 / 26 / 2025

En la ciudad de San Luis Potosí el día 26 del mes de JUNIO del año 2025 El que suscribe María Fernanda Alvarez Reyes alumno(a) del programa de posgrado en Ciencias Químicas adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Jaime Ruiz García y Dra. María Verónica Villagrana Escareño y cede los derechos del trabajo titulado “Activación de bacteriófagos, como uso potencial en el tratamiento de bacterias resistentes a antibióticos” a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección fernandaalvarez18qfb@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Nombre y firma del alumno

## Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 07/ 01 / 2025

**L.B. María Zita Acosta Nava**  
**Biblioteca de Posgrado FCQ**

**Asunto:** Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada “Activación de bacteriófagos, como uso potencial en el tratamiento de bacterias resistentes a antibióticos” presentada por el autor Maria Fernanda Alvarez Reyes. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Químicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 11% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

---

Coordinador Académico del Posgrado  
en Ciencias Químicas

## **Agradecimientos**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de física biológica del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

A la Facultad de Ciencias Químicas, especialmente a la Maestría en Ciencias Químicas.

Mi agradecimiento a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo financiero otorgado para realizar estudios de Maestría (CVU/Becario): 1275678.

Al Dr. Jaime Ruiz García, por aceptarme en su laboratorio y permitir realizar mi posgrado en sus instalaciones y brindarme apoyo durante su realización.

A la Dra. María Verónica Villagrana Escareño, quien me acompañó durante la duración del posgrado, me brindó su conocimiento y me apoyó en la realización de toda la investigación.

## Resumen.

La resistencia a antimicrobianos (RAM), es un problema mayor de salud pública, declarado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC por su nombre en inglés), se estima que para el año 2050 halla 10 millones de muertes al año causadas por bacterias multirresistentes.

Los bacteriófagos son un tipo de virus que infectan y lisan bacterias, estos habían sido utilizados para tratar infecciones causadas por bacterias antes de la aparición de los antibióticos, sin embargo, quedaron en el olvido.

Los bacteriófagos tienen actividad terapéutica en infecciones bacterianas, el único requisito es que se utilicen bacteriófagos del tipo lítico para asegurar la muerte de la bacteria, así como la degradación de sus productos tóxicos.

En la investigación realizada en este proyecto, bacteriófagos lisogénicos obtenidos de cultivos bacterianos de las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* fueron inducidas con ayuda de luz UV a ciclo lítico, los bacteriófagos obtenidos fueron evaluados con equipo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS por sus siglas en inglés) para determinar el tamaño de partícula, se determinó la concentración de proteínas y ácidos nucleicos con un espectrofotómetro UV/VIS, la morfología fue caracterizada por microscopio electrónico de transmisión y se evaluó la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos con la siembra en doble placa, de acuerdo a los resultados obtenidos, se obtuvo más de una población de bacteriófagos, de acuerdo a la forma observada en microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) son posiblemente de la familia de los *Caudoviricetes* y *Corticoviridae*, y los bacteriófagos inducidos ejercieron actividad antimicrobiana sobre sus bacterias.

Palabras clave:

Bacteriófagos, bacterias, resistencia, antibióticos, inducción.

## Summary.

Antimicrobial resistance (AMR) is a major public health problem, declared by the WHO, CDS, and it is estimated that by the year 2050 there will be 10 million deaths per year caused by multidrug-resistant bacteria.

Bacteriophages are a type of virus that infect and lyse bacteria; they had been used to treat infections caused by bacteria before the appearance of antibiotics, however, they were forgotten.

It has been demonstrated that bacteriophages have therapeutic activity in bacterial infections, achieving very promising results, the only requirement is that bacteriophages of the lytic type are used to ensure the death of the bacteria, as well as the degradation of their toxic products.

In the research carried out in this project, lysogenic bacteriophages obtained from bacterial cultures of the strains *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were induced with the help of UV light to lytic cycle, the bacteriophages obtained were evaluated with dynamic light scattering equipment (DLS) to determine the particle size, the concentration of proteins and nucleic acids was determined with a UV / VIS spectrophotometer, the morphology was characterized by transmission electron microscope and the antimicrobial activity of bacteriophages was evaluated with double plate seeding, according to the results obtained, more than one population of bacteriophages was obtained, according to the form observed in Transmission Electron Microscopy (TEM) they are possibly from the family of caudoviricetes and corticoviridae, and the induced bacteriophages exerted antimicrobial activity on their bacteria.

Key words:

Bacteriophages, bacteria, resistance, antibiotics, induction.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>76</b>

## Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza para la salud y el desarrollo mundial, en 2019 en el país hubieron 1,270,000 muertes causadas por bacterias resistentes a antibióticos, además de que se estima que para el año 2050 halla 10 millones de muertes por año en el mundo, el impacto y la emergencia que genera la creciente capacidad de las bacterias a los antimicrobianos es preocupante, además hay estudios en los que se demuestra que las bacterias pueden permanecer en latencia al no haber alimento, y vuelven a replicarse al encontrarlo, un rasgo en su evolución muy adelantado y poco esperado [1].

Como consecuencia de la farmacorresistencia, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces, por lo que las infecciones son cada vez más difíciles o imposibles de tratar.

Se necesitan urgentemente nuevos antibacterianos, que sean innovadores, y, sobre todo, verdaderamente efectivos contra las bacterias contra las que los tratamientos farmacológicos ya no son efectivos.

El uso excesivo y el mal uso de antibióticos desde su descubrimiento es la causa principal por la que se ha desarrollado la resistencia [2], hace que ya no haya disponibilidad de tratamiento efectivo para infecciones de más complejidad que pueden conducir a la muerte, como la septicemia o infecciones a nivel sistémico, por esta razón, la Organización Mundial de la Salud ha hecho una lista de prioridad de bacterias resistentes, esta ha sido actualizada en 2024, basados en la carga de infecciones que generan estas bacterias y el impacto que tiene en la salud pública, esto para poder centrarse en ellas y descubrir nuevas terapias que puedan ser efectivas en infecciones causadas por las mismas.

Esta lista de prioridad es la que sigue: Las bacterias que tienen **prioridad crítica** son: *Acinetobacter baumannii* que es resistente a carbapenémicos; familia *Enterobacteriaceae* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación; *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos, estas familias de enterobacterias generan gran preocupación ya

que agrupan más de 100 especies de bacterias; *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina. Como **prioridad alta**, están: *Salmonella typhi* resistente a fluoroquinolonas; *Shigella spp.* Resistente a fluoroquinolonas; *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina; *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos; Salmonelas no tifoideas resistentes a fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a cefalosporinas 3ª generación y/o a las fluoroquinolonas; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Como **prioridad media**, se encuentran: estreptococos del grupo A resistentes a macrólidos; *Streptococcus pneumoniae* resistente a macrólidos; *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina; estreptococos del grupo B resistente a macrólidos [1].

Los cambios en la prioridad en la búsqueda de nuevas alternativas antibióticas parecen impresionantes, ya que solo del 2017 a 2024, las bacterias que entraron a prioridad (en sus tres rangos) crecieron, cada vez adquieren más capacidad de resistencia y a mucha más velocidad que sus antecesores, además de que hacen que una infección que se consideraba “común” ahora sea mortal debido a la falta de tratamiento y aunado a ello la patogenicidad elevada de las bacterias.

Desde la primera aparición de genes de resistencia, 20 años después del descubrimiento de los antibióticos [2], diferentes grupos de bacterias comenzaron a adquirir genes de resistencia frente a los nuevos antibióticos y actualmente la penicilina que fue en su momento un medicamento revolucionario y que salvó miles de vidas ya no es eficaz, el acceso a antibióticos ya nos es posible sin receta médica, ante la urgencia de una correcta dispensación y administración de antibióticos, hay guías que permiten determinar si se necesita un antibiótico o no.

El objetivo del presente trabajo de tesis de maestría es estudiar la obtención de bacteriófagos de las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P que están en su estado lisogénico e inducirlos a ciclo lítico mediante luz UV, y determinar su actividad antimicrobiana ante sus bacterias. Los trabajos realizados de bacteriófagos como terapia, en su mayoría han sido en bacteriófagos de tipo lítico, y han sido obtenidos de fuentes externas como agua tratada, muestras biológicas, en caso de estudios realizados utilizando bacteriófagos del tipo lisogénico, estos fueron obtenidos de muestras externas, por

lo que los experimentos realizados en esta investigación son nuevos y brindan otra perspectiva, ya que los bacteriófagos que se utilizaron, se obtuvieron de las mismas bacterias con las que se trabajaron, activándolos con ayuda de luz UV, se evaluó su actividad bactericida, obteniendo resultados prometedores, ya que hubo inhibición bacteriana, además de que en la caracterización por morfología con ayuda de microscopio electrónico de transmisión se observó que hay más de un tipo de bacteriófagos, lo que resulta interesante ya que los bacteriófagos lisogénicos tienen alta flexibilidad, es decir que pueden ser fácilmente modificados vía genética, añadiendo algún residuo que pueda potencializar la actividad antimicrobiana, o alguna modificación para evitar el desarrollo de resistencia, entre otros [3].

## **ANTECEDENTES**

Los bacteriófagos son un tipo de virus, su nombre proviene del griego “phageton”, que significa comedor de bacterias, se cree que fueron descubiertos en los años 1900's por Frederik Twort y Félix D'Herelle, sin embargo, se tiene documentado que el primer avistamiento de bacteriófagos, lo llevó a cabo el bacteriólogo inglés Ernest Hankin, cuando trabajaba cultivos de *Vibrio cholerae* que fueron colectados de muestras obtenidas del Río Ganges y Jumna, en los cuales observó que el crecimiento no fue uniforme si no que fue limitado, por bacteriófagos [2].

Frederik Twort trabajó con *Micrococcus sp.*, y planteó tres hipótesis, su primera hipótesis sugería, que el *Micrococcus sp.* segregaba enzimas lo suficientemente pequeñas para atravesar las membranas y así lisar la bacteria, una vez fuera se sintetizaban más enzimas y seguían con la lisis, y lo describía como un proceso infeccioso de la bacteria; la segunda hipótesis proponía un cambio en el ciclo de vida de la bacteria era lo que generaba el crecimiento limitado de la bacteria, y por último la tercera hipótesis, que fue la más acertada y con ella se partiría para el estudio de los bacteriófagos, propuso que esta limitación estaba dada por virus microscópicos, sin embargo, los estudios de Twort no tuvieron más futuro debido a la Primera Guerra Mundial [4].

Por otro lado, el microbiólogo franco-canadiense Félix D'Herelle considerado pionero en la biología molecular Fig.1, validó la tercera hipótesis de Twort, al examinar soldados franceses con disentería grave, colectó muestras de heces fecales de los soldados infectados, también preparó muestras libres de bacterias, las mezcló con cultivos de *Shigella* provenientes de los pacientes, la mezcla se sembró en cajas de agar para observar el crecimiento bacteriano, D'Herelle observó las mismas zonas transparentes y limitaciones en el crecimiento bacteriano, llamando este fenómeno como “parásitos intracelulares obligados”, confirmando así la tercera teoría de Frederik Twort [2].



**Fig.1** Fotografía de Félix D'Herelle, tomada del libro “Félix D'Herelle and the Origins of Molecular Biology” [4]

D'Herelle continuó las investigaciones probando la eficacia en fagos aislados en la eliminación de bacterias. En estas investigaciones se probó que no todos los bacteriófagos tienen la misma efectividad, ni todos logran la lisis bacteriana, logró llevar sus investigaciones a la administración de pacientes con cólera y otras enfermedades entéricas, obteniendo resultados prometedores y logrando la completa recuperación de los pacientes [2].

El 3 de septiembre de 1928, al regresar de vacaciones el Dr. Alexander Fleming profesor de bacteriología en el hospital de St Mary's en Londres, notó que en cajas

de Petri de cultivos de *Staphylococcus* había colonias de la bacteria por la caja, salvó por una zona en la que el crecimiento bacteriano por lo que en su momento llamó “jugo de moho” este moho después fue identificado como una rara cepa de *Penicillium notatum*, Fleming descubrió que este moho tenía el poder de acabar con un grupo muy peligroso de bacterias, como estreptococos, meningococo y bacilos de difteria, dio a sus asistentes Stuart Craddock y Frederik Ridley la difícil tarea de purificar la penicilina, sin embargo, la penicilina fue demasiado inestable, logrando solo preparar soluciones de material crudo, Fleming publicó sus experimentos en 1929, dejando a la penicilina solo como una terapia potencial. La investigación para el cultivo de penicilina y poder ser purificada, producida a gran escala bajo condiciones rentables y que se obtuviera una buena calidad del medicamento comenzó, ya que por la Segunda Guerra Mundial había una gran cantidad de soldados que necesitaban el fármaco, no fue hasta 1942 que se llegó a la técnica de producción a gran escala adecuada por farmacéuticas como Pfizer que se inició con el tratamiento de penicilina como medicamento [5]. Todo este auge de descubrimiento antibiótico, dejó de lado las investigaciones de bacteriófagos y fueron descartados como terapia antimicrobiana.

Alexander Fleming en una entrevista dada al periódico New York Times, advirtió que el mal uso de los antibióticos podría hacer que las bacterias generaran resistencia, sin embargo, esta advertencia fue inadvertida, 20 años después del descubrimiento de la penicilina surgieron las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina [2], confirmando los temores de Fleming, esta primera aparición de resistencia fue el comienzo de la adquisición de nuevas habilidades que permiten a las bacterias contrarrestar los efectos de los antibióticos, volviendo las infecciones bacterianas cada vez más difícil de tratar.

¿Por qué usar bacteriófagos? No son considerados organismos vivos ya que al pertenecer a los virus, son entidades dinámicas, a diferencia de los fármacos los cuales son sustancias químicas que inhiben o interrumpen determinado ciclo en la bacteria, su mecanismo de acción es mucho más radical ya que usa la maquinaria de la bacteria para poder multiplicarse y con ello lograr la lisis de la bacteria y de sus productos tóxicos, sin dañar el medio (paciente) [6], ya que muchos de los fármacos generan daño en ocasiones de forma irreversible órganos como riñón,

hígado o afectan algunos sentidos como el gusto, olfato u oído, lo que se evita con el uso de entidades como los bacteriófagos.

La Administración de Drogas y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), ha aprobado el uso de bacteriófagos bajo la guía de solicitud de nuevo fármaco en investigación (IND por sus siglas en inglés), además los bacteriófagos son usados en la industria de la comida como biocontroladores y también han sido utilizados como antibióticos veterinarios [7].

La terapia con bacteriófagos tiene múltiples ventajas, las cuales, las más importantes son las siguientes:

- Especificidad bacteriana: solo infectan cepas bacterianas concretas, dejando intactas al resto y sin dañar la flora del medio en el que se aplica el tratamiento. No causan trastornos en la microbiota, lo cual podría generar infecciones por microorganismos oportunistas.
- Auto regulación: aumentan su población en el sitio de infección, no se tiene que estar administrando constantemente, desaparecen automáticamente al no haber más organismos que infectar.
- Diferente mecanismo de acción a los antibióticos: permite tratar infecciones por bacterias para las que los antibióticos no son efectivos, además de que se ha documentado que las bacterias sacrifican los mecanismos de resistencia ya adquiridos en contra de los antibióticos, por lo que una terapia combinada es lo ideal en la lucha contra la resistencia bacteriana.

El uso de bacteriófagos como terapia antimicrobiana ya se había empleado en la antigüedad, incluso antes de los antibióticos, sin embargo, por la falta de investigación y con el auge del descubrimiento de los antibióticos, se dejaron de lado, ahora, ante la gran problemática actual, como es la resistencia a antimicrobianos, la pocas posibilidades de terapia, alergias propias de pacientes, enfermedades crónicas concomitantes, poco acceso, alto costo de antibióticos sofisticados o modificados, hace que sea imprescindible tomar en cuenta esta opción tan prometedora como los bacteriófagos, ya que son altamente específicos y son depredadores naturales de las bacterias y cada bacteriófago, tiene su grupo

específico de bacterias a infectar, lo que hace que sea una terapia en potencia y devolver la susceptibilidad a antimicrobianos existentes.

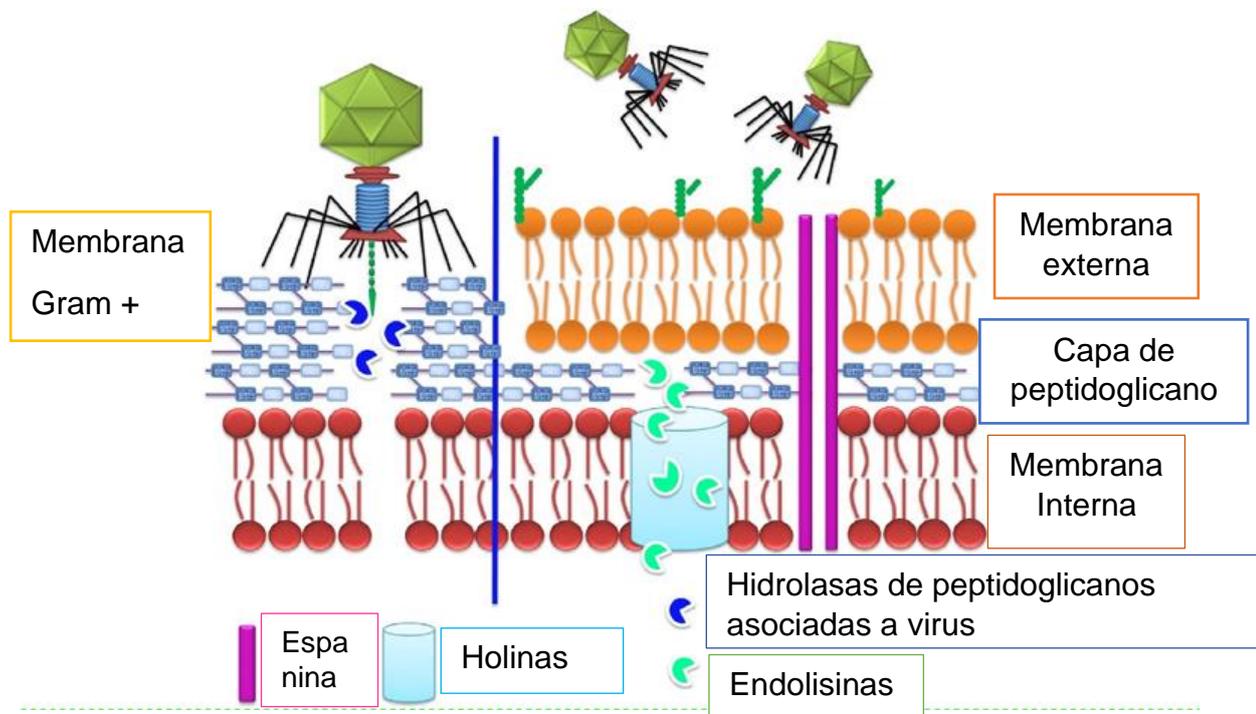
Los bacteriófagos siguen **dos ciclos**:

- **Lítico:** se siguen varios pasos, primero se da la unión del virus a la bacteria, mediada por proteínas de unión a receptores (RBP por sus siglas en inglés), que se unen a receptores específicos que se encuentran en la superficie bacteriana, como LPS (lipopolisacáridos), OmpA (proteína A de membrana externa) y OmpC (proteína C de membrana externa), a lo largo de la historia los bacteriófagos han evolucionado para producir enzimas como depolimerasas, estas enzimas ayudan al reconocimiento y degradación de polisacáridos capsulares y extracelulares que pueden encapsular los receptores bacterianos. Una vez que la unión se completó, el bacteriófago inyecta su material genético al hidrolizar la membrana externa con la ayuda de hidrolasas de peptidoglicanos asociadas a virus, al estar en el citoplasma, el material genético viral secuestra los mecanismos de replicación y traducción de la célula bacteriana, así como también utiliza la maquinaria metabólica para producir grandes cantidades de nuevos virus [8], esta interacción bacteria-bacteriófago es presentada en la Fig.2.

Una vez que haya suficientes virus dentro de la bacteria, los bacteriófagos generan endolisinas las cuales son enzimas que median la ruptura de la bacteria para la posterior liberación de los viriones, estas endolisinas tienen la capacidad de poder degradar peptidoglicanos sin dañar células aledañas, la producción de estas enzimas se da al final del ciclo lítico y ocurre muerte osmótica, posterior a la acción de las endolisinas, interviene una proteína llamada holina, esta regula la lisis del hospedero, esta proteína llega a una concentración umbral en etapas finales de infección, oligomerizando la membrana citoplasmática modificando su permeabilidad y perdiendo su polarización, produciendo agujeros, permitiendo que las endolisinas que se encuentran en el citoplasma accedan a la capa de peptidoglicanos. Las endolisinas se dividen en cinco grupos, estas son las acetilmuromidasas, transglicosilasas, glucosaminidasas, amidasas y endopeptidasas [8].

También existe otro grupo enzimático que participa en el ciclo lítico, las espaninas, las cuales median la fusión entre las membranas interna y externa de la bacteria (Gram -), después de que las endolisinas se hayan anclado a la pared de peptidoglicano, la espanina une la membrana interna y externa, lo cual conduce a la liberación del citoplasma y lisis celular [9].

El proceso de infección y eliminación de la bacteria se lleva a cabo de 10-20 min [10], sin embargo, este proceso se puede ver favorecido con ayuda de iones como  $Mg^{2+}$ [3], este ión ha demostrado que ayuda con la unión bacteriófago-bacteria.



**Fig. 2** Representación esquemática de la infección de bacteriófagos líticos [8]

- **Lisogénico:** Sigue el mismo curso que el ciclo lítico, sin embargo, en su genoma posee integrasas, las cuales permiten que el genoma vírico se una al genoma bacteriano, recombinasas las cuales permiten la modificación del material genético, enzimas represoras las cuales mantienen anclado el genoma vírico al genoma de la bacteria y por último excisionasas, que

permiten la salida del genoma vírico bajo ciertas condiciones [8], en este ciclo el genoma del bacteriófago se queda insertado en el genoma de la bacteria y se queda en latencia, aunque este ciclo puede ser inducido a ciclo lítico, esta inducción se da a través de daño al DNA, que termina en cambios en genes represores los cuales mantienen unido el genoma vírico al de la bacteria, la inducción se puede dar a través de estrés celular [7], los cuales pueden ser:

### **-Exposición a luz UV**

Un estudio realizado sobre el efecto de la luz ultravioleta en la activación de bacteriófagos lisogénicos demostró que hay alrededor de 728 genes responsables de esta inducción (este estudio se realizó induciendo el bacteriófago  $\lambda$  perteneciente a *E. coli*), sin embargo, esta activación no tiene ningún efecto sobre la expresión genómica del hospedero [11].

-Desecación

-Radiación ionizante

-Inducción universal de bacteriófagos. Mitomicina C.

-Cambios en el pH.

-Cambios en la temperatura.

-Cambios en los nutrientes del ambiente en donde se encuentran.

-Número de sitios de infección.

-Carbón orgánico, al terminarse el Carbono, el pH del ambiente baja, generando la inducción.

-Concentración de metales pesados.

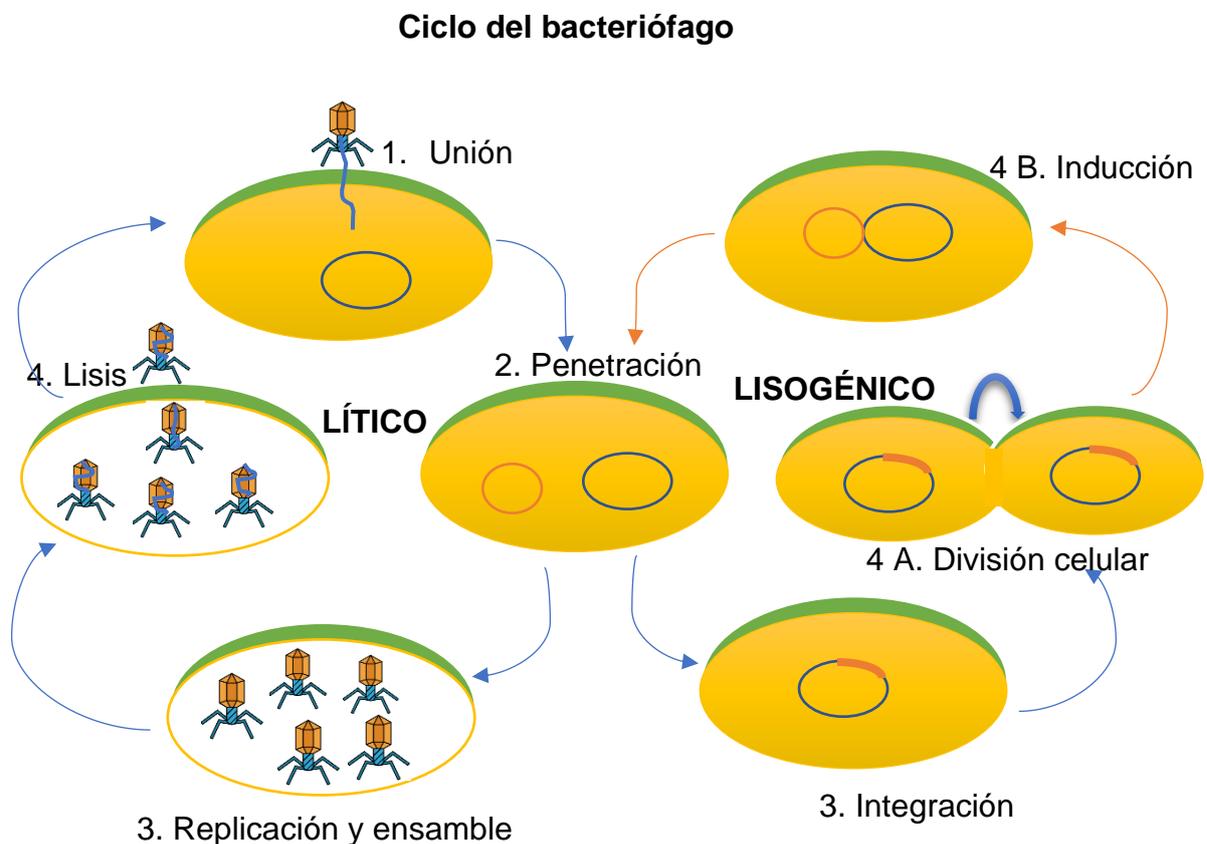
-Demanda Química de Oxígeno (COD por sus siglas en inglés).

-Antibióticos.

Todas estas condiciones pueden generar la mutación de genes represores que mantienen anclado el genoma vírico al de la bacteria, llevándolo a seguir el ciclo lítico [6].

El estrés celular que produce cualquiera de estas condiciones ya sea que actúen en conjunto o de modo aislado conducen a la producción de proteasas (proteína recA) destruyendo a la proteína que reprime la salida del genoma del bacteriófago con ayuda de excisionasas, por lo que el bacteriófago cambiará su ciclo a lítico. Los bacteriófagos lisogénicos son altamente modificables por técnicas génicas, se pueden quitar secciones del genoma evitando que se revierta la inducción [9,10], o también se pueden añadir secciones que potencialicen su acción, otra alternativa que se ha propuesto es la purificación de holinas, endolisinas y espaninas, enzimas que participan al final del ciclo lítico degradando la bacteria, estas enzimas se combinan con los bacteriófagos, y se potencializa la acción bactericida [8,12].

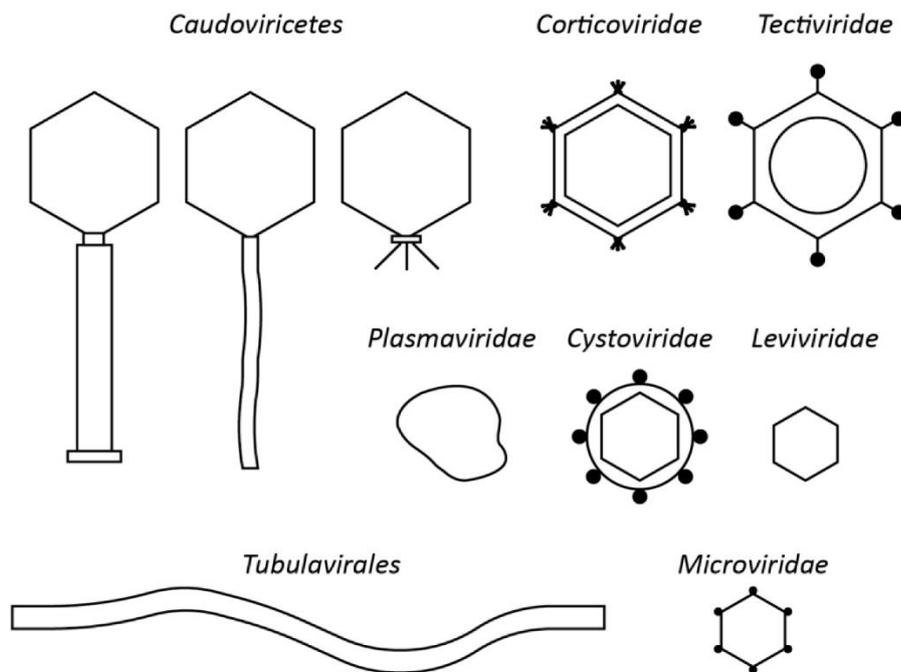
La figura 3 representa esquemáticamente el ciclo del bacteriófago, que puede irse por la vía lítica, lisogénica o bien inducir el ciclo lisogénico a lítico.



**Fig. 3** Representación esquemática del ciclo del bacteriófago

Los bacteriófagos tienen una morfología muy diversa, divididos en grupo de acuerdo a una nueva nomenclatura que se le asignó a los bacteriófagos debido a su gran diversidad y numerosas especies [13], estos grupos se pueden observar en la Fig.4, están rodeados de una cápside formada de proteínas, esta cápside protege al material genético del virus, miden de 24-200 nm.

Históricamente los bacteriófagos han sido identificados de acuerdo a su morfología, esto antes de la existencia de técnicas como PCR, para los bacteriófagos con cola, la nomenclatura aceptada fue la de David Bradley, él clasificó a los bacteriófagos en tres morfotipos, A cola contráctil, B cola larga no contráctil, C cola corta no contráctil. Sin embargo, esta nomenclatura de bacteriófagos resultó obsoleta al obtener la secuencia genética de diversos bacteriófagos, demostrando que hay más diferencias de las que se pensaban [13], por los bacteriófagos tuvieron que ser clasificados como sigue:



**Fig. 4** Morfología de bacteriófagos [13]

Los bacteriófagos son altamente abundantes en el ambiente (alrededor de  $10^{31}$  especies), uno de los reservorios de bacteriófagos que pueden ser usados potencialmente en infecciones causadas por bacterias, son aguas residuales, además han mostrado alta estabilidad en cuanto a temperatura (25-60 °C muestran mayor estabilidad) en temperaturas mayores a 60 °C, los bacteriófagos pierden efectividad rápidamente debido principalmente a la desnaturalización de las proteínas de la cápside y a pH (4-10) en pH mayores de 10 o menores de 4, ocurre la degradación de proteínas de la cápside y de ácidos nucleicos, la estabilidad de los bacteriófagos en estos rangos de pH y temperatura los hace viables a la administración en humanos sin la necesidad de añadir “protectores” para que puedan ejercer su acción [12,14]. Para la purificación de bacteriófagos obtenidos a partir de aguas residuales, la técnica ideal sería la cromatografía líquida, donde se obtienen los bacteriófagos con más grado de pureza [15,16].

Un punto a evaluar es la liberación de genes relacionados a resistencia cuando la bacteria es lisada por los bacteriófagos, por lo que una terapia combinada es lo más viable para asegurar la muerte de la bacteria y la eliminación de factores de patogenicidad que son contenidos dentro de la bacteria [12,17,18]. Estudios en los que se ha usado terapia combinada, han mostrado que hay mutaciones en la bacteria que la vuelven susceptible a antibióticos a los que era resistente, lo que es otra de las ventajas de la terapia con bacteriófagos, en un estudio realizado por Volozhantsev et.al se demostró que también disminuye la patogenicidad de las bacterias ya que se han visto mutaciones en proteínas que codifican para la membrana y en lipopolisacáridos los cuales brindan a las bacterias su capacidad de destrucción [17,18].

El uso de bacteriófagos de manera clínica es cada vez más creciente y los resultados son cada vez más prometedores; en California (EUA), se tienen bancos de bacteriófagos que están listos para usarse clínicamente, uno de las principales características de estos bancos es que los bacteriófagos están perfectamente secuenciados y caracterizados, esto para asegurar la efectividad, identidad y que los bacteriófagos no tengan genes que puedan dañar al paciente o contengan restos bacterianos o algún otro residuo indeseable, la producción de estos

bacteriófagos esta alineada con las Buenas Prácticas de Manufactura [19]. Para una correcta administración de bacteriófagos como terapia, una primera recomendación es el aislamiento del patógeno y evaluar su susceptibilidad a antibióticos, posteriormente recurrir al banco de bacteriófagos y evaluar su efectividad contra el patógeno, mediante formación de placas en intervalos de 18-24 h, esta es una de las primeras recomendaciones de terapia con bacteriófagos, aunque aún esta práctica nueva y se es necesario la investigación y la evaluación de la efectividad de los bacteriófagos, tanto en su ciclo lisogénico como en el ciclo lítico, la administración a los pacientes y su efecto sobre los mismos, ya que es aún desconocido el mecanismo de acción, el efecto que tendrá en el sistema inmune etc., esto para poder diseñar una terapia, seleccionar bacteriófagos efectivos y personalizar la terapia [14,17,18].

Un estudio de un coctel de bacteriófagos contra *A. baumannii* aplicados de manera tópica en la sala de emergencias de un hospital en Taiwán, disminuyó la resistencia de carbapenem de 87.76% a 46.07%, esto redujo infecciones causadas por este patógeno, así como también redujo indirectamente el uso de antibióticos para tratar estas infecciones [19]. Una de las ventajas que brinda la terapia fágica es la reducción de mecanismos de resistencia a antibióticos, devolviendo susceptibilidad a los fármacos y volviendo manejables las infecciones causadas por bacterias.

El aislamiento de bacteriófagos para uso terapéutico ha demostrado que el uso como coctel es lo más adecuado, ya que presentan mejor actividad bactericida, para tratar infecciones causadas por bacterias, un estudio realizado por Nale et.al en el que aislaron un coctel de cinco bacteriófagos específicos de *Clostridium difficile*, una bacteria considerada oportunista que causa infecciones del sistema digestivo, y que tiene una elevada mortalidad, causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos, pacientes con disbiosis, en su mayoría por efecto de antibióticos, ya que estos fármacos al tener un amplio espectro de acción, elimina incluso bacterias que son benéficas para el ser humano, el estudio se realizó en condiciones semejantes al ambiente en el cuerpo humano, los resultados demostraron la efectividad de los bacteriófagos, ya que eliminaron completamente la bacteria, favoreció el crecimiento de bacterias benéficas [20]. Una de las ventajas del tratamiento de infecciones bacterianas, es la auto regulación, esto quiere decir

que el bacteriófago aumentará su población de acuerdo al número de sitios de infección, por lo tanto, cuando el sitio de infección (bacteria) disminuya, los bacteriófagos cesarán su producción, esta propiedad se ha visto reflejada en algunas investigaciones mediante la determinación de la multiplicidad de infección (MOI), mostrando mejores resultados con una MOI de 0.1 en comparación con la MOI de 10, esto puede significar que al ingresar una gran cantidad de partículas virales al sitio de infección el que no haya suficientes sitios de infección [14], disminuye la acción de los bacteriófagos, y al ingresar un menor número de partículas virales, al haber mayor superficie de contacto, los bacteriófagos aumentarán su progenie de manera exponencial, potencializando su actividad bactericida [21].

El conocimiento en cuanto a terapia con bacteriófagos es reducido, además de que se tienen limitaciones en su estudio, debido a características propias del virus, ya que este no se puede tratar como un fármaco, la farmacodinamia, farmacocinética es desconocida y no aplica ninguna regla farmacéutica, ni sigue ninguna guía establecida, se requieren un diseño de terapia exclusivo. Otra de las limitaciones de los bacteriófagos, es que una vez aislados, su efectividad se pierde si se almacenan por mucho tiempo, además de que para asegurar que la terapia fágica sea efectiva, se requiere el testeo de los potenciales bacteriófagos con la bacteria problema, y con ello dilucidar los bacteriófagos adecuados para cada serotipo de bacteria [20,21].

Se ha descrito que para el uso de bacteriófagos como terapia se requiere estrictamente bacteriófagos del tipo lítico, ya que se teme que los bacteriófagos lisogénicos puedan ayudar a el paso de genes responsables de la adquisición de resistencia a las nuevas generaciones de bacterias, sin embargo, se ha probado que la inducción de bacteriófagos lisogénicos a líticos tienen buena actividad terapéutica y mediante técnicas genéticas eliminar los fragmentos que estén involucrados en la resistencia a los mismos.

Se ha evaluado en diversas investigaciones y el uso combinado de varios bacteriófagos lisogénicos inducidos a ciclo lítico combinados no representan riesgo de poder transcribir a células hijas genes que confieran resistencia a la bacteria,

además de que tienen una buena actividad antimicrobiana, la ventana terapéutica es amplia, lo que permite diseñar estrategias para terapias combinadas, el rebrote de las bacterias no genera resistencia a los bacteriófagos, por lo que la terapia resulta de gran ventaja, al poder obtener la terapia del hospedero [12]. La inducción de bacteriófagos lisogénicos se da, como se dijo anteriormente a través de estrés celular, lo cual se puede lograr por ejemplo con luz UV, induciendo la producción de proteasas (proteína recA, esta mantiene anclado el genoma vírico al bacteriano), se ha probado que esta inducción solo afecta al genoma del virus, desanclando su genoma y cambiando al ciclo lítico, el genoma bacteriano no se ve afectado por estas condiciones [11]. En Japón se realizó el aislamiento del bacteriófago lisogénico  $\Phi$ KSM96 perteneciente a *Streptococcus mutans*, demostrando actividad lítica en diversas especies de la bacteria, incluso en cóctel de diferentes bacterias, la inhibición contra *S. mutans* fue selectiva, la flora bacteriana propia del sujeto no se vio modificada ni afectada [22], contrario a lo que pasa con fármacos, ya que estos al tener un amplio rango de acción y tener sitios de acción celulares específicos dañan grupos de bacterias, en los que están bacterias benéficas, generando disbiosis y volviendo susceptibles a los pacientes a infecciones más complejas por bacterias oportunistas, un ejemplo de estas es *Clostridium difficile* [20,21].

La administración de bacteriófagos en humanos es aislada y se ha dado en casos extremos, en pacientes que están al borde de la muerte, un caso documentado es el de un paciente diabético de 68 años, padecía de pancreatitis necrotizante que se complicó por infección causada por *A. baumannii*, el paciente recibió terapia con un amplia gama de antibióticos y drenajes percutáneos de un pseudoquiste pancreático, sin embargo, el paciente fue empeorando cada vez más en un lapso de 4 meses, a petición de médicos y familiares, se investigaron bacteriófagos de *A. baumannii*, se identificaron 9 (en el principio de la selección, se tenían alrededor de 200 bacteriófagos, de los cuales 98 eran específicos para *A. baumannii*) algunos de los bacteriófagos seleccionados se muestran en la Fig. 5, con actividad lítica contra la bacteria, los bacteriófagos se administraron de manera intravenosa a la cavidad del absceso, el paciente durante el proceso de administración del coctel de bacteriófagos no respondía a estímulos externos y fue diagnosticado con

insuficiencia renal, posterior a las primeras 36 h de la administración, el paciente se mantuvo estable pero en estado comatoso, por el estado clínico del paciente se optó por administrar una nueva dosis de bacteriófagos, y las administraciones se llevaron en intervalos cada vez más frecuentes durante dos días más, el paciente despertó abruptamente del coma en el que estaba y pudo hablar por primera vez en semanas con sus familiares. En este proceso de diseño individual de terapia con bacteriófagos, estuvo exhaustivamente controlado y monitorizado, tomando muestras y cultivando la bacteria constantemente para evaluar sus cambios respecto a la terapia y su susceptibilidad tanto a los bacteriófagos como a diversos antibióticos (los estándares contra la bacteria), en este proceso *A. baumannii* se volvió susceptible a minociclina y este antibiótico se añadió por los siguientes 4 días; las siguientes tres semanas se siguió tratamiento combinado (bacteriófago-antibiótico), ajustando terapia y dosis. El estado mental del paciente regresó por completo, fue desconectado de la respiración artificial y la función renal mejoró gradualmente. El tratamiento con el coctel de bacteriófagos siguió por 8 semanas más, mejorando su estado de salud de manera exitosa, el paciente fue dado de alta al día 245 de su ingreso, el paciente regreso a su vida normal al día siguiente [23,24]. Este es un ejemplo en el que se demuestra que la terapia con bacteriófagos es la respuesta a la necesidad de una nueva terapia antimicrobiana ante la creciente resistencia de las bacterias a los antibióticos, los bacteriófagos son ampliamente eficaces, no generan efectos secundarios al paciente, promueven la proliferación de bacterias benéficas, son altamente específicos, devuelven susceptibilidad a antibióticos, por lo que merece la pena que se diseñe una guía exclusiva para esta nueva opción antibiótica.

En el presente trabajo de tesis se inducirán bacteriófagos que están anclados a la bacteria (siguiendo ciclo lisogénico), se llevarán a ciclo lítico con ayuda de luz UV y con ello se evaluó su acción en contra de las mismas bacterias, en el inicio de este proyecto solo se utilizarán cepas de bacterias ATCC las cuales son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, como primer paso en esta línea de investigación se evaluará la efectividad de los bacteriófagos inducidos con la proyección de escalarla a más especies de bacterias y evaluar la respuesta de los bacteriófagos activados en contra de sus bacterias.

La investigación en este campo es nueva, se tienen limitaciones en diferentes ramas relacionadas a la investigación y propuesta de terapia antimicrobiana de los bacteriófagos, por lo que, para el diseño del proyecto, se apoyó del amplio conocimiento en virus de la Dra. Verónica Villagrana en virus, hay diversas hipótesis acerca de bacteriófagos y los ciclos que siguen, como pueden afectar el medio, como pueden verse ellos afectados, además de que se desconoce aún la forma de interacción de estos con el sistema inmune, si pueden o no desencadenar reacciones alérgicas, si pueden heredar o brindar genes de resistencia de una bacteria a otra, por lo que en lugar de benéficos puedan resultar dañinos. Esta investigación abre un panorama a una nueva opción de terapia antimicrobiana, obtenida del hospedero, resultando de gran ventaja, ya que la activación se da de manera sencilla, estudios realizados en bacteriófagos del tipo lisogénico han mostrado ser altamente modificables vía ADN, se pueden añadir sinergias, enzimas que potencialicen su acción, modificar partes de su genoma que puedan revertir el ciclo de nueva cuenta (lítico a lisogénico) además de que también se tiene documentado que pueden devolver la susceptibilidad a antibióticos [12].

## **JUSTIFICACIÓN**

La necesidad de nuevas opciones de tratamiento contra infecciones causadas por bacterias y la disminución de los genes relacionados a resistencia antimicrobiana. Los bacteriófagos han demostrado desde su descubrimiento en 1917 aproximadamente, su capacidad de erradicar bacterias, la inocuidad al receptor, favorece al crecimiento de bacterias benéficas, devuelve susceptibilidad a fármacos a los que ya no funcionaban. Los bacteriófagos fueron la primera opción para tratar infecciones causadas por bacterias y actualmente son usados industrialmente, en animales y su uso en seres humanos ha sido aprobado en algunos países demostrando resultados y salvando pacientes a los que ya no se les daba un pronóstico de vida.

## HIPÓTESIS

Algunas bacterias contienen en su genoma secuencias específicas de bacteriófagos, que bajo ciertas condiciones pueden activarse y ejercer efecto lítico sobre la célula bacteriana que las hospeda.

### Objetivo General

- Activar bacteriófagos lisogénicos provenientes de las bacterias ATCC *Staphylococcus aureus* 6538P y *Escherichia coli* 11229 con ayuda de luz UV, inducir a ciclo lítico y evaluar su actividad bactericida.

### Objetivos específicos

- Crecer bacterias ATCC en caldo enriquecido de triptonas.
- Determinar la longitud de onda a la que se activan los bacteriófagos elegidos.
- Determinar el tiempo al que los bacteriófagos deben ser expuestos a la luz UV.
- Purificar bacteriófagos específicos para las bacterias *Staphylococcus aureus* 6538P y *Escherichia coli* 11229.
- Cuantificar el contenido molecular de los bacteriófagos activados.
- Caracterizar de acuerdo a tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS)
- Caracterizar de acuerdo a forma mediante Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM).
- Evaluar la acción bactericida de los bacteriófagos obtenidos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para todos los procesos llevados a cabo en esta investigación se utilizó material y reactivo grado biológico y previamente esterilizado mediante autoclave, se explicará de manera breve la función de equipo utilizado en la investigación.

Se utilizó agua doblemente desionizada con una resistividad de 18.3 MΩ.

### **Diseño experimental**

La investigación de la activación de bacteriófagos es muy escasa, la bibliografía no muestra la manera de hacerlo, ni describe las condiciones idóneas para hacerlo, por lo que se recopiló información de virus, bacterias, bacteriófagos y se probaron varias líneas de investigación y diferentes condiciones. Se inició la experimentación con modelos líquidos, la siembra de bacterias se realizó en un volumen mayor de caldo nutritivo y se llevó a cabo la radiación con ayuda de una lámpara UV, se evaluó el efecto de la luz UV al paso del tiempo, desde 5 min hasta 2 h, la longitud de onda elegida fue de 254 nm, se trabajó también con 365 nm sin resultados, este proceso de prueba dio las condiciones ideales para el desarrollo de la investigación que fue una combinación de trabajo en medios líquidos y sólidos, en el medio líquidos se favorece el crecimiento de las bacterias al proporcionar un medio enriquecido como el caldo de triptonas, y en el medio sólido se deposita solo una fracción del medio líquido para poder controlar la concentración de bacterias y exponerlas a condiciones de estrés que generarán la activación de los bacteriófagos lisogénicos y su posterior inducción a ciclo lítico por efecto de la irradiación UV, llevada a cabo en la campana de flujo laminar para asegurar que toda la superficie de bacterias es irradiada, lo que no se podía lograr con la lámpara. El procedimiento de purificación de virus fue el elegido al obtener inhibición de crecimiento posterior a la irradiación UV, la inhibición del crecimiento fue el primer parámetro que demostraba la presencia de bacteriófagos.

## **Objetivo metodológico**

El objetivo de la experimentación es determinar la longitud de onda a la que los bacteriófagos lisogénicos activados de las bacterias *S. aureus* y *E. coli* se inducen a ciclo lítico, así como el tiempo al que deben ser expuestas las bacterias a la luz UV, lograr la activación de los bacteriófagos y caracterizarlos de acuerdo a contenido, tamaño y forma, cuando se tengan caracterizados se evaluará su actividad antimicrobiana.

## **MATERIAL, EQUIPO Y SOLUCIONES PREVIAS**

Se presentan a continuación la descripción detallada de reactivos y soluciones que se utilizaron a lo largo del proceso de investigación.

**Cepas utilizadas.** Las cepas fueron facilitadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *Escherichia coli* ATCC 11229, estas estaban conservadas en glicerol y fueron almacenadas en ultracongelación (-70- -80 °C).

**Caldo Triptona.** Caldo enriquecido para el crecimiento de precultivos y crecimiento de bacterias en medio líquido, preparado con agua desionizada. Compuesto por 10 g de NaCl (marca Analytical), 10 g de bacto triptona (marca BD) y 5 g de extracto de levadura (marca BD) en 1 L de agua, una vez preparado, se disolvió por completo con ayuda de calor en placa de calentamiento. Al obtener el caldo de triptona disuelto es llevado a autoclave para asegurar esterilidad del mismo.

**Agar Luria-Bertani (LB) Marca BD.** Medio de cultivo enriquecido para el crecimiento de bacterias en medio sólido, se compone de 10 g de triptona (marca BD), 5 g de extracto de levadura (marca BD), 5 g de NaCl (marca Analytical) y 15 g de agar (Marca BD). Este medio se prepara con 1 L agua desionizada, se mezcla con ayuda de calor en placa de calentamiento y posteriormente se lleva a autoclave para esterilizar, al alcanzar una temperatura aproximada de 45 °C se vacía a caja de Petri en medio estéril en presencia de mechero y al solidificarse se lleva a refrigeración.

**Agar Luria-Bertani (LB) al 66% (agar blando).** Para preparar 150 mL de agar blando se tomaron 5.25 g de agar LB (marca BD), se disolvieron con ayuda de calor, y se esterilizó en autoclave, la temperatura para usar el agar es de 45 °C aproximadamente y se realiza el experimento de siembra en doble placa.

**Buffer TNE.** Este fue el buffer de suspensión para los bacteriófagos, este tipo de buffer es útil para la resuspensión de bacteriófagos, se preparó 0.5 L, compuesto por TRIS (marca invitrogen) a una concentración de 50 mM preparado a partir de reactivo en polvo, NaCl (marca Analytical) a una concentración 100 mM y EDTA a una concentración de 5 mM, este buffer se ajustó a pH de 7.5 con ácido clorhídrico.

**NanoDrop 2000c.** Este equipo es un espectrofotómetro, este equipo se empleó en la medición de diversos analitos, como fueron la densidad óptica de los medios de cultivo, la cuantificación molecular de los bacteriófagos activados.

**Incubadora mixer.** De la marca Eppendorf, fue utilizada en la incubación de las bacterias en los medios previos, en el crecimiento bacteriano post irradiación UV, la recuperación de los bacteriófagos después de la irradiación, en el experimento de doble placa.

**Campana de flujo laminar.** De la marca Thermo Fisher Scientific, utilizada para procedimientos que requerían alta esterilidad, como el vaciado de caldo de triptona antes de hacer siembra de bacterias, control para mediciones en nanodrop, irradiación UV.

**Centrifuga.** De la marca Laboratory Products, se utilizó para remover restos celulares de gran tamaño, luego de recuperar los bacteriófagos contenidos en la caja de Petri.

**Ultracentrifuga.** De la marca Beckman Coulter, velocidad regulable hasta 100, 000 rpm, se utilizó para obtener los bacteriófagos y eliminar el caldo ya que este no era el ideal para conservar los bacteriófagos.

## **Variables experimentales**

VARIABLES con las que se trabajaron a lo largo de la investigación, cada una con diferentes propiedades y afectadas por diferentes factores con las que se pudo experimentar y evaluar el efecto de estos, además de usarlos en favor al objetivo que se planteó al inicio del experimento.

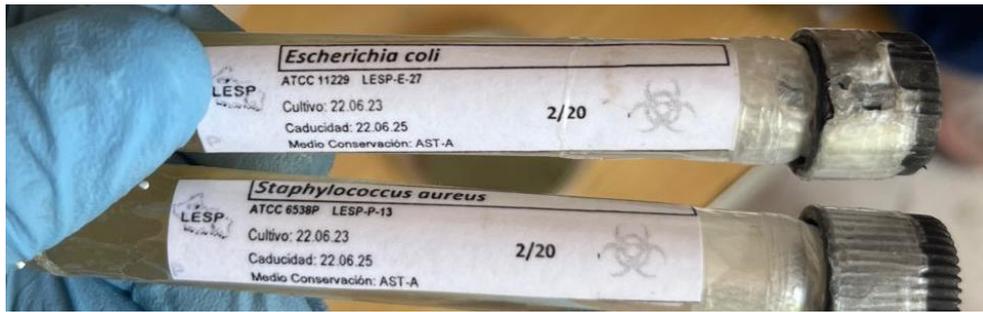
Como variables independientes están las longitudes de onda, se evaluaron dos opciones, se evaluó el efecto de una longitud de onda de 365 nm, y no se obtuvieron los resultados esperados, no hubo inhibición del crecimiento de las bacterias; en cuanto a la longitud de onda de 254 nm fue la elegida y resultó óptima para la activación de los bacteriófagos. Otra variable independiente es el tiempo de exposición, ya que no se tiene registro, por lo que se testearon diferentes intervalos, al inicio de la experimentación se trabajó con metodología líquida, y se evaluó el efecto del tiempo de irradiación, desde 5 min hasta 2 h, donde cada intervalo de tiempo se medía la turbidez de la solución, en donde la turbidez fluctuaba y los valores arrojados de absorbancia no eran significativos, y de acuerdo a los valores de absorbancia en estos experimentos, el tiempo de irradiación UV elegido fue de 10 min.

De las variables independientes se obtienen las variables dependientes, que son los halos de inhibición post irradiación, concentración de proteínas y ácidos nucleicos, tamaño y morfología, efecto bactericida.

### **1.1 Siembra de bacterias**

Para realizar la siembra de bacterias en caldo de triptona, enriquecido con extracto de levadura y cloruro de sodio, se tomó una asada de las cepas y se resuspendieron en 5 mL de caldo triptona, dejándolo 24 h en incubación a 180 rpm en la incubadora mixer.

Se utilizaron cepas ATCC de *S. aureus* (6538P) y *E. coli* (11229), los viales que contienen estas bacterias se pueden observar en la Fig 5.



**Fig. 5** Cepas de *E. coli* y *S. aureus*, contenidas en glicerol y almacenadas a -80 °C aproximadamente

Al obtener el cultivo posterior a 24 h de su siembra, se hizo una resiembra del cultivo en caldo nuevo, se toman 500  $\mu$ L del cultivo y se resuspendieron en 5 mL de caldo nuevo, se dejó en incubación hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.7, en este proceso la incubación fue desde 25 min hasta 40 min aproximadamente, estas mediciones se hicieron en el espectrofotómetro Nano Drop 2000c, en este valor de densidad óptica, las bacterias están en un punto exponencial de la curva de crecimiento, por lo tanto hay una gran cantidad de población bacteriana, lo que favorece al desarrollo de los experimentos.

## 1.2 Exposición a luz UV

La longitud de onda a la que se expusieron los cultivos de bacterias fue 254 nm, por 10 min de exposición.

Para exponer las bacterias a luz UV, del cultivo líquido se tomó 1 mL de caldo a la densidad óptica deseada (0.5-0.7) y se vació en una caja de Petri que contiene agar LB y se uniformó con ayuda de un asa, se dejó en incubación por 10 min para posteriormente pasarlo a una campana de irradiación UV, este procedimiento también se llevó a cabo en un control el cual solo se depositó el caldo de triptona sin bacterias, con una longitud de onda de 254 nm y 10 min, después de esta

exposición se dejó incubando toda la noche (aprox. 18 h-24 h) a 37 °C para observar el efecto de la luz UV sobre las bacterias.

### **1.3 Bacterias post irradiación UV**

Después de la irradiación UV y la incubación de las cajas de Petri con el cultivo bacteriano, se observó el crecimiento después de 18-24 h, obteniendo halos de inhibición en la caja de Petri, esta inhibición es el primer marcador que indica que la activación de los bacteriófagos fue satisfactoria, por lo que los pasos siguientes sería la purificación, caracterización y la evaluación de su acción bactericida.

### **1.4 Purificación de bacteriófagos**

En el experimento anterior, se demostró que la exposición del cultivo de bacterias a la luz UV lograron activar con éxito los bacteriófagos lisogénicos que estaban anclados a la bacteria e inducirlos a ciclo lítico, lo que abrió el camino para iniciar el proceso de purificación.

En la caja de Petri obtenida se depositó caldo de triptona para difundir los bacteriófagos obtenidos, se depositaron 10 mL de caldo y se incubaron a 37 °C por 2 h, recuperando el caldo, posterior a este tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, esto para poder separar restos celulares grandes y separar el pellet bacteriano. El sobrenadante obtenido se filtró con membranas de 0.45 µ, también para descartar tamaños que no son relevantes para la investigación, como restos de bacterias, proteínas libres u otros artefactos, posterior a esto se ultra centrifugaron a 60,000 rpm por 2 h, obteniendo finalmente el pellet que contiene los bacteriófagos, este se resuspendió en buffer TNE y se dejó en el agitador Rock-it en movimiento oscilatorio por 24 h, logrando que se resuspendiera completamente para las mediciones siguientes.

Cuando el pellet que contiene los bacteriófagos se resuspendió en el buffer TNE, se almacenaron en tubos eppendorf en refrigeración a 4 °C, estas fueron las condiciones en las que se tuvieron los bacteriófagos activados entre las mediciones posteriores, el volumen obtenido en cada una de las repeticiones de bacteriófagos fue de aproximadamente 100  $\mu$ L.

### **1.5 Cuantificación molecular**

Al obtener los bacteriófagos purificados contenidos en el pellet, fue resuspendido en 100  $\mu$ L de buffer TNE, el suspendido obtenido fue empleado para la cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos con ayuda de Nanodrop 2000c, depositando 2  $\mu$ L de la muestra, teniendo como control agua desionizada, se obtuvieron las concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas, los valores obtenidos en estas mediciones serían indicador de que se obtuvieron los bacteriófagos.

### **1.6 Caracterización de acuerdo a tamaño por equipo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS)**

Los valores de proteínas y ácidos nucleicos indicadores de que hay bacteriófagos en el suspendido de bacteriófagos purificados dieron la pauta a continuar con el siguiente paso en la caracterización de los bacteriófagos determinando su tamaño empleando DLS, 100  $\mu$ L de muestra se depositaron en celdas ZEN0040 para su medición en DLS, al obtener el resultado la muestra se regresó al tubo eppendorf.

## 1.7 Caracterización estructural en Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Para el depósito de muestras, se utilizaron rejillas de cobre cubiertas con carbón e hidrofilizadas.

En el laboratorio se cuenta con un sistema que consiste en una placa metálica de la que salen dos válvulas, una de ellas está unida a una bomba mecánica que brinda el vacío al sistema y la otra permite la entrada de aire y romper el vacío cuando sea necesario; encima de esta placa metálica se coloca un refractario de vidrio la cual tiene una cinta metálica en la superficie en la que se da la descarga con la luz Tesla, este proceso se puede observar en la Fig. 6.

Las rejillas se colocaron al centro de la placa metálica, se coloca el refractario encima, se aplica el vacío y posteriormente se da la descarga con la luz Tesla, esto genera la ionización del aire y este reacciona con la superficie de las rejillas volviéndolas hidrofílicas; la carga de la muestra se debe hacer inmediatamente, ya que el efecto solo se mantiene alrededor de 2 h.



**Fig. 6** Descarga de luz Tesla sobre rejillas de TEM para hidrofiliarlas [27]

Para el depósito de muestras, se coloca la muestra sobre la rejilla, una gota de aproximadamente 8  $\mu\text{L}$ , se espera 1 min para que la muestra se fije en la rejilla, cuando pasa este tiempo, se elimina el exceso de muestra con ayuda de un papel poroso o papel filtro sin que este toque la rejilla, después la muestra se tiñe con

ayuda de 6  $\mu\text{L}$  de acetato de uranilo al 2% y se deja en reposo 1 min, cuando pase el tiempo de reposo, se quita el exceso de acetato igual con ayuda de papel poroso o papel filtro, sin tocar la rejilla, al finalizar el proceso, se coloca en el portarejillas y se coloca en el desecador, se tiene que esperar al menos 12 h para poder observarlo en el microscopio [27].

### 1.8 Evaluación de actividad bactericida

El siguiente paso es evaluar la acción de los bacteriófagos en contra de las bacterias mediante la formación de placas, este paso se realizó con la siembra de bacterias junto con los bacteriófagos purificados.

Se realizaron diluciones de bacteriófagos, las cuales fueron:  $10^{-2}$  la cual contenía 10  $\mu\text{L}$  y 990  $\mu\text{L}$  de buffer TNE, para la dilución de  $10^{-4}$  se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la dilución anterior y 990  $\mu\text{L}$  de buffer TNE y por último para la dilución de  $10^{-8}$ , se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la dilución anterior y 999  $\mu\text{L}$  de buffer TNE.

Posteriormente para evaluar la actividad de los bacteriófagos sobre las bacterias se realizó un precultivo bacteriano para cada una de las bacterias que se tienen (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), se requiere una densidad óptica de entre 0.2-0.3 ya que a esta densidad óptica las bacterias están activamente dividiéndose y favorece la acción de los bacteriófagos, primero se hizo la mezcla de 100  $\mu\text{L}$  de bacteriófagos y 100  $\mu\text{L}$  de bacterias, para posteriormente mezclar con el agar LB blando (que estaba al 66%) en un tubo falcón, este estaba recién preparado, sin embargo, para la realización del experimento la temperatura del agar no debía exceder los 45 °C, se mezcló por inversión y se vació en una caja de Petri que ya contenía agar LB que estaba al 100%, se dejó en incubación de 12-24 h a 37 °C.

Este es el método de doble placa y se utiliza en la mayoría de los experimentos en los que se quiere evaluar la eficacia de los bacteriófagos, ya sea lisogénicos inducidos o líticos, la formación de pequeños “hoyos”, es la muestra de que los bacteriófagos ejercieron la acción bactericida, y de acuerdo al número de placas se

puede realizar un conteo y determinar cuantitativamente la acción de los bacteriófagos [5,6,14,25].

### **1.8 Controles experimentales**

Los experimentos realizados se llevaron a cabo con controles, en los que se trataron igual que las muestras exceptuando el contenido de bacterias.

Para la exposición de bacterias a luz UV se dejó una caja de bacterias sembradas igual que las irradiadas, sin embargo, esta no fue expuesta a luz UV, este fue el control positivo, donde el crecimiento es mucho más pronunciado que en las bacterias que si fueron irradiadas; también se realizó un control negativo el cual solo contenía el agar para asegurar que no hay interferencias en la realización de los experimentos.

En la siembra de bacterias en doble placa, se trabajó con control negativo, éste no contiene ni bacterias ni bacteriófagos solamente se depositó agar blando (al 66 %), asegurando que el procedimiento se realizó en condiciones estériles y no hubo interferencias en el crecimiento bacteriano, en el control positivo contiene agar blando y bacterias con densidad óptica 0.2-0.3, muestra el crecimiento de la bacteria sin agente represor.

### **1.9 Repetibilidad y Validación**

Los experimentos se realizaron por triplicado para ambas bacterias, los resultados son consistentes entre las repeticiones, de acuerdo a lo obtenido, las concentraciones de proteínas, ácidos nucleicos, tamaño y forma son similares entre las repeticiones y las dos bacterias, además los experimentos se acompañaron de controles que validaban el correcto procedimiento de la investigación y que no había interferencias que pudieran afectar el resultado.

En los experimentos de siembra de bacterias la inhibición formada fue más variable, sin embargo, en todas las repeticiones y diluciones hubo inhibición bacteriana por bacteriófagos.

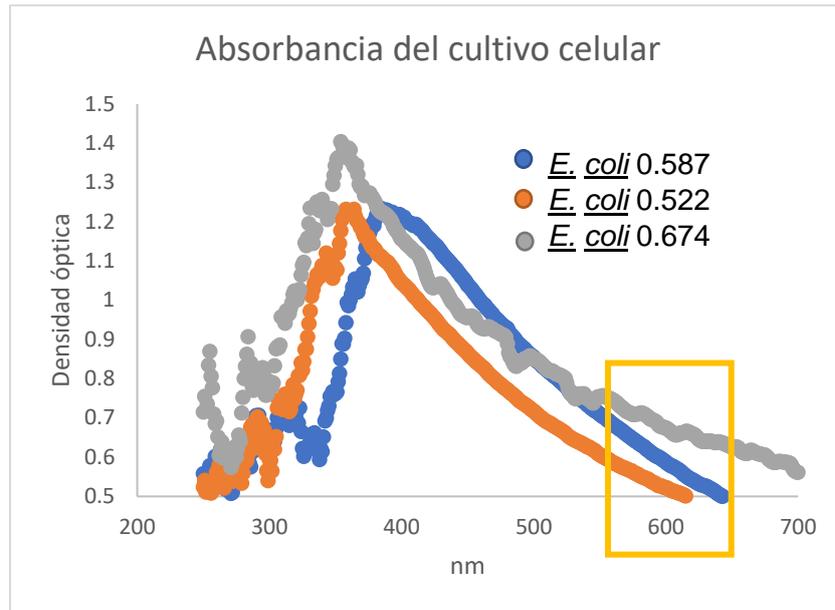
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.1.1 Densidad óptica de medios de cultivo bacteriano

La densidad óptica de los medios de cultivo se midió con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c en una celda de cuarzo, la lectura empleada es a 600 nm esta longitud de onda es un rango visible del espectro, las bacterias tienen una absorbancia relativamente alta por lo que la medición de turbidez del medio es precisa, un aumento en la absorbancia a 600 nm indica un aumento en la concentración de células bacterianas en la muestra, lo que se traduce en crecimiento del cultivo.

El experimento se realizó por triplicado en todas sus fases a excepción de la observación en microscopio electrónico de transmisión, como se ha mencionado en diversos apartados dentro del documento, el principal objetivo del presente trabajo, es la activación de bacteriófagos lisogénicos de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, por lo que al inicio de cada experimento se evaluó la densidad de los cultivos bacterianos y asegurar que estaban en el rango esperado y poder proceder con los siguientes experimentos. A continuación, se presentan los valores de densidad óptica de cada una de las repeticiones de cada bacteria al inicio de cada repetición.

En la Fig. 7 se muestra el gráfico de las repeticiones de densidad óptica de *E. coli*, y en la Tabla 1 se muestran los valores de densidad óptica, la curva azul muestra la densidad óptica de 0.587, mientras que la curva naranja corresponde a 0.522, la curva gris es correspondiente a la tercera repetición para esta bacteria y se obtuvo un resultado de 0.674, en cada una de las repeticiones, los valores de densidad óptica están en el rango esperado para comenzar la investigación, en experimentos realizados en bacteriófagos, este valor de densidad óptica es en el que se trabaja con este tipo de virus debido a que el ciclo de crecimiento de las bacterias está en un punto en el que los bacteriófagos tienen mayor afinidad a estas por lo que su acción se ve favorecida [14,17,18].

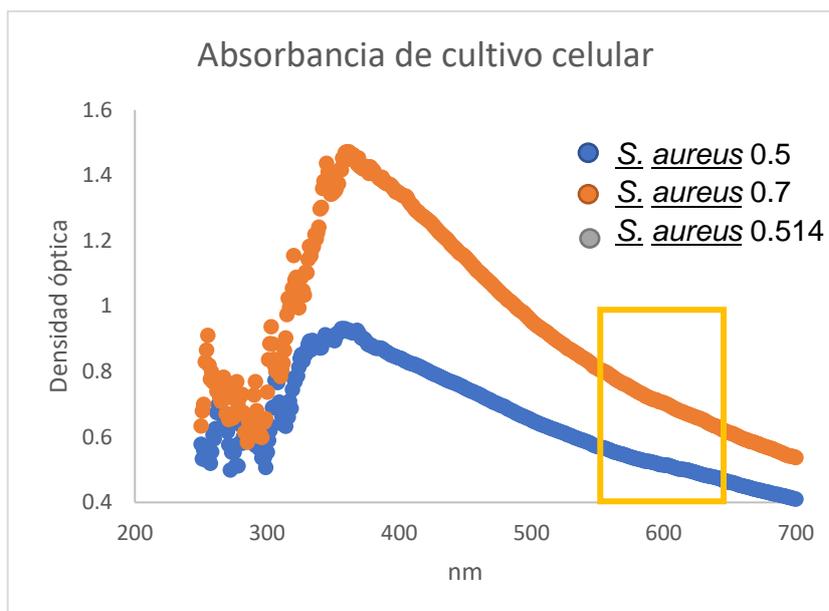


**Fig. 7** Gráfico que muestra las curvas de densidad óptica para Escherichia coli.

**Tabla 1.** Densidad óptica para Escherichia coli

Muestra	A600
<u>E. coli</u>	0.587
<u>E. coli</u>	0.522
<u>E. coli</u>	0.674

En la Fig. 8 se muestra el gráfico de las repeticiones de densidad óptica de S. aureus, y en la Tabla 2 se muestran los valores de densidad óptica. La curva azul corresponde a la densidad óptica 0.5, la curva naranja corresponde a la absorbancia 0.7 mientras que la curva gris corresponde a la absorbancia 0.514, al igual que en la gráfica y tabla anteriores, los resultados están dentro del rango de valores esperados (0.5-0.7), para cada una de las repeticiones fue indispensable que la densidad óptica estuviera en el rango mencionado, para asegurar que la activación de los bacteriófagos fuera exitosa.



**Fig. 8** Gráfica correspondiente a la densidad óptica de *S. aureus*.

**Tabla 2. Densidad óptica para *S. aureus***

Muestra	A600
<u><i>S. aureus</i></u>	0.5
<u><i>S. aureus</i></u>	0.7
<u><i>S. aureus</i></u>	0.514

Los resultados obtenidos en cuanto a la medición de densidad óptica de los medios de cultivo al inicio de la investigación fueron los esperados, el crecimiento de las bacterias fue favorecido al enriquecer el caldo de triptonas.

### **Cultivo de bacterias post exposición a luz UV**

Los cultivos de bacteria fueron irradiados con luz UV y se evaluó su efecto, mostrando halos de inhibición en todas las cajas de Petri, que indica que el crecimiento de las bacterias no fue de manera uniforme, que de acuerdo a la bibliografía [2-23], las áreas en las que no hay crecimiento bacteriano significa la presencia de un agente represor del crecimiento, en este caso, la presencia de bacteriófagos.

Estudios realizados por Maganha et.al probaron la inducción de bacteriófagos (no indicada la especie) a una longitud de onda de 254 nm [9] lo que coincide con las condiciones empleadas en la presente investigación, se probó longitud de onda larga (365 nm) sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos.

Como se puede observar en la Fig. 9, el inciso a) En esta caja no se realizó la siembra de bacterias, correspondiente al control negativo, no hay crecimiento de microorganismos, lo que indica que el proceso se llevó en condiciones estériles sin interferencias, en el inciso b) Corresponde al control positivo, se puede observar un crecimiento pronunciado, cremosidad y sin ningún signo de inhibición; el inciso c) muestra el crecimiento de S. aureus después de la irradiación UV se señala con una flecha la inhibición de crecimiento que hay, a diferencia del control positivo, el crecimiento no es tan elevado, el halo de inhibición se puede identificar fácilmente, la presencia de un agente represor es evidente, los bacteriófagos fueron activados e inhibieron el crecimiento bacteriano; en el inciso d) se muestra el crecimiento de E. coli posterior a la irradiación UV se señala con una flecha la inhibición que se logró con la irradiación UV, en esta caja, el crecimiento bacteriano se vio disminuido en comparación a las demás cajas, se puede inferir que esta bacteria tiene mayor susceptibilidad a la luz UV, ya que a diferencia de las otras cajas, los halos de inhibición son mayores; el inciso e) Corresponde a S. aureus indicados por flecha los halos de inhibición, los bordes están bien delineados, aun en las áreas en la que el crecimiento de la bacteria no es interrumpido, este se ve disminuido, en comparación al control positivo, el cual muestra un crecimiento mucho más desarrollado; en el inciso f) corresponde al crecimiento de E. coli, la inhibición es marcada por las flechas, los halos inhibición en esta caja de Petri son más claros en comparación a las otras dos repeticiones esto puede estar relacionado a la densidad óptica, puede ser que una densidad óptica entre 0.5-0.6 promueva la acción de los bacteriófagos e impulse su efecto, en el grupo de cajas correspondientes a la bacteria E. coli mostraron una mayor inhibición de crecimiento lo que puede significar que esta bacteria tiene una mayor susceptibilidad al estrés celular ocasionado por la luz UV, otra posibilidad es que al ser una bacteria Gram (-) participan más moléculas transportadoras de membrana que facilitan la acción de los bacteriófagos [8]; en el inciso g) corresponde al

crecimiento de *S. aureus* el crecimiento en esta caja se vio aumentado, el halo de inhibición señalado por la flecha, el aumento en el crecimiento bacteriano puede deberse a factores como que el crecimiento de esta bacteria es exponencial, el efecto de la luz UV no generó estrés suficiente en la célula e inhibir el crecimiento, *S. aureus* es una bacteria Gram (+) y de acuerdo a la bibliografía las moléculas involucradas no son tan numerosas a diferencia de las implicadas en las bacterias Gram (-) [8,9], por lo que la acción de los bacteriófagos pudo verse disminuida; el inciso h) Correspondiente al crecimiento de *E. coli*, el crecimiento en esta caja para esta bacteria aumentó, sin embargo, en comparación al control positivo donde el crecimiento es mucho más aumentado, lo que se puede observar en la cremosidad de las colonias y la saturación de la caja, la inhibición está señalada por la flecha.

Estudios realizados por Osterhaut et.al. [11], observaron la inducción de bacteriófagos pertenecientes a *E. coli* mediante luz UV y su efecto en el hospedero, demostrando que hay una gran cantidad de genes implicados en la inducción del ciclo lisogénico a lítico y no interfiere en ningún otro ciclo del bacteriófago ni de la bacteria, sin embargo, no se tiene datos de la longitud de onda adecuada ni el tiempo de exposición a la que se deben someter las bacterias para lograr la activación de los bacteriófagos, por lo que el tiempo de exposición fue testeado al inicio de la investigación y el intervalo de 10 min de exposición fue en el que se obtuvieron mejores resultados.



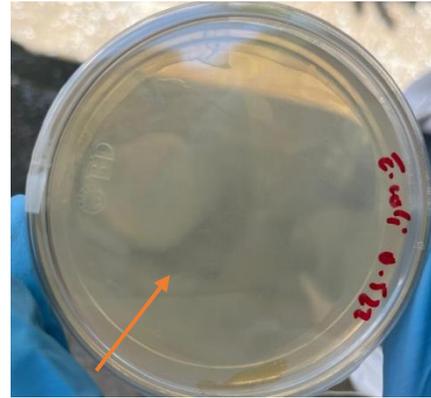
a) Control (-)



b) Control (+)



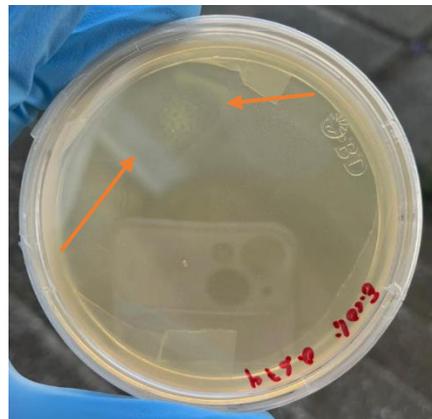
c) S. aureus 0.514



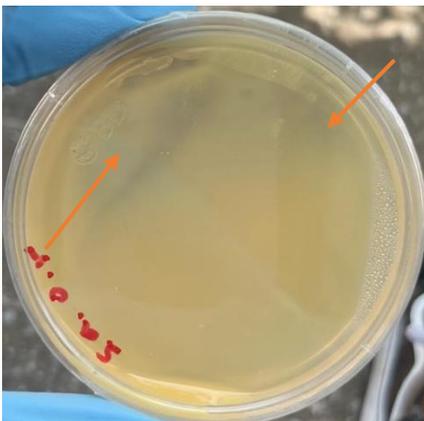
d) E. coli 0.522



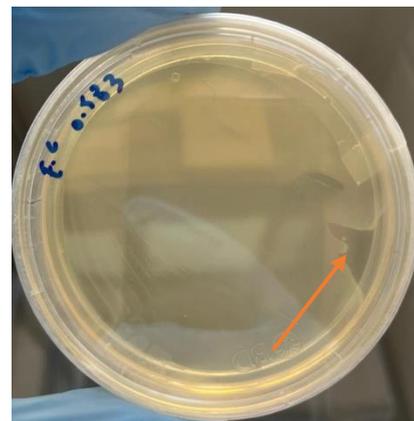
e) S. aureus 0.7



f) E. coli 0.674



g) S. aureus 0.5



h) E. coli 0.587

**Fig. 9** Imágenes correspondientes a el cultivo bacteriano 24 h después de haber sido irradiado con luz UV (254 nm) por 10 min. a) Control (-) caja sin tratamiento; b) Control (+) En esta caja se sembró la bacteria y se incubó sin pasar por la irradiación UV; c) Crecimiento de Staphylococcus aureus de 0.514; d) Crecimiento de

Escherichia coli 0.522; e) Crecimiento de S. aureus 0.7; f) E. coli 0.674; g) S. aureus 0.5; h) Crecimiento de E. coli 0.587.

Los resultados anteriores muestran los halos de inhibición que se dieron por efecto de la luz UV, en todas las repeticiones se pueden observar halos de inhibición que indican que no hay un crecimiento de bacterias de manera uniforme, este crecimiento interrumpido es un indicador de la inducción de bacteriófagos lisogénicos a líticos, de acuerdo a investigaciones realizadas por Frederik Twort, la acción de los bacteriófagos puede observarse por zonas “clarificadas” en las cajas de Petri [3], en los controles se puede validar que el experimento se llevó a cabo de manera adecuada, en el control negativo no hubo crecimiento de microorganismos, lo que asegura la esterilidad del experimento, y en el control positivo hay crecimiento aumentado de la bacteria.

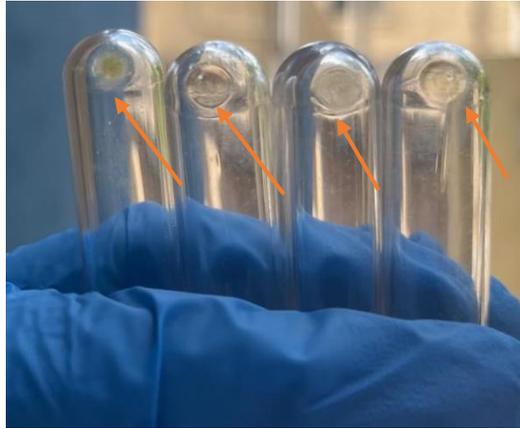
### **1.1.1. Purificación de bacteriófagos**

La purificación de los bacteriófagos obtenidos comenzó con la difusión de los mismos en las cajas de Petri posterior a la irradiación UV en la incubadora mixer, se realizó la primera centrifugación que eliminó partículas de gran tamaño como restos de bacterias y se filtró con una membrana de 0.45 µL en la que se eliminaron restos de proteínas, de bacterias entre otros. Por último, con la ultra centrifugación se obtuvieron tamaños de partícula del orden de nanómetros medidos mediante DLS en los que se encuentran partículas virales de interés que son los bacteriófagos.

En la Fig. 10 se muestra el pellet formado posterior a la ultra centrifugación, este pellet es característico de la obtención de virus [26].

De acuerdo a la bibliografía consultada, todos los bacteriófagos utilizados en las investigaciones fueron obtenidos de fuentes externas, tales como aguas residuales,

heces fecales [3-24], entre otras, no se hallaron experimentos en los que los bacteriófagos que fueron inducidos se purificaran, por lo que se siguió el proceso de purificación de virus [26].



**Fig. 10** Pellet que contiene bacteriófagos

### 1.1.2. Caracterización de bacteriófagos por contenido proteico y de ácidos nucleicos

#### PROTEÍNAS

Para poder realizar la cuantificación molecular, ya se tenían las 6 repeticiones de bacterias (3 de *S. aureus* y 3 de *E. coli*) por lo que las mediciones siguientes se realizaron de manera simultánea, haciendo diferencia e identificando cada valor de acuerdo a la densidad óptica del cultivo bacteriano al inicio del experimento y con ello poder relacionar la densidad óptica con la concentración de ácidos nucleicos, proteínas, tamaño de partícula y forma de los bacteriófagos, con esta relación poder determinar la eficiencia de las bacterias y el impacto que tiene la densidad óptica del cultivo bacteriano con los resultados posteriores.

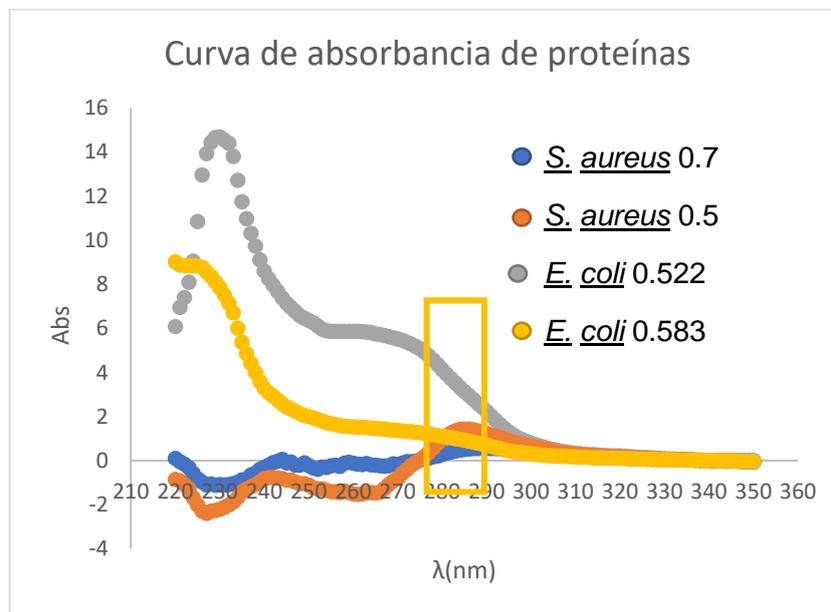
El suspendido de bacteriófagos se midió en el espectrofotómetro UV/VIS NanoDrop 2000c, para medir la concentración de proteína en ProteinA80, ya que la cápside del bacteriófago es completamente de proteína, las proteínas absorben a una densidad óptica de 280 nm, principalmente aminoácidos aromáticos, los resultados fueron esperables, con una concentración de proteína adecuada que nos dio pauta a continuar con la caracterización de los bacteriófagos según su contenido genético.

Para cada repetición de bacterias se realizó esta medición, no se consideró la estadística dentro de la investigación ya que no es el objetivo y no aplica a los intereses de la investigación, además cada una de las repeticiones obtuvo valores diferentes, dentro de lo esperado, ya que en todas las repeticiones se logró inducir bacteriófagos del ciclo lisogénico al ciclo lítico, lo que en este apartado se muestra por el contenido de proteínas.

En la Fig. 11 se puede observar la curva de absorbancia de proteínas de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* y *S. aureus*, como en los experimentos anteriores, las mediciones se dividieron siguiendo las repeticiones de densidad óptica de los medios de cultivo bacterianos, esto para evaluar la relación entre este valor y la concentración de proteínas obtenido, también se muestra en la Tabla 3 los valores de concentración de proteínas, los valores de concentración son mostrados en mg/mL, para conocer la cantidad correcta de concentración es necesario conocer el coeficiente de extinción molar del bacteriófago, sin embargo, al no conocer la especie bacteriófago, solo se tiene la concentración aproximada.

La curva azul pertenece a los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7, la concentración de proteína es baja, esto puede deberse a factores como desactivación de los bacteriófagos, que se hayan desensamblado o que hayan sido inactivados durante el manejo de la muestra, las temperaturas, humedad, entre otros; la curva naranja es perteneciente a los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.5, la concentración también es baja, sin embargo, hay concentración de proteínas; la curva gris pertenece a los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522, en este gráfico fue la curva más pronunciada y por consiguiente la mayor concentración de proteínas, en el experimento de irradiación UV la caja

pertenciente a esta bacteria fue la que mayor inhibición presentó, por lo que es congruente con los resultados en cuanto a la concentración de proteínas; la curva amarilla correspondiente a los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.5, fue la segunda curva más pronunciada, la concentración de proteínas fue elevada. De la gráfica anterior se puede inferir que *E. coli* puede ser más susceptible a la acción de la luz UV en comparación con *S. aureus*, lo que se ve reflejado en la concentración de proteínas y está relacionado con la cantidad de bacteriófagos obtenidos. Los valores de coeficiente 260/280 mostrados en la Tabla 4 son indicadores de la pureza del virus obtenido, y describe la relación de la proteína y ácidos nucleicos, donde un coeficiente de 0.6 es típico de proteínas purificadas [25], valores por encima de este son relacionados a contaminaciones por material genético suelto, en nuestros resultados estos valores por encima de 0.6 pueden estar relacionados a restos de partículas que pudieron ser arrastrados en el proceso de purificación.

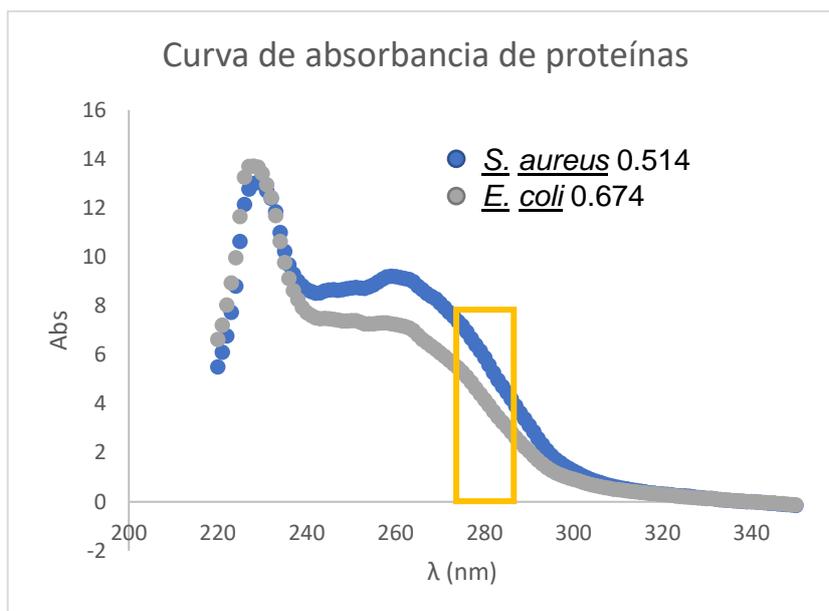


**Fig. 11** Gráfica correspondiente a la curva de absorbancia de proteínas de los bacteriófagos activados.

**Tabla 3. Valores de concentración de proteínas de los bacteriófagos obtenidos de las bacterias E. coli y S. aureus**

Muestra	Conc. Proteína	Unidad	A280	260/280
<u>S. aureus</u> 0.7	0.27	mg/mL	0.27	-0.44
<u>S. aureus</u> 0.5	0.968	mg/mL	0.968	-1.57
<u>E. coli</u> 0.522	4.138	mg/mL	4.138	1.42
<u>E. coli</u> 0.583	1.102	mg/mL	1.102	1.39

La Fig. 12 corresponde a la curva de absorbancia de proteínas de los bacteriófagos obtenidos a partir de las bacterias S. aureus y E. coli, y en la Tabla 4 se muestran los valores de concentración, a diferencia de la gráfica y tabla anteriores, esta repetición obtuvo mayores valores de concentración de proteínas, lo que puede significar una mayor eficacia de extracción de bacteriófagos, las densidades ópticas obtenidas están justo en el medio del rango esperado lo que puede estar relacionado con la eficiencia de activación de los bacteriófagos. Las concentraciones de proteínas son elevadas, la curva azul corresponde a los bacteriófagos de S. aureus hay una buena respuesta, lo que también se puede ver en la inhibición por la luz UV, a una densidad óptica de 0.5 de S. aureus hubo una mejor respuesta, los halos de inhibición son más evidentes y en el caso de concentración de proteínas es más elevado, la curva gris corresponde a E. coli la concentración de proteína fue la más alta registrada, los halos de inhibición obtenidos fueron más evidentes que en S. aureus, el crecimiento de esta bacteria es más controlado, la obtención de bacteriófagos resultó más eficiente también. De igual manera que en los resultados anteriores, la pureza de los bacteriófagos obtenidos es elevada demostrada por los resultados en el coeficiente de 260/280, donde un resultado mayor a 1.4 es considerado de una buena pureza.



**Fig. 12** Gráfica correspondiente a la curva de absorción de proteínas de los bacteriófagos que fueron obtenidos a partir de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.

**Tabla 4. Valores de concentración de proteínas correspondientes a los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.514 y *E. coli* 0.583**

Muestra	Conc. Proteína	Unidad	A280	260/280
<i>S. aureus</i>	6.482	mg/mL	6.482	1.5
<i>E. coli</i>	8.241	mg/mL	8.241	1.64

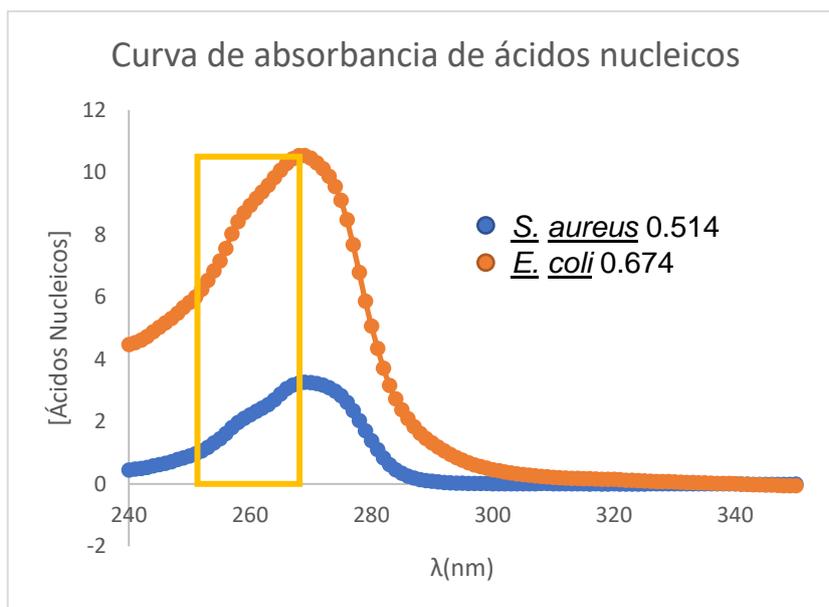
## ÁCIDOS NUCLEICOS

Se evaluó el contenido de material genético en los bacteriófagos obtenidos mediante Nano Drop 2000c, en el apartado Nucleic acid, las mediciones se hacen a 260 nm, absorbancia a la cual se absorben los ácidos nucleicos, como se mencionó anteriormente el objetivo del presente trabajo de tesis fue la activación de bacteriófagos lisogénicos e inducirlos a ciclo lítico, los primeros marcadores que demostraron que esta inducción se había llevado a cabo fue la concentración de

proteínas, y ácidos nucleicos, la estadística no entra en la investigación ya que de acuerdo a la caracterización molecular, solo se evaluó que los bacteriófagos obtenidos tuvieran una concentración de proteínas y ácidos nucleicos que demostrará la presencia de partículas virales (bacteriófagos).

En la Fig. 13 corresponde a la gráfica de la curva de absorbancia de ácidos nucleicos de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* y *E. coli*, y en la Tabla 5 se muestran los valores de concentración, la concentración de *S. aureus* es elevada y el grado de pureza es bajo ya que un coeficiente 260/280 entre 1.8-2.2 es considerada aceptable, una concentración menor a 1.8 es indicador de contaminación con proteínas u otros componentes que absorben a 280 nm [25], que puede ser debido a la presencia de proteínas de la cápside, ya que no se realizó el desensamble del bacteriófago para solo obtener el material genético, por lo que hubo interferencia por la presencia de proteínas, por esta razón la concentración de éstas es más elevada que en ácidos nucleicos, en cuanto a *E. coli* la concentración fue baja, lo que pudo ser causado por diversos factores como inactivación de los bacteriófagos, el volumen de la muestra, la temperatura de almacenamiento que puede degradar o desnaturalizar el material genético y con ello disminuir sus concentraciones, o como se mencionó antes, los bacteriófagos al no ser desensamblados para aislar el material genético tuvieron interferencia de proteínas en la medición de ácidos nucleicos.

La curva naranja corresponde a los bacteriófagos de *E. coli*, en los que se obtuvo una concentración de ácidos nucleicos baja en comparación con el resultado obtenido en *S. aureus* en el cual la concentración de proteínas fue mayor, esta diferencia de concentraciones puede deberse a numerosos factores, tales como una rápida degradación de los bacteriófagos activados, la manipulación al hacer las mediciones, la temperatura del laboratorio o que los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* son más susceptibles y por lo tanto requieren condiciones de almacenamiento especiales para alargar la vida útil de los mismos.



**Fig. 13** Gráfica correspondiente a la curva de absorción de ácidos nucleicos de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* y *E. coli*.

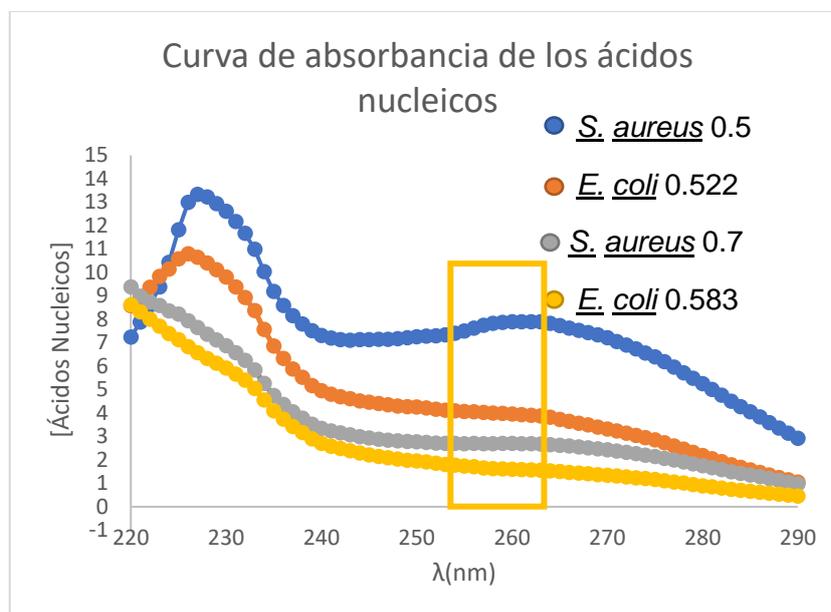
**Tabla 5. Valores de concentración de ácidos nucleicos de bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* y *E. coli*.**

Muestra	Conc. Ácidos nuc.	Unidad	A260	260/280
<i>S. aureus</i> 0.514	110.8	ng/μl	2.217	1.6
<i>E. coli</i> 0.674	0.4469	ng/μl	8.938	1.77

La Fig. 14 muestra la gráfica de la curva de absorción de ácidos nucleicos de los bacteriófagos obtenidos a partir de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, y la Tabla 6 muestra los valores obtenidos de concentración de ácidos nucleicos que fueron más elevadas en los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.5 y los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522, la concentración de proteínas es también acorde a lo esperado, las concentraciones en todas las repeticiones de los bacteriófagos obtenidos en cada una de las repeticiones de las bacterias son significativas, esto traducido de las concentraciones obtenidas tanto en proteínas como en ácidos nucleicos y por lo tanto, se infiere que la activación fue exitosa, lo

siguiente sería la caracterización de acuerdo a tamaño de partícula y forma de la partícula.

La curva azul corresponde a los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.5, la extracción de los bacteriófagos fue eficiente, como se mencionó anteriormente la mejor absorbancia de trabajo y en la cual se obtuvieron mejores resultados en *S. aureus* fue de 0.5, lo cual se pudo observar en la inhibición por luz UV y en la concentración de proteínas; la curva naranja corresponde a uno de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* en la cual se obtuvo una concentración de ácidos nucleicos elevada; la curva gris corresponde a la concentración de ácidos nucleicos de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus*, la concentración es elevada; la curva amarilla corresponde a la concentración de bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli*, fue la menor concentración registrada, sin embargo en todas las repeticiones hay concentración de ácidos nucleicos.



**Fig. 14** Gráfica correspondiente a la curva de absorción de concentración de ácidos nucleicos.

**Tabla 6. Valores obtenidos de concentración de ácidos nucleicos de los bacteriófagos obtenidos a partir de S. aureus y E. coli**

<b>Muestra</b>	<b>Conc. Ácidos Nuc.</b>	<b>Unidad</b>	<b>A260</b>	<b>260/280</b>
<u>E. coli</u> 0.583	79.8	ng/μl	1.595	1.79
<u>S. aureus</u> 0.7	134.7	ng/μl	2.695	1.54
<u>E. coli</u> 0.522	197.6	ng/μl	3.953	1.81
<u>S. aureus</u> 0.5	394.1	ng/μl	7.882	1.5

Los resultados obtenidos en cuanto a concentración de ácidos nucleicos demuestran que la extracción de bacteriófagos se llevó a cabo, demostrado por las concentraciones elevadas de ácidos nucleicos y proteínas, con grado de pureza que coincide con una extracción eficiente y de calidad, de acuerdo a los lineamientos de extracción de virus [25], por lo que con los dos parámetros con resultados esperados (concentración de proteínas y ácidos nucleicos) se puede inferir que se lograron activar los bacteriófagos, por lo tanto, ahora se procederá a caracterizarlos de acuerdo a tamaño (con equipo DLS) y por forma (con microscopio electrónico de transmisión).

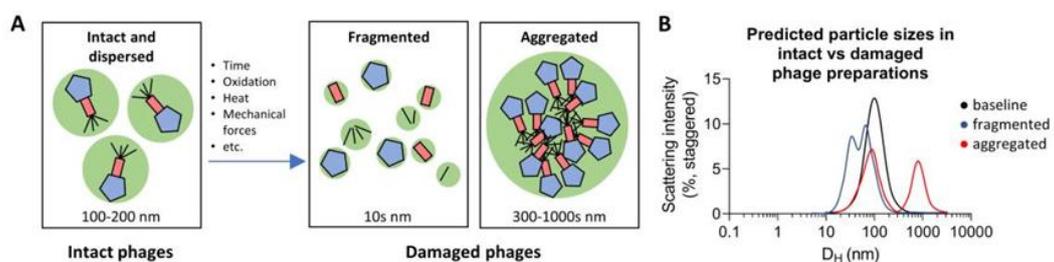
La cuantificación molecular en la que los valores para proteínas fueron elevados y en ácidos nucleicos la pureza estuvo en rango de una extracción de virus de calidad [25].

### **1.1.3. Caracterización de bacteriófagos de acuerdo a tamaño con un analizador de partículas (dispersión de luz dinámica)**

Cada una de las muestras se analizó con el equipo de dispersión de luz dinámica en celdas ZEN0040, esto para evaluar el tamaño de partícula obtenido en la purificación de bacteriófagos este equipo realiza mediciones continuas en la

muestra con los resultados obtenidos en todas las mediciones el equipo realiza 3 repeticiones de las mediciones descritas por distintos colores en las curvas presentadas en el espectro, posteriormente hace una media y porcentajes de tamaños de acuerdo al total, este equipo está especializado para medir partículas muy pequeñas, del grado de nanómetros, se midieron las seis repeticiones (3 para *S. aureus* y 3 para *E. coli*), obteniendo resultados congruentes y parecidos en todos, lo cual indica reproducibilidad en los experimentos, y que se tienen las mismas poblaciones de bacteriófagos en las muestras.

En la Fig. 15 se muestra en el inciso A los escenarios de medida que pueden surgir en la medición por DLS, ya que pueden formarse agregados de bacteriófagos lo que se verá reflejado en mediciones mayores a 300 nm, o en caso de que ocurra la degradación de los bacteriófagos en la solución se encontrarán restos de bacteriófagos como cápside, cola, fibras de cola y habrá tamaños de 10 nm o menores; en el inciso B se muestra la predicción del espectro de DLS, la curva de bacteriófago intacto mostrada por la línea negra que es un pico bien definido, agregados de bacteriófagos mostrados por la curva roja, se forman varios picos en tamaños grandes o fragmentos de bacteriófagos señalados por la curva azul, la curva formada no está bien definida y se posiciona en tamaños muy pequeños [26].

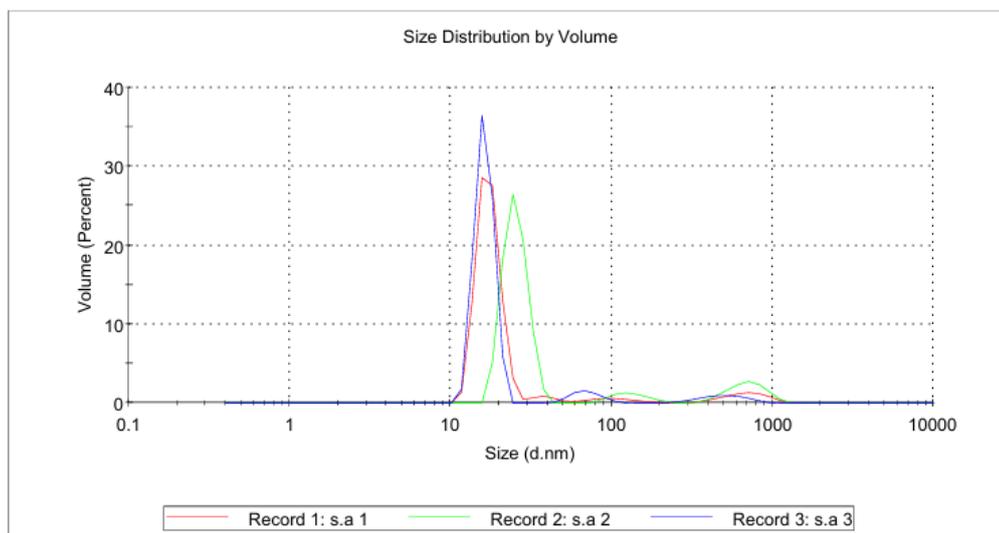


**Fig. 15.** Imagen correspondiente a los posibles escenarios en la medición de tamaño de bacteriófagos y un espectro de DLS correspondiente a bacteriófagos [26].

En la Fig. 16 se muestra la distribución de tamaño por volumen de los bacteriófagos obtenidos a partir de la repetición de S. aureus 0.5, se eligió mostrar estos resultados ya que son más representativos y coinciden con los objetivos de la investigación. Los tamaños de partícula obtenidos oscilan entre 20-50 nm, de acuerdo a la bibliografía, los tamaños de los bacteriófagos rondan entre los 20 y 200 nm [2], la concentración de proteínas para esta repetición fue de 0.968 mg/mL y de ácidos nucleicos 110 ng/ $\mu$ L, los halos de inhibición mostrados en la caja de Petri posterior a la exposición a la luz UV fueron amplios, lo que puede indicar que se obtuvo una población extensa de bacteriófagos, en esta repetición la cuantificación molecular no fue elevada, sin embargo, las concentraciones son significativas y la presencia de bacteriófagos es comprobable por la concentración de proteínas y ácidos nucleicos, el tamaño mayoritario obtenido en DLS fue de 18 nm aproximadamente lo que puede relacionarse a la obtención de bacteriófagos, en la naturaleza hay cerca de  $10^{34}$  especies de bacteriófagos, por lo que se puede tratar de un bacteriófago que aún no se ha estudiado, tamaños de fragmentos de bacteriófagos, como restos de cápsides, de colas, fibras de cola, entre otros. Los dos picos restantes pueden ser despreciables ya que el porcentaje de estos tamaños es muy pequeño y la desviación estándar es elevada.

## Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 142.4	<b>Peak 1:</b> 694.8	7.2	203.2
<b>Pdl:</b> 0.570	<b>Peak 2:</b> 107.3	3.5	35.79
<b>Intercept:</b> 0.902	<b>Peak 3:</b> 17.29	86.2	2.863
<b>Result quality :</b> Refer to quality report			



**Fig. 16** Distribución de tamaño por volumen de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.514.

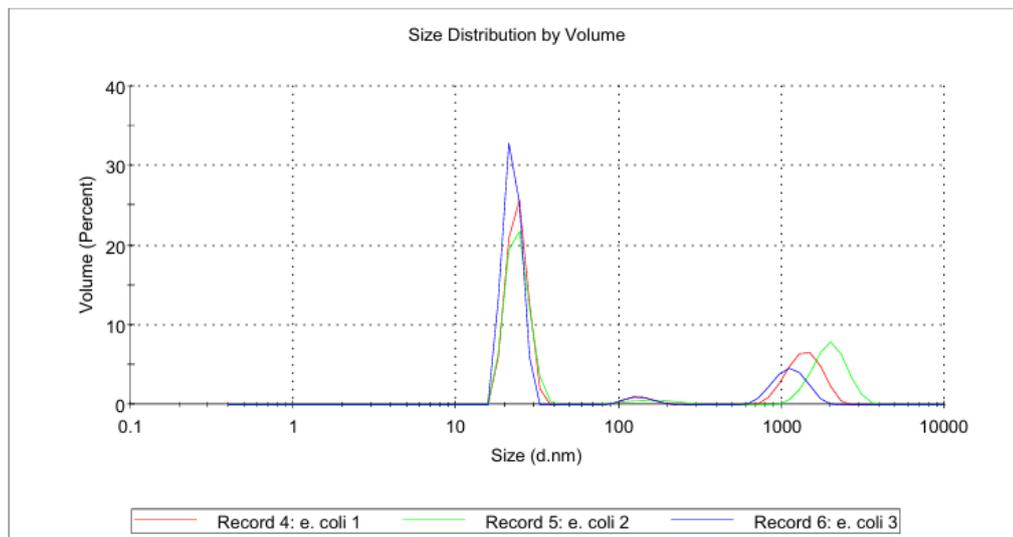
En la Fig. 17 se puede observar la distribución de tamaño de los bacteriófagos obtenidos de acuerdo a tamaño de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli*, el equipo de dispersión de luz dinámica realiza una medición por triplicado de la muestra y genera las curvas que se observan a continuación y divide la población de acuerdo al porcentaje contenido de ese tamaño en la muestra. Los tamaños de partícula oscilaron entre 30-50 nm, los tamaños son parecidos a la repetición anterior, para esta repetición se obtuvieron 8.241 mg/mL de proteínas y 0.4469  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ácidos nucleicos, en los halos de inhibición en las cajas de Petri posterior a la irradiación UV son amplios por lo que se considera que la activación de los bacteriófagos se llevó a cabo de manera adecuada, lo cual se ve reflejado en las concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas, la concentración de proteínas fue elevada, la cantidad de proteínas se relaciona a la cápside que rodea al bacteriófago, la concentración de ácidos nucleicos baja puede deberse a que hay una baja de población de los bacteriófagos, por lo que no hay suficientes partículas

virales que puedan ser cuantificadas de acuerdo a su contenido de ácidos nucleicos.

Las curvas obtenidas en tamaños de 1400 nm son despreciables, ya que la frecuencia obtenida es muy pequeña, la mayor parte de los tamaños se encuentran en los tamaños de 24 nm con una frecuencia de 67.4 %, este tamaño puede compararse con el bacteriófago MS2 que mide 24-27 nm, pertenece a la familia de los *Caudoviricetes* [27].

### Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 156.1	<b>Peak 1:</b> 1400	29.1	329.7
<b>Pdl:</b> 1.000	<b>Peak 2:</b> 136.2	3.5	27.15
<b>Intercept:</b> 0.843	<b>Peak 3:</b> 23.75	67.4	3.370
<b>Result quality :</b> Refer to quality report			



**Fig. 17** Distribución de tamaño por volumen de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.587.

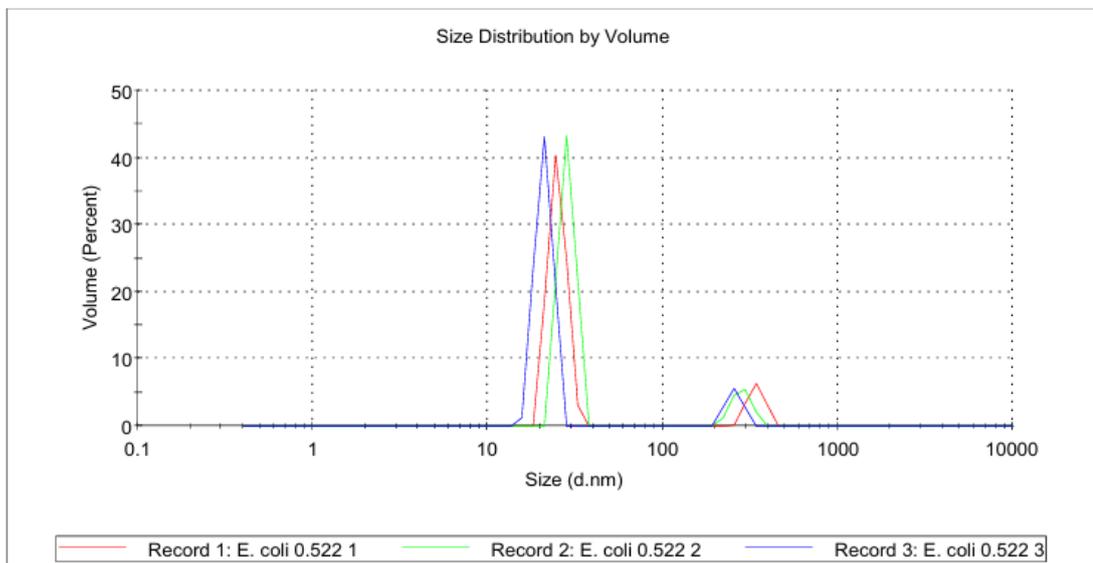
La Fig. 18 muestra la distribución de tamaño de acuerdo a volumen de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522, con una frecuencia de 86.9 % se tienen tamaños de 25.05 nm, el tamaño de 341.6 nm con una frecuencia de 13.1 %

puede deberse a la aglomeración de partículas virales, ya que en caso de los bacteriófagos T4 pueden tener una longitud de hasta 200 nm, y el fago  $\lambda$  mide 200 nm aproximadamente.

Se obtuvieron tamaños entre 25-80 nm, obteniendo resultados de 4.138 mg/mL para proteínas y 197.6 ng/ $\mu$ L, la concentración molecular para la repetición de esta bacteria son de los más elevados de la investigación, se ve reflejado de igual manera en la inhibición de crecimiento por la luz UV, el crecimiento bacteriano fue disminuido en comparación con las demás cajas y bacterias, el rendimiento de activación de los bacteriófagos, lo que se demuestra con la concentración de proteínas y ácidos nucleicos.

### Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 1029	<b>Peak 1:</b> 341.6	13.1	36.85
<b>Pdl:</b> 0.892	<b>Peak 2:</b> 25.05	86.9	2.937
<b>Intercept:</b> 0.552	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Result quality :</b> Refer to quality report			



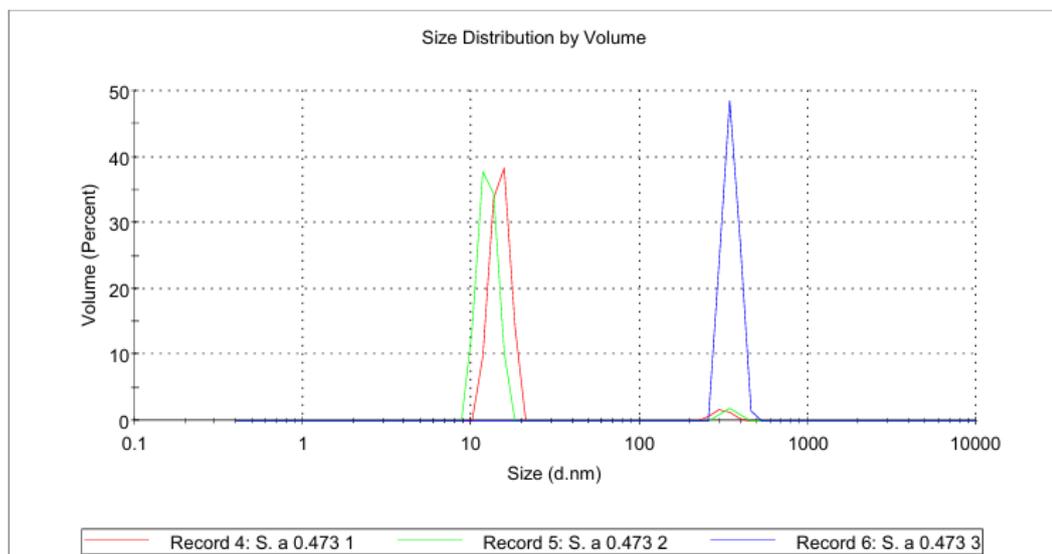
**Fig. 18** Distribución de tamaño por volumen de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522.

La Fig. 19 muestra la distribución de tamaños de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.5.

Los tamaños obtenidos de partículas en su mayoría cayeron en 15 nm con 96 % del total de las mediciones, las concentraciones de ácidos nucleicos fueron de 0.968 mg/mL y 394.1 ng/μL para proteínas, estos valores pueden deberse a que en el suspendido de bacteriófagos hay restos de proteínas de bacteriófagos y la concentración de ácidos nucleicos baja relacionada al posible desensamble de los bacteriófagos y por consiguiente la desnaturalización del contenido genético.

### Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 1143	<b>Peak 1:</b> 311.1	4.0	38.88
<b>Pdl:</b> 0.810	<b>Peak 2:</b> 14.90	96.0	1.875
<b>Intercept:</b> 0.777	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000
<b>Result quality :</b> Refer to quality report			



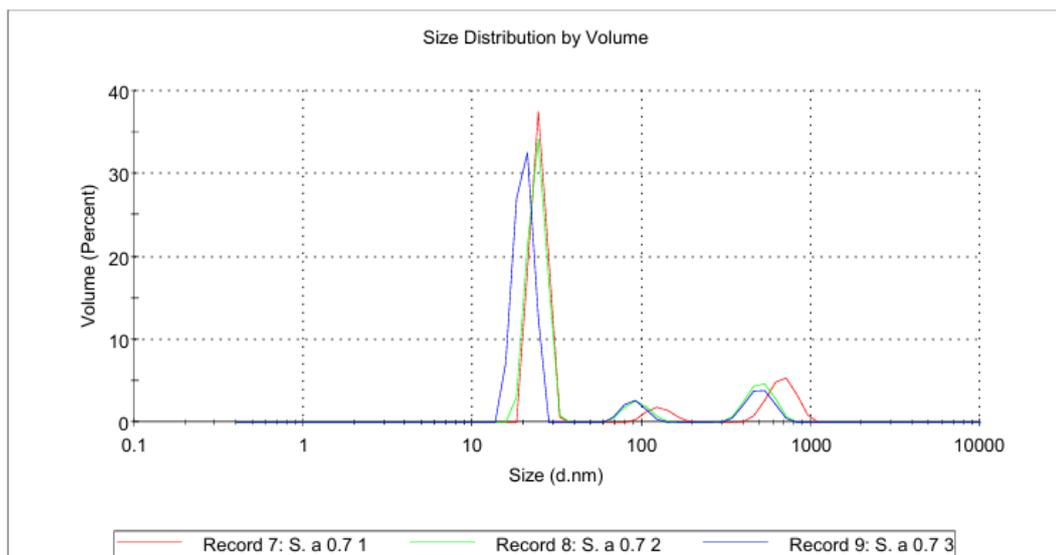
**Fig. 19** Distribución de tamaño por volumen bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.5.

La Fig. 20 muestra los resultados de la distribución de tamaños de partícula de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7. Para los resultados de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7 los tamaños oscilaron entre 25-60

nm siendo el tamaño predominante de 24 nm con 76.2 % de popularidad está dentro del tamaño de bacteriófagos, donde los más pequeños oscilan entre los 18 y 30 nm, la concentración de proteína fue de 0.27 mg/mL y para ácidos nucleicos fue de 139.7 ng/μL, estos resultados demuestran que la activación de los bacteriófagos fue exitosa, el pico de 18.1 % puede deberse a restos de bacteriófagos que pudieron desensamblarse, aglomeraciones de los mismos, entre otros [27,28].

### Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 199.7	<b>Peak 1:</b> 678.8	18.1	122.5
<b>Pdl:</b> 0.724	<b>Peak 2:</b> 127.9	5.7	22.04
<b>Intercept:</b> 0.845	<b>Peak 3:</b> 24.63	76.2	2.650
<b>Result quality :</b> Refer to quality report			



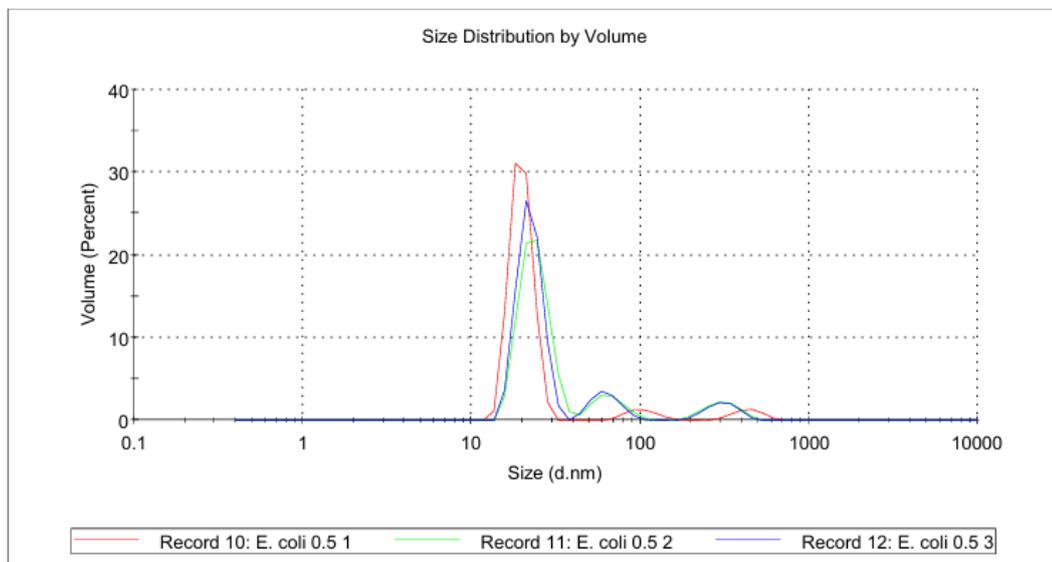
**Fig. 20** Distribución de tamaño por volumen de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7.

La Fig. 21 muestra la distribución de tamaños de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.5. Se obtuvieron rangos de tamaños que oscilan entre 20-50 nm con mayoría en 20 nm correspondiente al 90.1 % del total, la concentración de proteína para esta repetición, fue de 1.102 mg/mL y 79.8 ng/μL para ácidos nucleicos, como

se ha mencionado antes la población de bacteriófagos de la que se tiene conocimiento es elevada, alrededor de  $10^{34}$  especies, por lo que puede que haya bacteriófagos de los que no se tiene conocimiento, para *E. coli* los resultados de activación de bacteriófagos son más eficientes, de acuerdo a los halos de inhibición formados posterior a la irradiación UV, la cuantificación molecular es esperada y coincide con la obtención de virus [25], el tamaño de partícula obtenido coincide con bacteriófagos como MS2 [26] que tiene un tamaño de alrededor de 24 nm, *E. coli* es una bacteria Gram (-) y la infección causada por fagos en estas bacterias es mediada por numerosas moléculas, desde receptores, proteínas transmembranales, enzimas que degradan la pared celular de la bacteria [8,9].

### Results

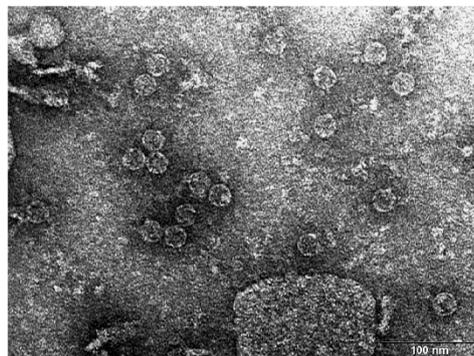
	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 172.1	<b>Peak 1:</b> 103.9	5.0	22.08
<b>Pdl:</b> 0.471	<b>Peak 2:</b> 437.1	4.9	84.97
<b>Intercept:</b> 0.814	<b>Peak 3:</b> 19.82	90.1	3.013
<b>Result quality :</b> Refer to quality report			



**Fig. 21** Distribución de tamaño por volumen de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.5.

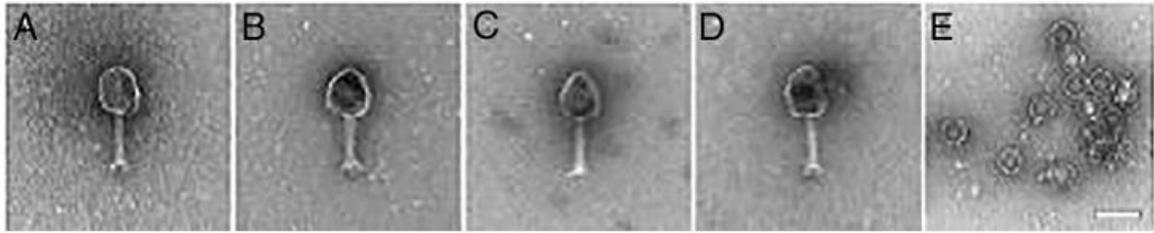
#### 1.1.4. Caracterización de bacteriófagos por forma con Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Como siguiente marcador para la validación de la activación de bacteriófagos lisogénicos obtenidos a partir de las bacterias *S. aureus* ATCC 6538P y *E. coli* ATCC 11229, es la caracterización por forma, la mayoría de los bacteriófagos que han sido estudiados hasta el momento pertenecen a los *Caudoviricetes*, es decir bacteriófagos cabeza cola, y a los *Corticoviridae* que son bacteriófagos icosaédricos con la característica forma de diamante [18], y de acuerdo al tamaño obtenido por medio de DLS se pueden comparar con bacteriófagos como MS2 con tamaños de alrededor de 26 nm perteneciente a los *Caudoviricetes*, este bacteriófago se puede observar en la Fig.22. [27].



**Fig. 22** Imagen de microscopía electrónica de transmisión del bacteriófago MS2, tomado de [27].

En la Fig. 23 se muestran imágenes de bacteriófagos de *A. baumannii* en TEM, pertenecientes a *Caudoviricetes* (A-D), mientras que el bacteriófago del inciso E se puede decir que pertenece a *Corticoviridae*, ya que es más pequeño y no hay cola visible. Estos bacteriófagos fueron utilizados de manera clínica en el tratamiento de un pseudoquiste, en el que el paciente eliminó completamente la infección gracias a estos [23].

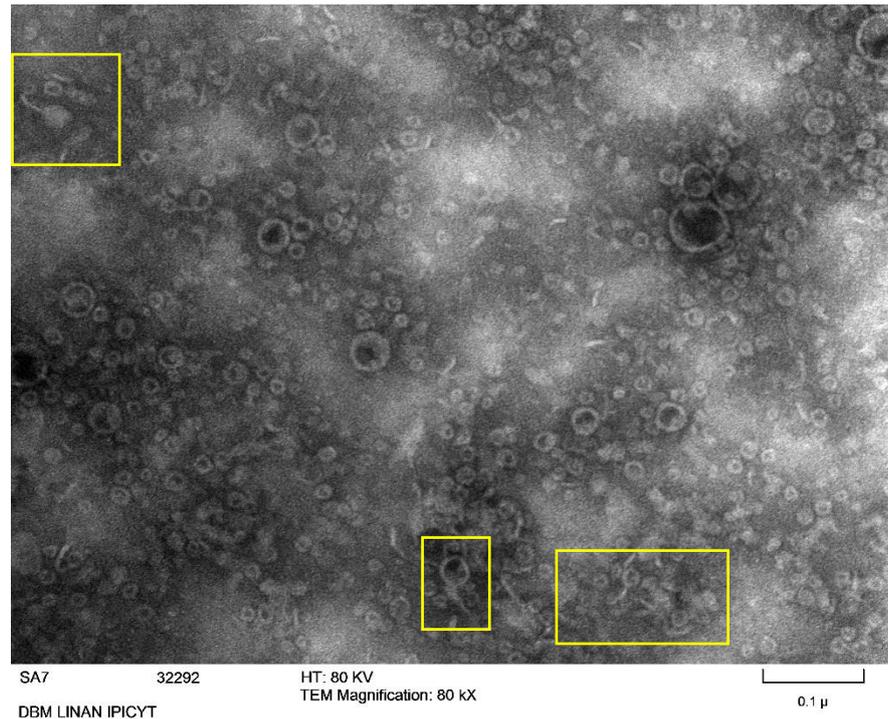


**Fig. 23** Imagen de Microscopio Electrónico de Transmisión de bacteriófagos de *Acinetobacter baumannii* [23]

Para el depósito de muestras se utilizó una técnica llamada descarga brillante, fue propuesta por primera vez por Aebi y Pollard en 1987, esto con la finalidad de convertir la película de carbón hidrofóbica contenida en la rejilla a hidrofílica, y con ello ayudar a que el depósito de la muestra sea correcto, este proceso se hace con una descarga eléctrica que ioniza la atmósfera, esto en un ambiente al vacío [28].

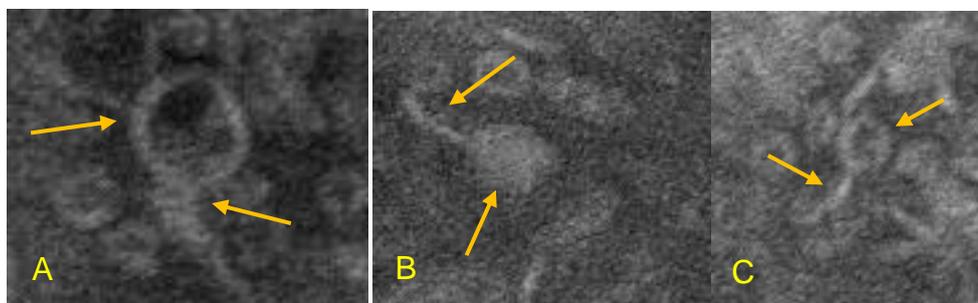
Se procedió a depositar la muestra de bacteriófagos en rejilla hidrofílica para poder observar la muestra en el microscopio electrónico de transmisión, que es especializado en observar muestras de tamaño muy pequeño, solo se depositaron las muestras de bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522 ya que esta muestra demostró de los mejores resultados con 4.138 mg/mL en proteínas y 197.6 ng/ $\mu$ L en ácidos nucleicos, los tamaños de partícula obtenidos en DLS fueron en su mayoría de 25 nm, al analizar estos tres marcadores se tomó la decisión de que esta fuera una de las muestras a depositar, también se depositaron los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7, cuyos resultados fueron los mejores correspondientes a esta bacteria con un tamaño de partícula de 25 nm, la concentración de ácidos nucleicos y proteínas es elevada por lo que esta repetición fue la elegida para observar en TEM, no se depositaron todas las repeticiones por temas de presupuesto, tiempo y material.

Como se puede observar en las Fig. 24 y 25 se observa la muestra de los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522.



**Fig. 24** Imagen obtenida de bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522.

En los recuadros se señalan las formas mejor identificadas de la imagen, se puede inferir que en la muestra se tiene más de una población de bacteriófagos.

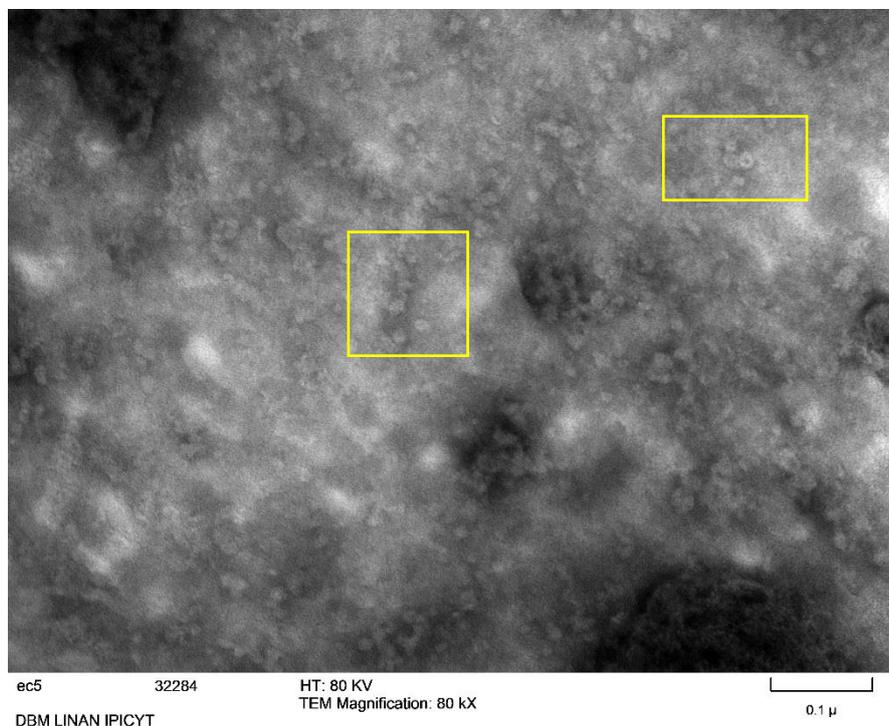


**Fig. 25** Imágenes ampliadas del área señalada en la imagen anterior.

Se pueden observar tres tipos de bacteriófagos, pueden ser pertenecientes a *Caudoviricetes* y *Corticoviridae*, sin embargo, es necesario la secuenciación para poder asegurar su identidad. Las formas obtenidas para este experimento resultan comparables con los bacteriófagos del experimento realizado por Schooley et. al. [23], mostrados en la Fig. 23, en la Fig. 25 que corresponde a la muestra de los bacteriófagos obtenidos en la investigación, la imagen ampliada A muestra un bacteriófago que posiblemente pertenezca a la familia de los *Caudoviricetes*, la

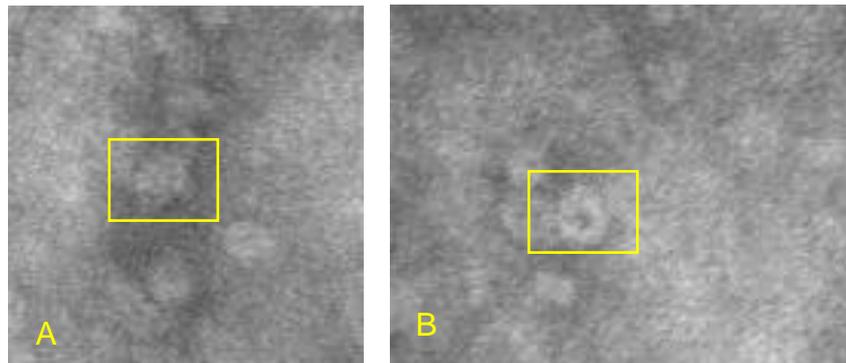
cápside señalada por la flecha es grande en comparación con lo que parece una pequeña cola (señalada también por la flecha), en la imagen B se muestra un bacteriófago cabeza-cola, la cápside y la cola son señaladas por flechas, la forma es parecida a los bacteriófagos de *A. baumannii* mostrados en la Fig. 26 en los incisos A-D, donde aparecen bacteriófagos del tipo cabeza cola y se ve delineado cada una de las partes, en la imagen C de igual manera el bacteriófago presentado es del tipo cabeza-cola con sus partes señalados por flechas. Los resultados para esta bacteria demuestran que la activación de los bacteriófagos fue exitosa, sin embargo, para poder saber el tipo de bacteriófagos que se obtuvieron es necesario la secuenciación genética.

En las Fig. 26 y 27 se muestran los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7. En los recuadros son señalados las formas que se distinguen con mayor claridad, se presume pudiera tratarse de bacteriófagos del tipo icosaédrico.



**Fig. 26** Imagen correspondiente a bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7.

En la Fig. 27 se muestran las imágenes ampliadas de los recuadros anteriores se señalan con recuadros los posibles bacteriófagos que pueden pertenecer a la familia de los *Corticoviridae*, en la Fig. 22 se pueden observar bacteriófagos MS2 [27] que son similares a los obtenidos en la muestra presentada.



**Fig. 27** Imagen ampliada de la mostrada anteriormente muestra bacteriófagos.

Para ambas bacterias se infiere que hay más de una población de bacteriófagos, la muestra depositada en la rejilla está saturada, de lo que pueden ser proteínas libres, restos de colas de bacteriófagos entre otros artefactos, sin embargo, la secuenciación nos dará la certeza de que bacteriófagos se obtuvieron.

#### **1.1.5. Formación de placas**

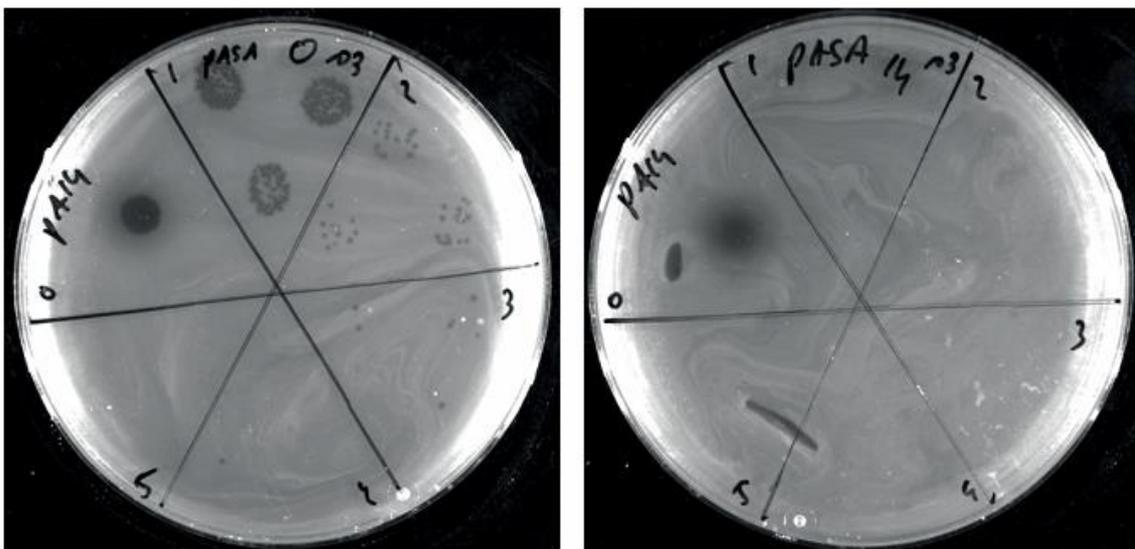
Como último paso en la investigación se evaluó el efecto de los bacteriófagos activados de las bacterias, ya que, gracias a las mediciones anteriores, que demuestran evidencia que la activación y extracción se llevó a cabo de manera exitosa, para esta evaluación se realizó el experimento de siembra en doble placa, el experimento se llevó a cabo solo con los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* 0.522 y *S. aureus* 0.7, que son las muestras en las que se obtuvieron las imágenes en TEM.

Este experimento es ampliamente utilizado para la evaluación bactericida, de múltiples herramientas antimicrobianas, en este caso se utilizará para evaluar la actividad de los bacteriófagos obtenidos.

En la presente investigación se inició solamente con bacterias, no se tenían bacteriófagos para poder hacer la experimentación, se obtuvieron bacteriófagos activándolos de las propias bacterias para poder evaluar el poder bactericida de los mismos sobre las bacterias obteniendo los resultados presentados.

En esta parte del proceso de investigación se realizó el experimento de doble placa, el cual consiste en la siembra de una mezcla de bacterias-bacteriófagos-agar blando, sobre agar duro y con esto evaluar la eficacia de los bacteriófagos en contra de las bacterias.

En el experimento realizado por Gelman et.al. [6] mostrado en la Fig. 28 se observan las cajas de Petri den los que se sembraron mediante el método de doble placa bacteriófagos líticos de *P. aeruginosa*, las placas formadas se observan como pequeños “hoyos” que interrumpen el crecimiento de las bacterias, el experimento doble placa es ampliamente utilizada en la evaluación de la acción antimicrobiana de bacteriófagos [14,16,28].

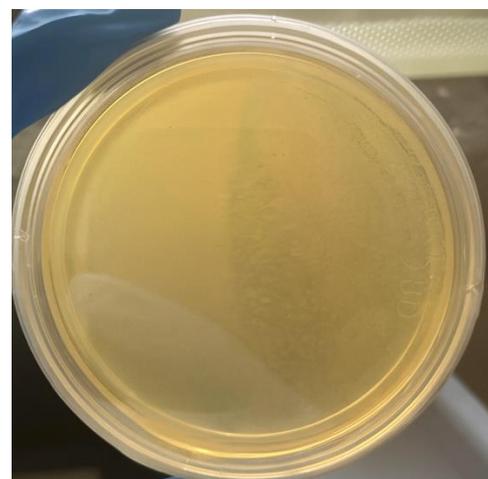


**Fig. 28** Imagen correspondiente a la inhibición de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*, realizado por Gelman, et.al. [6].

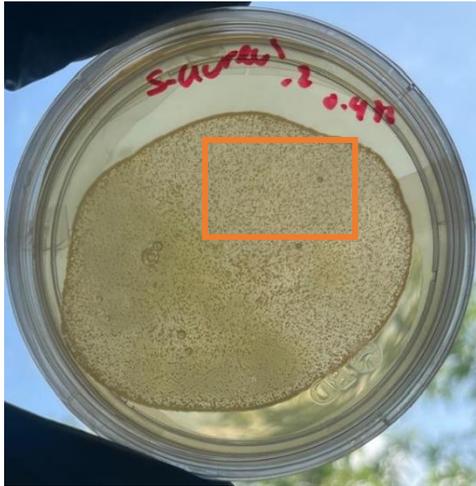
En la Fig. 29 se muestran las cajas de Petri posterior a la incubación en el experimento de siembra en doble placa, el inciso a) corresponde al control negativo, se trató solo con agar blando, este proceso se realizó simultáneamente con la siembra de todas las cajas, no hubo crecimiento de microorganismos, lo que se traduce en que las condiciones del experimento fueron inocuas, sin interferencias; en el inciso b) es mostrado el control positivo, se sembraron solamente las bacterias a una densidad óptica de 0.2-0.3 con el agar blando, muestra el crecimiento de bacterias sin agente represor; el inciso c) perteneciente a S. aureus con dilución de bacteriófagos  $10^{-2}$  la inhibición puede verse por un crecimiento interrumpido, las placas formadas forman una especie de red, este resultado puede compararse con las placas observadas en el experimento de Sharma et.al. [17] mostrado en la Fig. 33, la inhibición de las bacterias es parecida a la obtenida en las cajas de Petri mostradas anteriormente; en el inciso d) Correspondiente a la dilución  $10^{-4}$  de bacteriófagos de S. aureus las placas formadas son más claras que en la caja anterior, la inhibición del crecimiento es señalada por el recuadro y presenta una de las zonas donde los bacteriófagos tomaron acción bactericida.; en el inciso e) Correspondiente a la dilución de bacteriófagos  $10^{-8}$  de S. aureus, las placas formadas son más separadas unas de otras esto gracias a la dilución mayor de los bacteriófagos, las placas pueden observarse más claras que las anteriores.



a)



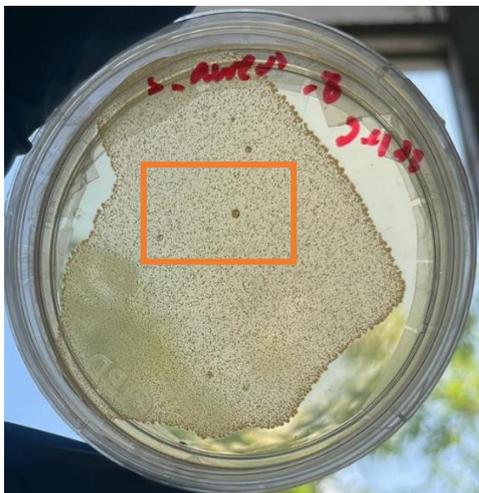
b)



c)



d)



e)

**Fig. 29** Imágenes correspondientes al experimento de siembra de bacterias mediante el método de doble placa. a) Control negativo; b) Control positivo; c) Bacteriófagos de S. aureus con dilución  $10^{-2}$ ; d) Bacteriófagos de S. aureus con dilución  $10^{-4}$ ; e) Bacteriófagos de S. aureus con dilución  $10^{-8}$ .

En la Fig. 30 son mostradas las cajas de Petri de la siembra en doble placa de los bacteriófagos de E. coli 0.5, el inciso a) muestra el Control negativo, solo fue tratado con agar blando y en simultáneo con las demás cajas, no hay crecimiento de microorganismos lo que valida el experimento; el inciso b) muestra el control positivo, se sembró el cultivo de bacterias y agar blando, el crecimiento es mayor

en comparación a las demás cajas, se observan colonias cremosas; en el inciso c) Corresponde a los bacteriófagos de E. coli con dilución  $10^{-2}$ , la inhibición del crecimiento es disminuida, la interrupción del crecimiento puede verse como granulaciones señaladas por flechas; en el inciso d) Corresponde a los bacteriófagos de E. coli con dilución  $10^{-4}$ , el crecimiento de la bacteria es menor comparándolo con la dilución anterior, las placas formadas están señaladas por la flecha y recuadro; el inciso e) Muestra a los bacteriófagos de E. coli con dilución  $10^{-8}$ , las placas formadas son más claras en comparación con las cajas anteriores de la misma bacteria, la dilución es mayor, por esta razón las placas formadas son más claras.

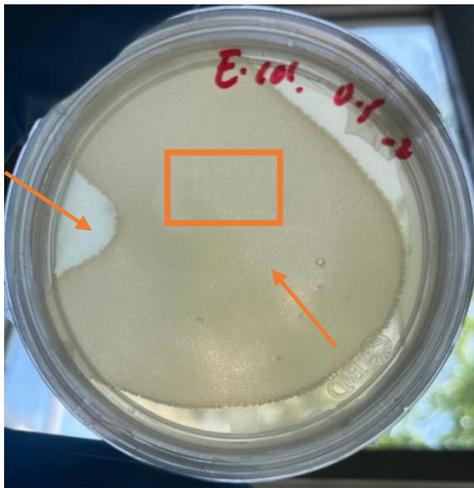
Las causas de la disminución de la actividad antimicrobiana pueden deberse a variables que abarcan desde el tipo de bacteriófagos, ya que en algunos casos los bacteriófagos son altamente sensibles y pueden ser desactivados por diferentes factores, ya sea por acción de la bacteria o por condiciones ambientales como temperatura, presión atmosférica, humedad, entre otros, además se ha probado en algunos experimentos [12,13], que los bacteriófagos lisogénicos que han sido inducidos requieren de agentes que puedan potenciar su acción, como enzimas que ayuden en la disolución de la membrana bacteriana, y también son más efectivos cuando se encuentran en coctel, por lo que pueden ser muy diversas las causas por las que la inhibición bacteriana no sea tan evidente.



a)



b)



c)



d)



e)

**Fig. 30** Imágenes correspondientes al experimento de siembra de bacterias en doble placa. a) Control negativo; b) Control positivo; c) Bacteriófagos de *E. coli* con dilución  $10^{-2}$ ; d) Bacteriófagos de *E. coli* con dilución  $10^{-4}$ ; e) Bacteriófagos de *E. coli* con dilución  $10^{-8}$ .

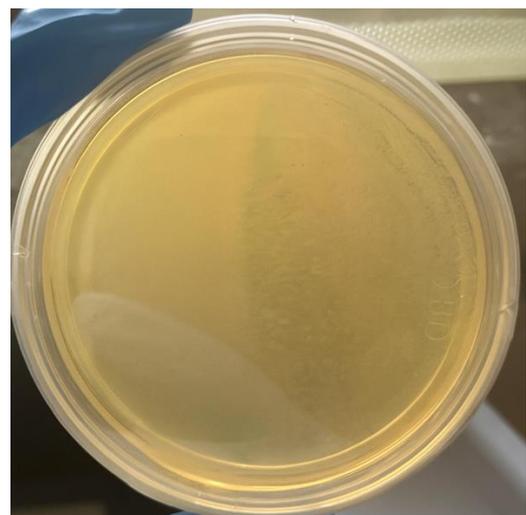
En la Fig. 31 se muestran las cajas de Petri de la siembra en doble placa de los bacteriófagos obtenidos a partir de *S. aureus* 0.7 con diluciones mayores comparándolas al experimento anterior con la finalidad de generar un número menor de placas y hacer posible el conteo de las mismas; en el inciso a) se muestra

el control negativo, el cual solo se procesó con agar blando y en simultáneo con las demás cajas; el inciso b) muestra el control positivo, en donde se observa el crecimiento de la bacteria sin agente represor (bacteriófagos); en el inciso c) se muestra la dilución  $10^{-10}$  las áreas de inhibición son señaladas por recuadros, el crecimiento al igual que en las diluciones anteriores se muestran como “redes” de inhibición; en el inciso d) es mostrada la dilución  $10^{-12}$ , el crecimiento bacteriano es interrumpido, este es señalado por la flecha y el recuadro; el inciso e) corresponde a la dilución  $10^{-14}$  con resultados similares a las cajas anteriores, la inhibición bacteriana está presente, sin embargo, no se logró el objetivo por el cual se realizaron mayores diluciones, que fue una reducción en el número de placas y hacer posible su conteo.

En los experimentos anteriores, las placas formadas no permiten el conteo manual de las mismas debido a que son demasiadas colonias, se pretendía hacer una cuantificación de las unidades formadoras de placas (PFU), esto para tener un marcador cuantitativo de la actividad bactericida de los bacteriófagos, por lo que se realizaron diluciones más elevadas ( $10^{-10}$ ,  $10^{-12}$  y  $10^{-14}$ ), sin embargo, las placas formadas con las diluciones anteriores tuvieron los resultados similares a los de las diluciones más bajas.



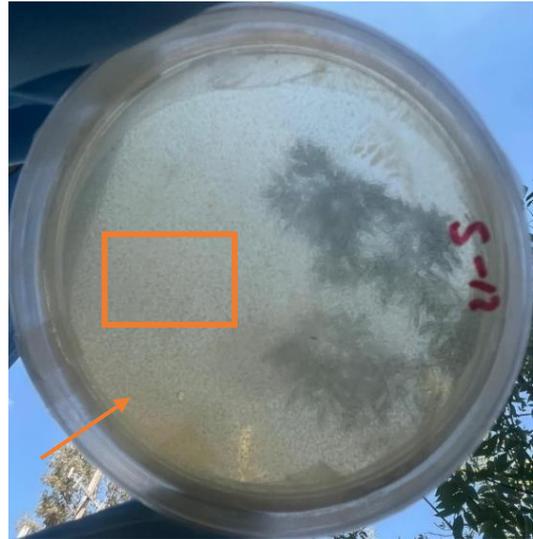
a)



b)



c)



d)



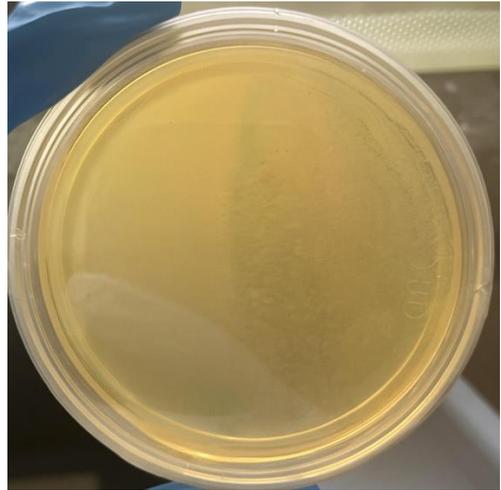
e)

**Fig. 31** Imágenes correspondientes al experimento de siembra de bacterias en doble placa. a) Control negativo; b) Control positivo; c) Bacteriófagos de *S. aureus* con dilución  $10^{-10}$ ; d) Bacteriófagos de *S. aureus* con dilución  $10^{-12}$ ; e) Bacteriófagos de *S. aureus* con dilución  $10^{-14}$  .

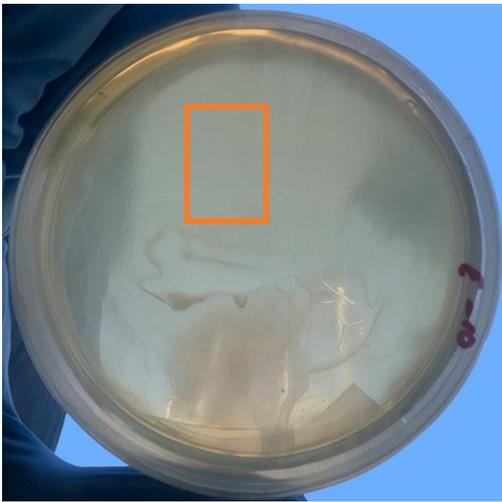
En la Fig. 32 se muestran las cajas de Petri posterior a la siembra en doble placa de *E. coli*, después de hacer diluciones mayores en los bacteriófagos y con ello poder hacer el conteo manual de placas, los resultados para el inciso a) Corresponde al Control negativo, el cual como en los experimentos anteriores se trató solamente con agar blando y en simultáneo con las demás cajas, asegurando que no hay interferencias que afecten los resultados; en el inciso b) se muestra el control positivo, en donde solo se muestra el crecimiento de la bacteria sin agente represor, el crecimiento de la bacteria es aumentado, sin embargo por la baja densidad óptica no es tan marcado; el inciso c) Corresponde a la dilución de bacteriófagos de *E. coli*  $10^{-10}$ , el crecimiento de la bacteria es disminuido, la placas formadas se observan como redes y granulaciones, una de las zonas que presentan estas características es señalada por el recuadro, en comparación con la repetición anterior para esta bacteria, la acción de los bacteriófagos no es tan clara, una de las causas podrían deberse a la dilución elevada a la que se sometieron los bacteriófagos, lo cual disminuyó su efecto; el inciso d) Corresponde a los bacteriófagos obtenidos a partir de *E. coli* con dilución  $10^{-12}$ , las áreas señaladas por el recuadro y la flecha son señaladas unas de las áreas más significativas en las que se observa el efecto de los bacteriófagos, en esta caja las placas se pueden observar más claras y las granulaciones que forman las placas son parecidas a las cajas de los bacteriófagos de *S. aureus* esta bacteria obtuvo los resultados más claros del experimento, sin embargo, la dilución elevada pudo causar que los bacteriófagos no ejercieran su efecto, por lo que se puede inferir que para que haya efecto antimicrobiano debe haber una mayor concentración de bacteriófagos; el inciso e) Correspondiente a la dilución  $10^{-14}$  de los bacteriófagos de *E. coli*, señalados por recuadros y por la flecha las áreas en donde es más significativo, en la flecha se muestra el borde del crecimiento bacteriano que se ve interrumpido por pequeñas granulaciones, en los recuadros se muestra la inhibición de los bacteriófagos, al igual que en las cajas anteriores se forma una especie de red de inhibición.



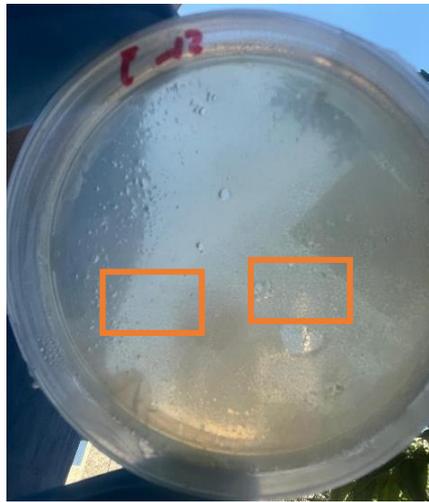
a)



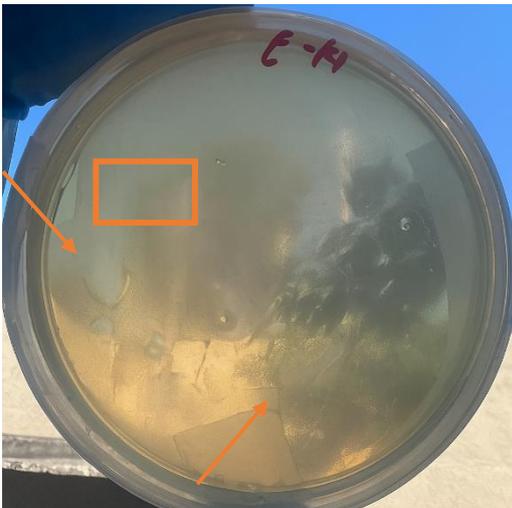
b)



c)



d)



e)

**Fig. 32** Imágenes correspondientes a la siembra de bacterias en doble placa; a) Control negativo; b) Control positivo; c) Bacteriófagos de *E. coli* con dilución  $10^{-10}$ ; d) Bacteriófagos de *E. coli* con dilución  $10^{-12}$  e) Bacteriófagos de *E. coli* con dilución  $10^{-14}$  .

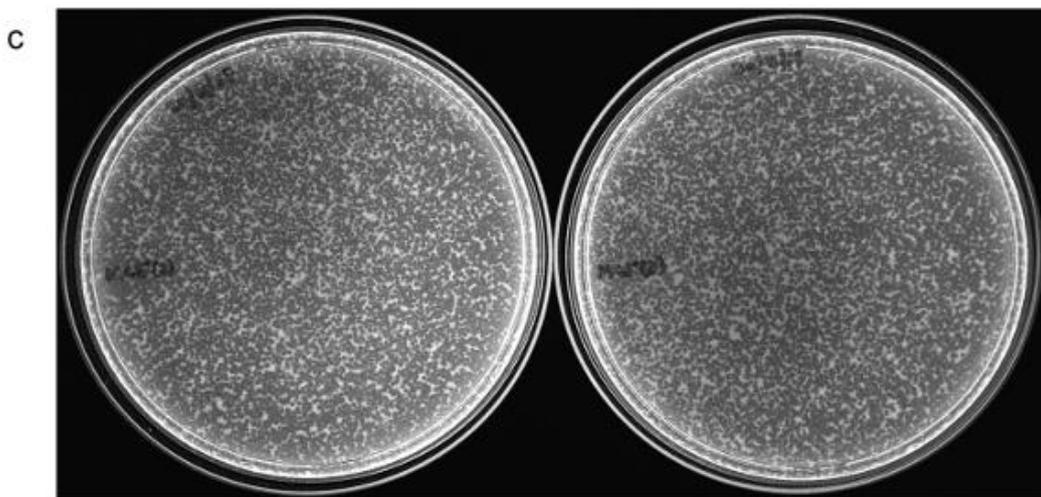
La siembra en doble placa es uno de los métodos para evaluar la acción de los bacteriófagos, como se muestra en las Fig. 31 las placas formadas son más delineadas, este experimento fue realizado con bacteriófagos líticos de *P. aeruginosa* y sangre humana infectada [6], la acción de los bacteriófagos es observada por pequeñas áreas clarificadas, en la Fig. 32 la acción de los bacteriófagos utilizados en este experimento es parecida a los resultados obtenidos en la investigación, en este experimento se evaluaron de igual manera bacteriófagos líticos de *P. aeruginosa* y la imagen presentada es correspondiente a una concentración elevada de bacteriófagos [17], en el presente trabajo de tesis el principal objetivo fue activar los bacteriófagos contenidos en la bacteria, inducirlos a ciclo lítico, caracterizarlos de acuerdo a contenido genético, tamaño y forma para posteriormente probar su eficacia bactericida, en la bibliografía consultada no se encontró un experimento parecido, en el que los bacteriófagos utilizados hayan sido obtenidos de la misma bacteria, por lo que como ya se mencionó anteriormente, se siguieron procedimientos que se siguen para purificar virus, doble placa, etc.

Se demostró la actividad antimicrobiana de los bacteriófagos, ya que en todas las repeticiones la inhibición antimicrobiana es llevada a cabo, los experimentos se llevaron en acompañamiento de la Dra. Verónica Villagrana, en la bibliografía consultada, no se logró encontrar una investigación que pudiera usarse de referencia, la investigación de bacteriófagos como terapia antimicrobiana está en un punto de inicio, los bacteriófagos utilizados son obtenidos de fuentes externas, en las investigaciones de Nale et. al. [20,21] donde se utilizan bacteriófagos lisogénicos de *Clostridium difficile*, que son inducidos a ciclo lítico, estos bacteriófagos son obtenidos a partir de agua residual, fueron inducidos a ciclo lítico, sin embargo, la metodología de activación no es descrita, en las investigaciones

realizadas en la bibliografía los bacteriófagos en su mayoría son del tipo lítico, y obtenidos de fuentes externas, una de las propuestas realizadas por Nale et.al. es utilizar bacteriófagos en coctel para asegurar la muerte de la bacteria y reducir la posibilidad de que las bacterias generen resistencia a los bacteriófagos.

Los bacteriófagos fueron almacenados a una temperatura de 4 °C y suspendidos en buffer TNE ajustado a un pH de 7.5, estas condiciones son a las que los bacteriófagos mantienen su estabilidad, número y efectividad [30].

Con el método de siembra en doble placa que se puede observar en la Fig. 33 en el que se emplearon bacteriófagos líticos específicos de *P. aeruginosa*, en los que la inhibición de crecimiento es muy similar a la obtenida en esta investigación, se observan granulaciones en toda la caja, como se mencionó antes, en la bibliografía consultada, los experimentos relacionados a bacteriófagos se realizaron con bacteriófagos obtenidos de fuentes externas.



**Fig. 33** Imagen del experimento realizado por Sharma et.al. en bacteriófagos líticos de *Pseudomonas aeruginosa* [17].

## Conclusiones

La farmacorresistencia antibiótica es un problema mayor de salud pública, se requieren estrategias para poder combatir bacterias multirresistentes, nuevas opciones de terapia, el abuso y mal uso de antibióticos ha generado que, en la actualidad, las opciones de terapia para tratar infecciones causadas por bacterias se vean reducidas, han desarrollado habilidades que aumentan su infección y mortalidad.

El objetivo principal del trabajo de investigación fue la activación de bacteriófagos mediante el estrés celular provocado por la irradiación UV, la longitud de onda óptima a la cual se obtuvieron exitosamente los bacteriófagos fue de 254 nm con un tiempo de exposición de 10 min, el tiempo fue otro de los objetivos de relevancia del experimento, estos dos puntos fueron cruciales para el desarrollo de la investigación, ya que a partir de estos dos parámetros se lograba la activación y por lo tanto la obtención de la fuente principal de la investigación: los bacteriófagos.

La purificación de bacteriófagos se realizó satisfactoriamente, lo que fue mostrado por la cuantificación molecular, las concentraciones de proteínas obtenidas fueron de 0.27, 0.968, 4.138, 1.102, 6.482 y 8.241 mg/mL, resultados esperados y que fue uno de los primeros indicadores de la presencia de virus, ya que en su superficie están rodeados de proteínas; en cuanto a concentraciones de ácidos nucleicos que fueron 134.7, 110.6, 197.6, 79.8, 394 y 0.4469 ng/ $\mu$ L, otro de los marcadores que se utilizó para confirmar la presencia de bacteriófagos, valores de concentración elevados y los esperados al purificar virus. De acuerdo al tamaño de los bacteriófagos obtenidos, los cuales fueron medidos mediante DLS, con medidas de 25 nm, 18 nm, 25 nm, 24 nm, 15 nm y 20 nm, marcador que al igual que las mediciones anteriores, fue otro de los resultados que confirmarían la presencia de bacteriófagos, ya que los tamaños esperados estaban en el rango 20-200 nm, el marcador que confirmaría la obtención de los bacteriófagos fue la caracterización de acuerdo a forma, obtenida por medio de microscopio electrónico de transmisión, en donde se observaron bacteriófagos que podrían pertenecer a la familia de los *Caudoviricetes* y *Corticoviridae*, con esta caracterización y la confirmación de la obtención de los bacteriófagos se evaluó la acción de los mismos mediante el

método de siembra en doble placa, en estas placas se observó la inhibición del crecimiento de las bacterias por los bacteriófagos, demostrando la activación e inducción de bacteriófagos lisogénicos a bacteriófagos líticos.

En el presente trabajo de tesis, se utilizó una de las propiedades de los bacteriófagos, el cual es la inducción de ciclo lisogénico a ciclo lítico, bacteriófagos que estaban contenidos en una bacteria fueron activados e inducidos a ciclo lítico para erradicar a su misma bacteria, los resultados obtenidos afirmaron la hipótesis planteada al inicio de la investigación, en donde se propuso que algunas bacterias poseen en su genoma a la molécula que sería capaz de erradicarla, los bacteriófagos, lo que confirmó la hipótesis planteada al inicio de la investigación.

Los bacteriófagos han estado presentes desde el inicio de la vida, junto a las bacterias que son la presa de los mismos, se podría deducir que todas las bacterias podrían contener uno o más bacteriófagos lisogénicos, y como se demostró, condiciones de estrés como la irradiación con luz UV inducirá al bacteriófago convirtiéndolo en lítico y con ello provocar la muerte de la bacteria, esta sería una nueva ventaja de la terapia con bacteriófagos, ya que no se tendrán que buscar de fuentes externas, si no que la fuente será la bacteria en sí misma.

Se necesita una guía terapéutica única para administrar los bacteriófagos, ya que por naturaleza no siguen la farmacocinética ni farmacodinamia parecida a ningún otro medicamento, al tener una autorregulación, los bacteriófagos no sufren metabolización, no hay cambios en su estructura, por lo que no se pueden tener parámetros farmacéuticos como clearance, una dosis establecida que permita describir el paso de los bacteriófagos en el cuerpo, uno de los estudios clínicos exitosos donde se administraron bacteriófagos líticos de *A. baumannii* ajustó la terapia diariamente y evaluó la concentración de bacteriófagos en el paciente y con ello poder determinar el tiempo de administración, las concentraciones que se administrarán, en ese periodo de tratamiento la bacteria demostró susceptibilidad a un antibiótico al que anteriormente era resistente, por lo que se optó por una combinación de terapia que culminó con una completa recuperación del paciente [17,23]. Estos estudios sugieren que una combinación de terapia sería lo más viable

para así reducir las posibilidades de que las bacterias generen mecanismos de resistencia hacia los bacteriófagos o los antibióticos.

Los resultados obtenidos en la investigación cumplieron con los objetivos planteados al inicio de la misma, el crecimiento de bacterias fue exitoso, el estrés celular generado por la irradiación UV generó la activación de los bacteriófagos, estos bacteriófagos activados demostraron actividad antimicrobiana en contra de sus propias bacterias. Como futura investigación se tendrán que secuenciar las muestras de bacteriófagos obtenidas, esto para poder determinar que bacteriófagos se obtuvieron, su contenido genético y si es necesario poder enriquecerlo con moléculas que potencien su acción, como endolisinas purificadas, holinas, enzimas que degraden rápidamente la membrana de la bacteria, iones que favorezcan la unión del bacteriófago a la bacteria, entre otros.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Nakatani, Y., & Salomon, J. (2024, May 17). *La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
2. Ahmad, T. A., Houjeiry, S. el, Kanj, S. S., Matar, G. M., & Saba, E. S. (2024). *From forgotten cure to modern medicine: The resurgence of bacteriophage therapy*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 39(1), 231-239, <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.10.259>
3. Maganha de Almeida Kumlien, A. C., Borrego, C. M., & Balcázar, J. L. (2021). *Antimicrobial Resistance and Bacteriophages: An Overlooked Intersection in Water Disinfection*. *Trends in Microbiology*. 29(6), 517-527, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.011>

4. Summers, W. C. (1999). *Félix D'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. British Library.
5. Wasserman, Edel. et. al. (1999). *The discovery and development of penicillin 1928-1945*. American Chemical Society, 1(1), 2–8, <https://www.acs.org/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>
6. Gelman, D., Yerushalmy, O., Alkalay-Oren, S., Rakov, C., Ben-Porat, S., Khalifa, L., Adler, K., Abdalrhman, M., Copenhagen-Glazer, S., Aslam, S., Schooley, R. T., Nir-Paz, R., & Hazan, R. (2021). *Clinical Phage Microbiology: a suggested framework and recommendations for the in-vitro matching steps of phage therapy*. *The Lancet Microbe*. 2(10), e555-e563, [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00127-0)
7. Makky, S., Dawoud, A., Safwat, A., Abdelsattar, A. S., Rezk, N., & El-Shibiny, A. (2021). *The bacteriophage decides own tracks: When they are with or against the bacteria*. *Current Research in Microbial Sciences*. 2(1), <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100050>
8. Pattnaik, A., Pati, S., & Samal, S. K. (2024). *Bacteriophage as a potential biotherapeutics to combat present-day crisis of multi-drug resistant pathogens*. *Heliyon*. 10 (18), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37489>
9. Yamashita, W., Ojima, S., Tamura, A., Azam, A. H., Kondo, K., Yuancheng, Z., Cui, L., Shintani, M., Suzuki, M., Takahashi, Y., Watashi, K., Tsuneda, S., & Kiga, K. (2024). *Harnessing a T1 Phage-Derived Spanin for Developing Phage-Based Antimicrobial Development*. *BioDesign Research*, 6, 1–3. <https://doi.org/10.34133/bdr.0028>
10. Martins, W. M. B. S., Toleman, M. A., & Gales, A. C. (2020). *Clinical utilization of bacteriophages: a new perspective to combat the antimicrobial resistance in Brazil*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 24(3), 239-246, <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.04.010>
11. Osterhout, R. E., Figueroa, I. A., Keasling, J. D., & Arkin, A. P. (2007). *Global analysis of host response to induction of a latent bacteriophage*. *BMC Microbiology*, 7, 2–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-82>

12. Volozhantsev, N. v., Borzilov, A. I., Shpirt, A. M., Krasilnikova, V. M., Verevkin, V. v., Denisenko, E. A., Kombarova, T. I., Shashkov, A. S., Knirel, Y. A., & Dyatlov, I. A. (2022). *Comparison of the therapeutic potential of bacteriophage KpV74 and phage-derived depolymerase ( $\beta$ -glucosidase) against Klebsiella pneumoniae capsular type K2*. *Virus Research*, 322, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198951>
13. Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). *A roadmap for genome-based phage taxonomy*. *Viruses*, 13(3), 1–3. <https://doi.org/10.3390/v13030506>
14. Ananna, N. T., Shishir, T. A., Ahmed, A., al Sium, S. M., Shakil, M. S., Haque, F. K. M., & Hasanuzzaman, M. (2024). *Characterization of two lytic bacteriophages infecting carbapenem-resistant clinical Klebsiella pneumoniae in Dhaka, Bangladesh*. *Virus Research*, 350, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2024.199491>
15. Rebula, L., Raspor, A., Bavčar, M., Štrancar, A., & Leskovec, M. (2023). *CIM monolithic chromatography as a useful tool for endotoxin reduction and purification of bacteriophage particles supported with PAT analytics*. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1217, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123606>
16. Kramberger, P., Honour, R. C., Herman, R. E., Smrekar, F., & Peterka, M. (2010). *Purification of the Staphylococcus aureus bacteriophages VDX-10 on methacrylate monoliths*. *Journal of Virological Methods*, 166(1–2), 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.02.020>
17. Sharma, S., Datta, S., Chatterjee, S., Dutta, M., Samanta, J., Vairale, M. G., Gupta, R., Veer, V., & Dwivedi, S. K. (2021). *Isolation and characterization of a lytic bacteriophage against Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98457-z>
18. Azam, A. H., Sato, K., Miyanaga, K., Nakamura, T., Ojima, S., Kondo, K., Tamura, A., Yamashita, W., Tanji, Y., & Kiga, K. (2024). *Selective bacteriophages reduce the emergence of resistant bacteria in bacteriophage-antibiotic combination therapy*. *Microbiology Spectrum*, 12(6). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00427-23>

19. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). *The influence of external factors on bacteriophages-review*. *Folia Microbiologica*. 56(3), 191-200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
20. Nale, J. Y., Redgwell, T. A., Millard, A., & Clokie, M. R. J. (2018). *Efficacy of an optimised bacteriophage cocktail to clear Clostridium difficile in a batch fermentation model*. *Antibiotics*, 7(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010013>
21. Nale, J. Y., Spencer, J., Hargreaves, K. R., Trzepiński, P., Douce, G. R., & Clokie, M. R. J. (2016). *Bacteriophage combinations significantly reduce Clostridium difficile growth in vitro and proliferation in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 968–981. <https://doi.org/10.1128/AAC.01774-15>
22. Sugai, K., Kawada-Matsuo, M., Nguyen-Tra Le, M., Sugawara, Y., Hisatsune, J., Fujiki, J., Iwano, H., Tanimoto, K., Sugai, M., & Komatsuzawa, H. (2023). *Isolation of Streptococcus mutans temperate bacteriophage with broad killing activity to S. mutans clinical isolates*. *IScience*, 26(12). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108465>
23. Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., McCauley, M. D., Strathdee, S. A., ... Hamilton, T. (2017). *Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant Acinetobacter baumannii infection*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
24. Millares de la Peña, M. (2020). *Bacteriófagos, una herramienta prometedora contra las bacterias multirresistentes* [Trabajo de grado, Universidad de La Laguna], Repositorio Institucional de la Universidad de La Laguna. <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/20666>
25. Villagrana Escareño, M. V. (2016). *Encapsidación de plásmidos de DNA por proteínas del CCMV para formar partículas tipo virus*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de San Luis Potosí].

26. Dharmaraj, T., Kratochvil, M. J., Pourtois, J. D., Chen, Q., Hajfathalian, M., Hargil, A., Lin, Y.-H., Evans, Z., Oromí-Bosch, A., Berry, J. D., McBride, R., Haddock, N. L., Holman, D. R., van Belleghem, J. D., Chang, T. H., Barr, J. J., Lavigne, R., Heilshorn, S. C., Blankenberg, F. G., & Bollyky, P. L. (2023). *Rapid assessment of changes in phage bioactivity using dynamic light scattering*. The preprint server for biology. 5(6). <https://doi.org/10.1101/2023.07.02.547396>
27. Mikel, P., Vasickova, P., Tesarik, R., Malenovska, H., Kulich, P., Vesely, T., & Kralik, P. (2016). *Preparation of MS2 phage-like particles and their use as potential process control viruses for detection and quantification of enteric RNA viruses in different matrices*. *Frontiers in Microbiology*, 7(10), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01911>
28. Aebi, U. et. al. (1987). *A Glow Discharge Unit to Render Electron Microscope Grids and Other Surfaces Hydrophilic*. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 7(1), 1–3. <https://doi.org/https://onlinelibrary.wiley.com/toc/15530817/1987/7/1>
29. de Martín Garrido, N., Crone, M. A., Ramlaul, K., Simpson, P. A., Freemont, P. S., & Aylett, C. H. S. (2020). *Bacteriophage MS2 displays unreported capsid variability assembling  $T=4$  and mixed capsids*. *Molecular Microbiology*, 113(1), 143–152. <https://doi.org/10.1111/mmi.14406>
30. Zhang, S., Ye, Q., Wang, M., Zhu, D., Jia, R., Chen, S., Liu, M., Yang, Q., Zhao, X., Wu, Y., Huang, J., Ou, X., Sun, D., Tian, B., He, Y., Wu, Z., & Cheng, A. (2025). *Isolation and characterization of a broad-spectrum bacteriophage against multi-drug resistant Escherichia coli from waterfowl field*. *Poultry Science*, 104(2). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.104787>

# María Fernanda Álvarez Reyes

## TesisM.FCQ.2025.Activación.Alvarez.pdf

 Universidad Autónoma de San Luis Potosí

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:471060233

Fecha de entrega

1 jul 2025, 7:50 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

1 jul 2025, 7:53 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

TesisM.FCQ.2025.Activación.Alvarez.pdf

Tamaño de archivo

3.2 MB

101 Páginas

22.335 Palabras

117.653 Caracteres

# 11% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

## Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Methods and Materials

## Fuentes principales

- 11%  Fuentes de Internet
- 3%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Marcas de integridad

### N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## ANEXOS

### EQUIPOS UTILIZADOS A LO LARGO DE LA INVESTIGACIÓN

#### Campana de flujo laminar



Marca: Thermo Fisher Scientific

Modelo: 1395

Potencia: 120 V; 50/60 HZ; 8.00 A

Rango de presión: .20-.32 a 488 cfm y .16-.28 a 265 cfm

Velocidad de admisión primaria: 100-110 FPM

Velocidad de flujo descendente: 58-68 FPM

La cabina de seguridad biológica es adecuada para todas las aplicaciones en las que se requiere protección del personal, del medio ambiente y de los productos, así como protección contra la contaminación cruzada.

Las aplicaciones típicas son aplicaciones de investigación rutinarias de cultivo celular, investigación clínica, investigación en ciencias biológicas y microbiología. Utilizada para manipular reactivos y material que requerían esterilidad, tales como caldos enriquecidos previos a la inoculación de bacterias, buffers, entre otros.

### **Espectrofotómetro UV/VIS Nanodrop 2000c**



Marca: Thermo Scientific

Rango fotométrico: Pedestal 0.3000 Abs y Cubeta 0.15 Abs

Exactitud en absorbancia: 3% (a 0.74 Abs a 350nm)

Límites de detección: Pedestal: 2ng/μL (dsDNA), 0.10mg/ml (BSA); Cubeta: 0.4 ng/μL (dsDNA), 0.01 mg/mL (BSA)

Fuente de iluminación: Lámpara de xenón

Volumen de muestra: 0.2 μL a 0.5 mL

Tiempo de medida: < 3 s

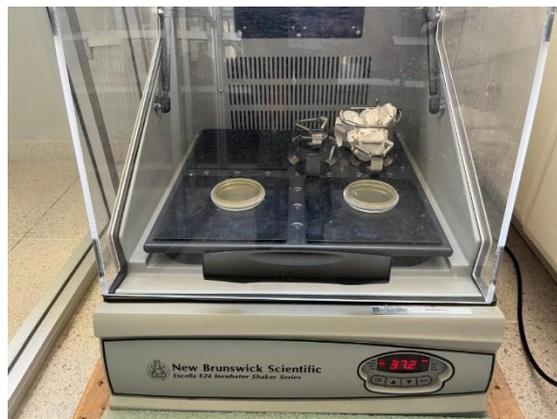
Utilizado para medir concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos, densidad óptica de los medios bacterianos.

El Thermo Scientific NanoDrop™ 2000c permite realizar mediciones directas y sencillas: solo se pipetea y se limpia. El NanoDrop™ 2000c es mucho más rápido y preciso que un espectrofotómetro convencional. La medición directa permite obtener lecturas precisas en menos de 5 segundos.

El NanoDrop™ 2000c utiliza tecnología patentada de retención de muestras que permite tamaños de muestra de tan solo 0,5 µL. El NanoDrop™ 2000 ofrece una salida espectral completa y es capaz de medir ADN, ARN (A260), proteínas (A280), concentración y pureza de la muestra (proporción 260/280). El NanoDrop™ 200 ofrece un rango de concentración de 2 ng/µl a 15 000 ng/µl de dsADN sin diluciones. Otras características del NanoDrop™ 2000 incluyen:

Métodos preconfigurados para aplicaciones comunes como ácidos nucleicos, proteína A280, microarrays, proteínas y marcadores, Bradford, BCA, Lowry y Pierce 660 nm.

### **Incubadora mixer**



Marca: Eppendorf

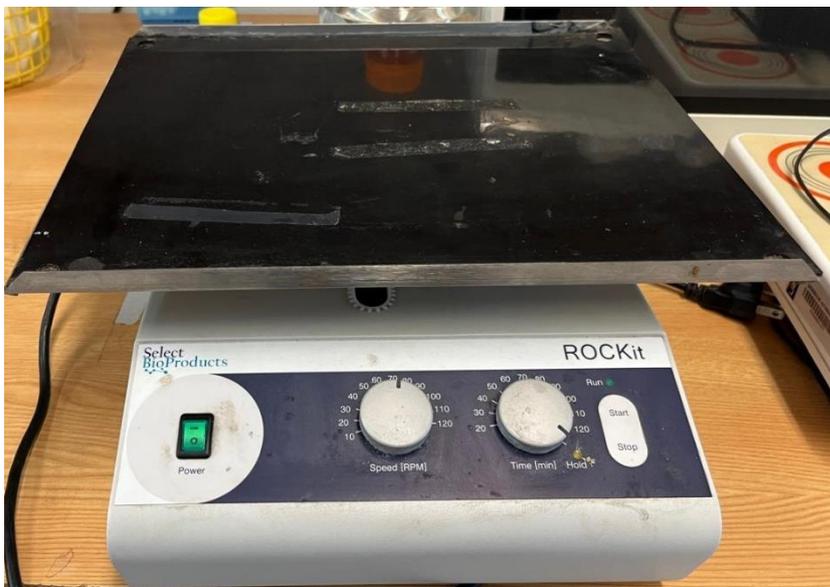
Modelo: Excella 24 Shaker series

Utilizada para la incubación de bacterias y en la interacción bacterias-bacteriófagos.

El agitador New Brunswick E24 usa un mecanismo de accionamiento basculante unicentric, este mecanismo proporciona un movimiento rotatorio plano horizontal en un órbita circular de 1.91 cm (3/4 de pulgada) de diámetro. Un microprocesador proporcional/integral controla la velocidad y temperatura a lo largo de todo el rango.

Funciona a temperaturas de 7 °C por encima del ambiente a 60 °C, este rango depende de la humedad relativa y de otros factores ambientales. Se pueden alojar matraces Erlenmeyer, matraces Fernbach de 2.8 L y una amplia variedad de tubos y placas.

### Agitador ROCKit



Marca: Select Bioproducts

Utilizado para resuspender pellet que contenía los bacteriófagos.

El Rock-it Platform Rocker cuenta con velocidad variable y un ángulo de inclinación ajustable. Para teñir geles frágiles, se puede seleccionar un movimiento de onda suave. Se pueden configurar condiciones más vigorosas para lavar membranas más resistentes. El ángulo de inclinación y la velocidad se modifican simplemente girando las perillas correspondientes.

Las plataformas están fabricadas en acero inoxidable con una alfombrilla de goma para mantener los recipientes de muestras en su lugar. Un motor de alta resistencia impulsa cargas de hasta 5 kilogramos, mientras que los rodamientos de bolas con lubricación permanente garantizan un funcionamiento suave y sin necesidad de mantenimiento.

## Autoclave



Esterilizador automático de alta presión

Rango de temperatura para esterilizar: 105-128 °C

Rango de temperatura para secar: 150-180 °C

Presión máxima: 0.2 MPa

Utilizada para esterilizar material y reactivos.

Estos modelos son esterilizadores automáticos de vapor de alta presión con sistema de entrada de clave interactiva, que permite esterilizar y secar instrumentos o ropa utilizados en investigaciones o exámenes de medicamentos, tratamientos médicos, alimentos, etc., con la máxima seguridad.

Con un sistema interactivo de entrada de teclas, las condiciones se memorizan. Con solo pulsar una tecla, todo se realiza automáticamente, desde la extracción del aire hasta la esterilización y el secado.

Está disponible la configuración por horas y funcionamiento continuo. También es posible esterilizar los medios. Las medidas de seguridad se enriquecen incluyendo una función de autodiagnóstico y un dispositivo de prevención en caso de colocación incorrecta de los depósitos de drenaje.

### **Balanza analítica**



Marca: Voyager

Utilizada en la preparación de diversos reactivos.

Diseñadas para tareas que requieran algo más que una balanza de rutina; su software de aplicación avanzado simplifica hasta las mediciones más complejas. Incluye una pantalla LCD ajustable retroiluminada, que guía al usuario a través de una amplia variedad de aplicaciones y una selección de 15 pesas. La función de Autocal calibra la balanza cuando nota un cambio de temperatura suficiente que puede afectar a la exactitud.

## Productor de agua ultra pura



Produce agua ultra pura con calidad superior a lo especificado para agua tipo I

Conductividad: 0.055  $\mu\text{S}/\text{cm}$

Utilizada para preparación de reactivos y lavado de material.

Este sistema compacto y fiable es una elección fantástica para aplicaciones como las de HPLC u otros análisis de instrumentos, preparación de muestras, lavado del instrumental de vidrio o trabajos de biología molecular en los que interferirían endotoxinas o nucleasas. Coloque el sistema sin acceso directo a la tubería de agua con el depósito integrado de agua de suministro de 6 l opcional. Compruebe fácilmente la pantalla con un visor basculante retroiluminado. Supervise la calidad del agua de suministro para ayudar a maximizar la vida útil del cartucho.

## Ultracongelador



Marca: Eppendorf

Temperatura: -86/-50 °C

Utilizado para almacenar bacterias.

Los congeladores se han fabricado utilizándose acero y piezas electrónicas de alta calidad para garantizar una vida útil prolongada. Los armarios están aislados con una combinación de espuma de poliuretano (aplicada in situ) y unos paneles de aislamiento al vacío. Esta combinación garantiza unas propiedades aislantes superiores, disponiendo al mismo tiempo de una capacidad interna extra grande comparada con el espacio que ocupa el congelador. Los congeladores de la serie Inova están provistos de muchas características y funciones diseñadas para proporcionar un uso y mantenimiento fácil, así como seguridad y fiabilidad a sus requisitos de almacenamiento a temperaturas ultra bajas. Han sido construidos bajo estricta observación de los requisitos reglamentarios respecto a seguridad, respecto al medio ambiente y eliminación; además disponen de marcado CE y de la certificación UL.

## Centrifuga



Modelo: Biofuge stratus

Marca: Kendro, Laboratory Products

Voltaje: 120 VAC

Fuente de poder: 1300 W

Utilizada para eliminar grandes partículas en la extracción de bacteriófagos.

Velocidad regulable de 300 a 23.300 rpm en incrementos de 10. Aceleración/freno de 9 niveles. Capacidad máxima 4 x 180 ml. Reconocimiento automático de rotor. Nueve programas más uno de preenfriamiento. Rango de temperatura de -19 °C a +40 °C. Temporizador de 0 a 9 hrs 59 mins o funcionamiento continuo.

Dimensiones: 395\*640\*595 mm, 134 kg.

## Ultracentrifuga



Modelo: óptima MAX-XP Ultracentrifuge

Marca: Beckman Coulter

Velocidad regulable hasta 100, 000 rpm.

Utilice la ultracentrífuga Optima MAX-TL para aplicaciones que requieran grandes campos de fuerza que puedan separar y aislar pequeñas partículas (virus, bacterias y componentes subcelulares, como mitocondrias) y grandes moléculas (péptidos, ADN, proteínas). Estas muestras derivan de una gran variedad de componentes naturales y sintéticos.

## Equipo de Dispersión de Luz Dinámica (DLS)



Modelo: Zetasizer Nano ZS

Marca: Malvern Panalytical

-Utilizado para caracterizar los bacteriófagos obtenidos por tamaño de partícula.

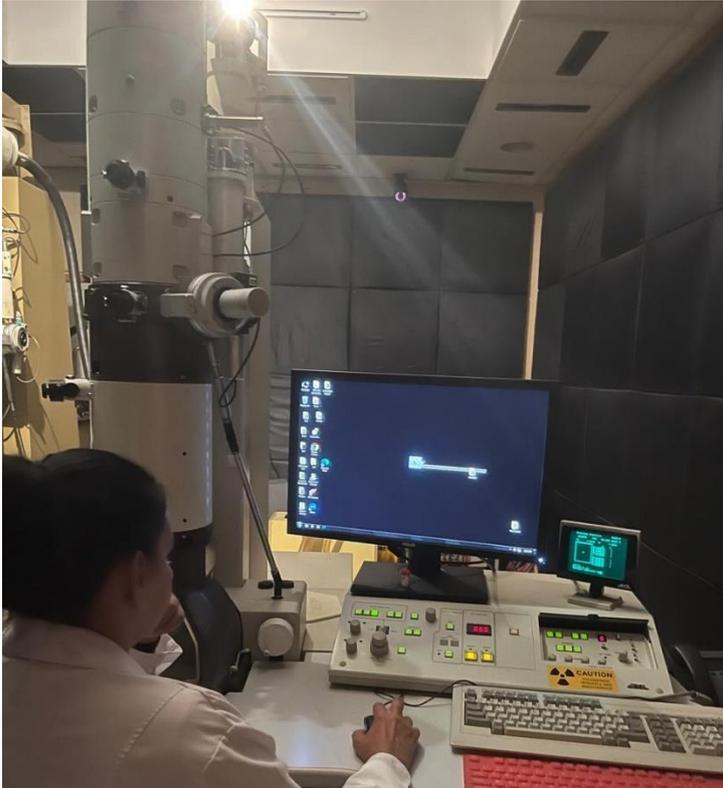
Análisis DLS: Mediciones del tamaño de partículas de 0,3 nm a 10  $\mu\text{m}$

El análisis de rango de tamaño ampliado ofrece una precisión mejorada para tamaños de partículas superiores a 1  $\mu\text{m}$  y resultados indicativos superiores a 10  $\mu\text{m}$  (utilizando la celda de dimensionamiento desechable de bajo volumen ZSU1002)

Potencial zeta de nanopartículas y coloides mediante análisis M3-PALS y modo de corriente constante zeta

Peso molecular mediante el uso de dispersión de luz estática a 90 °

## Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)



Utilizado para caracterizar bacteriófagos de acuerdo a morfología.

Es un instrumento científico que utiliza un haz de electrones para observar la estructura interna de materiales, incluyendo tejidos biológicos y materiales no biológicos, a muy alta resolución. La técnica consiste en dirigir un haz de electrones a través de una muestra ultradelgada, obteniendo una imagen de la estructura interna basada en cómo los electrones son transmitidos o dispersados.