

Depósito Legal ppi 201502ZU4668



Vol. 26, No 1, 2
Enero - Junio 2018

CIENTIFICA



An International Refereed Scientific Journal
of the Facultad Experimental de Ciencias
at the Universidad del Zulia

Esta publicación científica en
formato digital es continuidad
de la revista impresa

Depósito Legal: pp 199302ZU47

ISSN: 1315-2076

Caracterización de fagos líticos-específicos de *Pseudomonas aeruginosa* con un amplio espectro infectivo

Lenin González-P^{1*}, Carla Lossada³, Gabriela Galué-Durán¹, Irene Zabala¹,
Aleivi Pérez², Ysaías Alvarado³

¹Laboratorio de Genética y Biología Molecular (LGBM). Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias (FEC). La Universidad del Zulia (LUZ). Maracaibo, Venezuela.

²Laboratorio de Microbiología General. Departamento de Biología, FEC-LUZ.

³Laboratorio de Caracterización Molecular y Biomolecular (LCBM) IVIC-Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 18-12-2017 Aceptado: 30-01-2018

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, multirresistente frente a la acción de varios antibióticos, por lo que se hace necesario considerar alternativas antipseudomónicas entre las que se incluye la utilización de fagos. Estos han sido aprovechados para el control de patógenos. En este trabajo se evaluó la actividad antagonista *in vitro* de bacteriófagos obtenidos de 50 muestras de agua residual doméstica del estado Zulia sobre *P. aeruginosa*. Las muestras se pre-enriquecieron, y los sobrenadantes se filtraron, purificaron y almacenaron. La detección de fagos se realizó por doble capa de agar. Se utilizó la cepa *P. aeruginosa* ATCC®27853 como hospedero, y microorganismos Gram positivos y Gram negativos para establecer perfil infectivo. Se evaluó el ciclo biológico y estabilidad a variaciones de pH y temperatura de los fagos. Se detectaron fagos antipseudomónicos en 60% de las muestras. El 85% de los aislados logró infectar todas las cepas de *P. aeruginosa*. El 80% de los fagos fueron adsorbidos en <10min tras ser expuestos frente al hospedero. Los fagos resultaron estables a diversos intervalos de pH y temperatura. Los fagos resultaron líticos específicos, posibles miembros del orden *Caudovirales*, y candidatos deseables para el desarrollo de agentes antagonistas frente a patógenos multiresistentes como *P. aeruginosa*.

Palabras Claves: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriófagos, enzibióticos.

Characterization of lytic-specific phages of *Pseudomonas aeruginosa* with a broad infective spectrum

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunity pathogen that may become multiresistant to antibiotics. Hence, it is necessary to consider alternative medical procedure using antipseudomonal agents like bacteriophages. Their lytic enzymes with bactericidal actions have been widely utilized to control this type of microorganisms. Screening of 50 samples of wastewater from of Zulia state was performed to evaluate bacteriophages' antagonistic activity on *P. aeruginosa*. The samples were pre-enriched and the supernatants were filtered, purified and stored. Detection was performed by double layer agar. The strain *P. aeruginosa* ATCC®27853 was used as a host, and several microorganisms, both Gram positive and Gram negative, were used to establish infective profile. Antipseudomonic phages' biological cycle and stability to pH and temperature variations were evaluated. Antipseudomonic phages were detected in 60% of the samples. 85% of the isolates managed to infect all strains of *P. aeruginosa*. 80% of the phages were adsorbed in <10min after being exposed to the host. All phages were stable at various pH and temperature ranges. There were no apparent changes in lysis plate morphology. The phages had characteristics that make them possible members of the order *Caudovirales* and potential antagonistic agents against multiresistant pathogens such as *P. aeruginosa*

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriophages, enzybiotics.

* lgonzalezpaz@gmail.com

Introducción

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, prevalente en medios hospitalarios, el cual llega a causar infecciones nosocomiales severas al colonizar sistemas como el tracto respiratorio de pacientes inmunocomprometidos, fibroquísticos o con quemaduras severas [1]. Si bien los antibióticos han contribuido a mejorar el pronóstico de estos pacientes, su uso frecuente y prolongado ha sido un factor importante en la selección de cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes [2]. El surgimiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos ha motivado la búsqueda de alternativas antagónicas, con menos efectos secundarios y con una alta especificidad para evitar perturbar la microbiota del ser humano [3]. Una estrategia prometedora es el uso de bacteriófagos (virus que infectan a bacterias) y de sus derivados enzimáticos (enzimbióticos). Estos han sido descritos como potenciales agentes antimicrobianos contra cepas bacterianas multiresistentes a antibióticos, incluyendo a *P. aeruginosa* [4-6]. Casi todos los estudios acerca de fagos de *P. aeruginosa* han sido llevados a cabo con muestras de aguas residuales recolectadas del ambiente y de hospitales en EEUU y en países de Europa, Australia, Asia y África [4-5,7-10], existiendo muy pocos reportes en Sudamérica relacionados a la acción de fagos capaces de infectar diversas cepas de *P. aeruginosa*, tanto sensibles como multiresistentes a fármacos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio se basó en aislar y caracterizar fagos específicos de *P. aeruginosa* multiresistentes a fármacos a partir de muestras de aguas residuales para posteriormente poner a prueba su potencial como alternativas antimicrobianas.

Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se estudió una cepa de *P. aeruginosa* de origen clínico confirmada por el Laboratorio de Genética y Biología Molecular (LGBM) de la Facultad de Ciencias (FEC) de la Universidad del Zulia (LUZ) como productora de metalo- β -lactamasas (MBLs) de espectro extendido mediante métodos fenotípicos y genotípicos. Además, las cepas de referencia *P. aeruginosa* ATCC®27853 (usada como hospedador) y *P. aeruginosa* ATCC®10145, criopreservadas en el LGMB-FEC-LUZ a -20°C en caldo Tripticasa Soya (TBS) (Merck®, Alemania) con un contenido de glicerol de 20% (Sigma, EUA).

2. Aislamiento, propagación y purificación de los bacteriófagos de *P. aeruginosa*

Durante los meses de mayo-agosto del año 2017, se tomaron 50 muestras de agua residual doméstica en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Se aislaron los fagos de las muestras mediante la técnica de pre-enriquecimiento [11], con modificaciones [12-13]. Se agregó 50mL de medio TSB (Merck®, Alemania) a 50mL de la muestra de agua residual doméstica, y se incubó 18-24h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente fue filtrado con membranas de $0,45\mu\text{m}$ y alícuotas de 1,4mL fueron vertidas en tubos, a las cuales se le agregó 0,1mL de cloroformo (Sigma®, EUA). La solución fue mezclada y centrifugada (10.000xg , 30min). El sobrenadante se transfirió en un tubo falcon. El pellet fue resuspendido con 1,5mL de extracto de carne (EC) al 3% (HIMEDIA®, India). La mezcla fue centrifugada (5.000xg , 15min) y el sobrenadante fue transferido de forma aséptica al tubo falcon reservado. El sobrenadante se almacenó a -20°C por 24h. Posteriormente, la suspensión se pasó por filtros de $0,2\mu\text{m}$ y se almacenó a 4°C . Los fagos fueron propagados y purificados a partir de aislados de una sola placa según la metodología reportado por El Didamony y col. (2015) y Ahiwale y col. (2012) [4,9].

3. Preparación del lisado

Se transfirió una placa ($0,5\text{-}3\text{mm}$ de diámetro) a 50mL la solución estéril de fago con 0,5mL de cultivo de *P. aeruginosa* en fase logarítmica. El matraz fue cultivado a 37°C por 24h sin agitar. Su contenido fue centrifugado, filtrado a través de una membrana de $0,20\mu\text{m}$ y almacenado a 4°C . Se utilizó la técnica de doble capa de agar para calcular la concentración (UFP/mL) [4,9].

4. Determinación del rango de hospedadores de los bacteriófagos

Para determinar el rango de hospedadores se empleó la técnica de doble capa de agar [5-10]. Se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC®25923, *S. aureus* ATCC®6538P, *S. aureus* LGMB-MRSA, *S. epidermidis* ATCC®12228, *Enterococcus faecalis* ATCC®29212, *E. faecalis* LGMB-Q65, *Micrococcus luteus* ATCC®9341, *Escherichia coli* ATCC®35218, *E. coli* LGMB-ESBL, *P. aeruginosa* ATCC®10145, *P. aeruginosa* ATCC®27853 y *P. aeruginosa* LGMB-MBL+. Cada fago fue probado contra cada cepa bacteriana por triplicado y en al menos tres experimentos independientes. En base a la claridad de la zona lítica, las placas fueron categorizadas como claras, claras con halo o sin reacción. El tamaño y la

morfología de las placas de lisis obtenidas fueron examinadas durante cada tratamiento distinto (pH y temperatura) [9].

5. Efecto del pH en la estabilidad de los bacteriófagos

La estabilidad de los fagos fue estudiada usando buffer fosfato, con pH ajustado a 3, 4,5,6,8 y 9. Alícuotas (1mL) de lisado ($1,5 \times 10^9$ UFP/mL) fueron suspendida en 9mL del buffer respectivo en tubos de ensayo e incubadas por 2h. Los contenidos de los tubos fueron diluidos en serie y las UFP/mL en cada uno fueron determinadas por ensayo de placas usando la bacteria hospedadora *P. aeruginosa*. Las mediciones se tomaron cada 30min [9].

6. Efecto de la temperatura en la estabilidad de los bacteriófagos

La estabilidad de los fagos fue evaluada a diferentes temperaturas (25, 30, 35 y 40°C), incluyendo las de almacenado (-20° y -4°C). Alícuotas de 1mL de lisado ($1,5 \times 10^9$ UFP/mL) fueron colocada en tubos tapados estériles e incubadas a su temperatura respectiva por 2h. Las UFP/mL fueron determinadas de la manera mencionada anteriormente [9].

7. Curva de crecimiento en un paso

La curva de crecimiento en un paso se determinó de acuerdo al método de El Didamony y col. [4], con algunas modificaciones. Los fagos fueron agregados a un $MOI < 0,1$ a las células de *P. aeruginosa*. La mezcla fue centrifugada (10,000xg, 10min) y el pellet con las células infectadas fue resuspendido en 10mL de caldo nutritivo y fue incubado a temperatura ambiente. Se tomaron muestras por duplicado cada 5min durante 1h, diluidas y tituladas mediante el método de doble capa. El segundo set de muestras fue tratado con cloroformo al 1% para liberar fagos intracelulares para determinar el período de eclipse. La mezcla de cada tubo de ensayo fue diluida en serie en caldo EC y las UFP/mL fueron determinadas como se mencionó anteriormente [9].

8. Cinética de adhesión de los bacteriófagos

Fue introducido 1mL del cultivo en fase logarítmica de la bacteria hospedadora [OD650 0.05, $2,8 \times 10^9$ UFC/mL] en un matraz estéril de 50mL y fue incubado por 24h a 37°C. El lisado de fagos ($1,5 \times 10^9$ UFP/mL) fue agregado al matraz (0.5mL, $MOI < 0.1$). En intervalos de 5min durante 1h, alícuotas de 50μL fueron extraídas y transferidas

a tubos separados que contenían 950μL de lisado y 100μL de cloroformo. El contenido de los tubos fue mezclado, diluido en serie en caldo EC y sembradas en placas estériles. Se determinó el número de placas después de 24h de incubación a 37°C [4,9].

9. Análisis estadístico

Se llevaron a cabo cálculos porcentuales para determinar la proporción de bacteriófagos de *P. aeruginosa* encontrada por muestra analizada, perfiles infectivos y rango de hospedadores. Se usó como modelo estadístico ANOVA para observar las diferencias entre la sensibilidad de las cepas evaluadas versus el fago encontrado [10]. Se llevó a cabo un análisis multivariado en *InfoStat* para analizar las características de los fagos, además de establecer asociaciones entre aspectos tales como la morfología y el diámetro de las zonas de lisis, mediante la prueba Chi-Cuadrado.

Resultados y discusión

1. Aislamiento, propagación y purificación de los bacteriófagos de *P. aeruginosa*

El 60% de las muestras (30/50) resultaron positivas para el aislamiento de fagos. La media de UFP/mL fue ≥ 30 aprox. en todas las muestras evaluadas. Los resultados indicaron que el método empleado basado en el pre-enriquecimiento de las muestras y varias etapas de filtrado, presentó una buena sensibilidad para el aislamiento de este tipo de virus, arrojando porcentajes de aislamiento similares a los reportados [13-15]. Es importante señalar que la mayor parte de las investigaciones se destinan al aislamiento y estudio de cepas de *P. aeruginosa* en agua potable o dulce, por el importante rol de este patógeno de interés clínico en este tipo de muestras destinadas al consumo humano [16-18]. Sin embargo, Knezevic y col. (2009) aislaron fagos de *P. aeruginosa* en el 80% de las muestras de aguas que evaluaron, usando de igual forma la técnica de vertido en placa. En dicho trabajo, el 70% de los bacteriófagos fueron aislados de agua dulce, mientras que el 80% de las partículas virales fueron obtenidas a partir de muestras de agua residual doméstica, resultados mayores a los obtenidos en este estudio. En Colombia, empleando de igual forma métodos de cultivo *in vitro* inoculando las muestras presuntivas de fagos, se han aislado eficientemente bacteriófagos de *P. aeruginosa* a partir de muestras ambientales diversas [19]. En Japón, se han aislado fagos de la familia Myoviridae y un Siphoviridae en muestras de agua con actividad lítica frente a bacterias del género *Pseudomonas*, y empleados con

finés terapéuticos mediante alimentos impregnados con los mismos [20].

2. Determinación del rango de hospedadores de los bacteriófagos

El 85% de los aislados (26/30) logró infectar todas las cepas de *P. aeruginosa* probadas (Tabla 1). La sensibilidad de *P. aeruginosa* se ha descrito frente a otros fagos de las familias Myoviridae y Podoviridae. Los fagos de estas familias virales capaces de infectar cepas de *P. aeruginosa*, ya se ha reportado anteriormente [21-22]. Por otro lado, el estudio del espectro de infección sobre diversos géneros bacterianos, reveló una baja variabilidad, obteniéndose cinco perfiles de infección para los 30 fagos estudiados (Tabla 1). Solo un 6% (2/30) presentó actividad antagonista frente a la cepa *S. aureus* ATCC®25923, y por lo tanto se excluyeron de los ensayos posteriores. Este tipo de fagos, sin embargo, podría ser utilizado en aplicaciones tales como descontaminación de superficies o en el tratamiento de infecciones superficiales con bacterias relacionadas [22]. El 10% (3/30) de los fagos no fueron capaces de infectar a *P. aeruginosa* MβL+ (Tabla 1), la cual es resistente a antibióticos del grupo de los carbapenemas. Cabe mencionar, que la resistencia de cepas MβL+ a fagos capaces de infectar a *P. aeruginosa* ATCC®27853 y ATCC®10145, puede estar relacionada, posiblemente, con la ausencia de sitios de reconocimiento de los fagos, puesto que el tipo de receptor de superficie varía considerablemente entre bacterias Gram negativas. Cuantas más moléculas pueda reconocer como

receptores, más amplio será el rango de huésped del fago. El reconocimiento o no de los receptores de la cepa huésped por parte del fago determinará la eficiencia de adsorción del fago, una mayor eficiencia de adsorción se observa con un mayor número de bacterias infectadas [23]. Aunque estos virus tengan una elevada afinidad por sus receptores, se ha reportado que la velocidad y la eficiencia de la adsorción son parámetros importantes que varían en función de los factores externos y del estado fisiológico del hospedador. Esto explicaría que un 13% (4/30) de los aislados, no logró exhibir algún tipo de actividad antagonista frente a por lo menos una de las cepas de *P. aeruginosa* probadas, bajo las condiciones establecidas en este estudio [23-24]. La resistencia de las variantes MβL+ también se relaciona con el reciclaje del peptidoglicano, el cual es una estructura de reconocimiento viral. Porque, si bien existen fagos que producen proteínas que van dirigidas a alterar la biosíntesis del peptidoglicano, algunas no poseen actividad muraminidasa, por lo que no tienen al ácido murámico como receptor de superficie [23, 25]. Los sistemas CRISPR (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) podría ser otra posible razón de la resistencia, porque en la actualidad se sabe que luego de una exposición viral inicial, las bacterias pueden ser capaces de integrar en su genoma secuencias derivadas del genoma del fago, lo cual permite a la célula bacteriana reconocer posteriormente al virus y expresar nucleasas para digerir el virus, y evitar la infección [27-29].

Tabla 1. Especificidad y perfil infectivo de los aislados bacteriófagos de *P. aeruginosa* obtenidos de muestras de agua residual doméstica.

Aislado(s)	Cepa(s)											
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MβL+	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 6538P	<i>Staphylococcus aureus</i> Mo3A-07	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC® 12228	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	<i>Enterococcus faecalis</i> Q65	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC® 9341	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	<i>Escherichia coli</i> BLEE
F1	+	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	+	+	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
F5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
F8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9	+	+	-	+ [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
F10	+	+	+	+ [†]	-	-	-	-	-	-	-	-

F11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
F12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F15	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F16	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F19	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F20	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F21	+	+	-	-	-	-	-	ND	-	-	ND	-
F22	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F23	+	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
F24	+	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	ND	-
F25	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-
F26	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F27	+	+	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
F28	+	+	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
F29	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F30	+	+	+	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
n° cepas infectadas	30	30	27	2	0	0	0	0	0	0	0	0

†; lisis total (sombreado en azul), †; lisis turbia; -, sin lisis; ND; no determinado; controles positivos, ATCC®27853, ATCC®10145, MβL+; controles negativos, ATCC®25923, ATCC®6538P, M03A-07, ATCC®12228, ATCC®29212, Q65, ATCC®9341, ATCC®35218 y BLEE

3. Morfología de las placas de lisis y de los bacteriófagos

El 60% (15/25) de los fagos mostraron una morfología de las placas de lisis con un halo de lisis alrededor de la calva. El resto mostró zonas de lisis claras y definidas. Los tamaños de placa obtenidos

para cada fago se muestran en la Tabla 2. La formación de halos es una característica deseable en fagos elegidos como agentes terapéuticos dado que, en diversos patógenos Gram negativos, la cápsula está descrita como un factor de virulencia [32], y se ha reportado que incrementa la adhesión de la bacteria a determinadas superficies [33-34].

Tabla 2. Tamaño y tipo de las placas de los aislados de bacteriófagos de *P. aeruginosa*.

Aislado	Rango hospedero	Tamaño de placa (mm)	Tipo de placa
F1	ATCC®27853 / ATCC®10145 / MβL+	1.0 – 2.0*	Claras con halo
F2	ATCC®27853 / ATCC®10145 / MβL+	1.0 – 3.0*	Claras con halo
F3	ATCC®27853 / ATCC®10145 / MβL+	1.0 – 1.5	Claras con halo
F4	ATCC®27853 / ATCC®10145 / MβL+	0.5 – 1.5*	Claras
F5	ATCC®27853 / ATCC®10145 / MβL+	1.0 – 3.0*	Claras con halo
F6	ATCC®27853 / ATCC®10145 / MβL+	1.0 – 2.0*	Claras con halo
F7	ATCC®27853 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras

F8	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	1.0 – 3.0*	Claras con halo
F9	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / ATCC [®] 25923	0.5 – 1.0	Claras
F10	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+ / ATCC [®] 25923	0.5 – 1.0	Claras
F11	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F12	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F13	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F14	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F15	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F16	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F17	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	1.0 – 2.0*	Claras con halo
F18	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	1.0 – 2.0*	Claras con halo
F19	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	1.0 - 1.5	Claras con halo
F20	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	1.0 - 1.5	Claras con halo
F21	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145	1.0 – 2.0*	Claras con halo
F22	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F23	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F24	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F25	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	1.0 – 2.0*	Claras con halo
F26	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145	1.0 – 1.5	Claras
F27	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F28	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F29	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras
F30	ATCC [®] 27853 / ATCC [®] 10145 / MβL+	0.5 – 1.0	Claras

ATCC, American Type Culture Collection; MβL+, productor de metalobetalactamasas; Sin MgSO₄ P Value>0,05; *Con MgSO₄ P Value<0,05.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tamaños de las placas generadas con y sin la adición de MgSO₄. Sin embargo, con MgSO₄ aproximadamente el 40% (10/25) de los fagos mostraron placas de lisis significativamente más grandes ($p < 0,05$). Esto puede deberse a que el MgSO₄ facilita la adhesión de algunos fagos a la bacteria huésped, y se ha reportado la importancia de este tipo de cofactores [22]. El análisis de correspondencia múltiple de los 30 aislados arrojó tres grupos principales de fagos, en función de la morfología de sus placas (diámetro mínimo y máximo de los halos, y el tipo de calva generada), y según el rango hospedero previamente observado. Dichos grupos se muestran en el dendrograma (Figura 1). El primero de ellos englobaba a 11 aislados que infectaban únicamente a cepas de *P. aeruginosa*, con las placas de lisis de mayor tamaño, siendo estas ≥ 2 mm de diámetro, todos capaces de generar halos de inhibición alrededor de las placas. El segundo grupo formado por 16 fagos, incluyó a aquellos que no infectan a *P. aeruginosa*, con placas de lisis de menor tamaño

(0,5–1,5mm) y sin halos; y el tercero, con tres fagos, que sólo infectan a un pequeño porcentaje de cepas de *P. aeruginosa*. Los fagos que con MgSO₄ (16/25) presentaron placas de lisis consideradas de menor tamaño (64% de los aislados) fueron excluidos del resto de los ensayos. Esto puede ser resultado de períodos de latencia muy largos, tamaños de explosión pequeños y/o baja tasa de adsorción de los fagos a la bacteria hospedadora [35], o podrían ser fagos temperados. Esta última posibilidad concuerda con aislados con zonas de lisis turbias. Luego del análisis de asociación entre estas variables, con una significancia del 5%, se encontró que existió correlación entre el diámetro de las placas de lisis y el tipo de placa observado, como lo reportaron en 2005 por Guttman y col. [23]. Con base a estos criterios, adicional a la inocuidad para la microbiota humana, fueron seleccionados los aislados específicos para *P. aeruginosa* F1,F2,F5,F6 y F8, como se recomienda [22, 36].

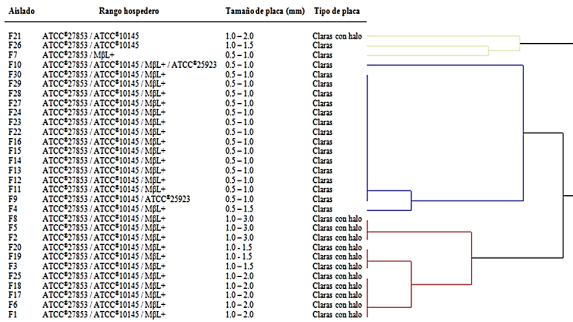


Figura 1. Dendrograma de los grupos de fagos según el análisis de correspondencia múltiple realizado con el programa InfoStat.

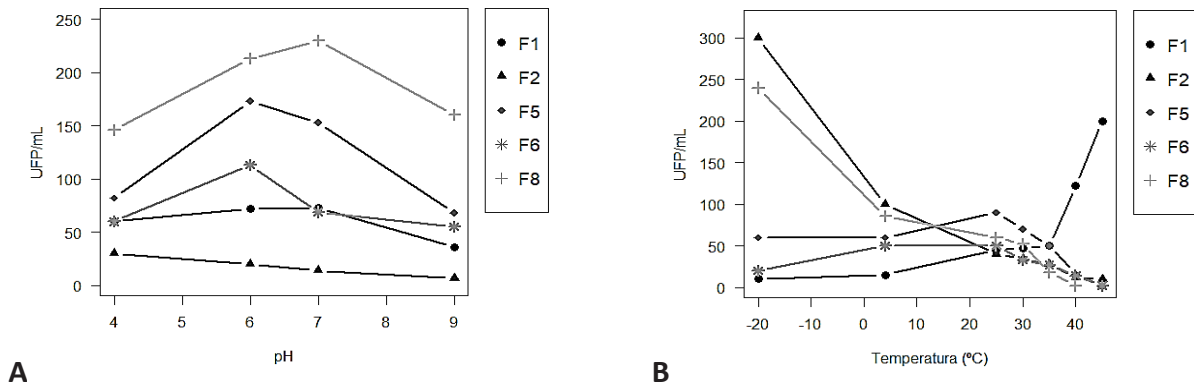
4. Efecto del pH en la estabilidad de los bacteriófagos

El aislado F2 presentó la media más baja de calvas siendo este ≥ 18 UFP/mL, mientras que el aislado F8, mantuvo su conteo por encima de las 180UFP/mL. Entre los intervalos de pH 6 y 7, se observó la mayor actividad en relación al recuento del número de placas de lisis (≥ 100 UFP/mL). A pH 4 y 9 se observó la mayor diferencia en la actividad de los diferentes fagos, con un descenso en la media ≥ 30 UFP/mL (Figura 2A). No se detectaron partículas virales a pH 3 o inferiores, ni por encima de 9. Los fagos aislados de *P. aeruginosa* fueron estables a la acidez (pH 4), y entre ellos, el fago F8 resultó ser significativamente más resistente ($p < 0,05$) que los otros dos. No se apreciaron cambios en la morfología inicial de las placas presentadas por cada uno de los fagos y los diámetros de las calvas se mantuvieron con una media entre 1 y 2mm. Es importante destacar que los aislados F5 y F6,

exhibieron a pH 6 placas de unos 3mm de diámetro, mostrando un claro descenso, tanto a pH ácido como básico, al igual que lo observado con el resto de los aislados. Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado por otros autores que reportan aislados de bacterias Gram negativas estables a pH 6, y diferentes sensibilidades de cada aislado a pH 4. Ningún aislado resistió valores de $pH \leq 3$, al igual que lo descrito en la familia Podoviridae [30], por lo que, para la administración oral, los fagos deben incluirse necesariamente en una matriz resistente al ácido que funcione como vehículo, o disminuir de alguna manera las condiciones extremas de acidez del estómago, como con el uso conjunto de bases débiles [22, 31].

5. Efecto de la temperatura en la estabilidad de los bacteriófagos

La Figura 2B muestra los resultados obtenidos. La media general obtenida fue de ≥ 60 UFP/mL. El mayor conteo de calvas se obtuvo en los intervalos de temperatura de -20 a $25^{\circ}C$, con una media mayor a 80UFP/mL. Se observó una disminución del número de calvas a partir de los $35-40^{\circ}C$ (≥ 30 UFP/mL). El aislado F8 fue el único que se vio mayormente afectado a temperaturas $\geq 45^{\circ}C$. Sin embargo, los otros aislados (80%) presentaron de igual forma una disminución en su actividad a partir de una temperatura $\geq 40^{\circ}C$. Solo el F1 mantuvo su conteo por encima de las 100UFP/mL a temperaturas $\geq 40^{\circ}C$, resultando ser significativamente más resistente ($P < 0,05$) que los otros fagos a las variaciones de temperatura por encima de los $35^{\circ}C$. No se apreciaron cambios con relación a la morfología inicial de las placas presentadas por cada uno de los fagos. Es importante destacar que los aislados F1, F2 y F5, exhibieron a temperaturas $\geq 40^{\circ}C$ placas de unos 3mm de diámetro.



Los resultados obtenidos de tolerancia en los intervalos de -20 a 30°C se corresponden con lo reportado en la literatura, en la cual se describe que, cuando se trabaja con bacteriófagos infectivos para cepas Gram negativas, es muy común mantener los lisados de fago bajo dichas condiciones, especialmente a temperatura ambiente. Si bien se espera que a mayor temperatura los procesos de degradación afecten más a las partículas de fago, el impacto de esta en la velocidad de inactivación de las partículas es un factor que debe conocerse para determinar qué tan estricto debe ser su control durante el almacenamiento a largo plazo [22]. Se ha reportado que a temperaturas superiores a los 30°C los fagos de la familia Podoviridae, se degradan velozmente, lo cual resulta similar a la tolerancia exhibida por los aislados F2, F5, F6 y F8. El mayor conteo de placas se obtuvo cercano a 25°C para 4/5 de los fagos, y la disminución del número de calvas de observó a partir de los 35°C , parámetros de tolerancia encontrados en aislados del orden Caudovirales en miembros de la familia Podoviridae [30]. Los resultados a -20°C concuerdan con lo reportado [22].

6. Curva de crecimiento en un paso

Se observó que todos los fagos seleccionados generaron placas de lisis a partir de los 5min con la técnica de la curva de crecimiento en un paso o *One-step growth*, encontrándose un porcentaje de células infectadas con al menos una partícula viral, según la distribución de *Poisson* de $P(1)=\sim\geq 90\%$ y una MOI media ≥ 20 . Exceptuando el fago F2, el cual inició su ciclo infectivo a los 55min, con un $P(1)=\sim 80\%$, y una $\text{MOI} \geq 2$ (Tabla 3). Los valores de k encontrados fueron del orden de $10^{-9}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$, para fagos que reconocen varios cientos de receptores celulares, hasta valores del orden de $10^{-11}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$, para fagos que reconocen 2 o 3 receptores por célula. Las constantes de adhesión k , calculadas a partir de las curvas de lisis en un ciclo obtenidas, fueron de $1,7 \times 10^{-7}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$ para los fagos F1, F5, F6 y F8, y de $3,4 \times 10^{-9}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$ para el fago F2, lo que indica una mayor velocidad de adhesión de los primeros.

Tabla 3. Parámetros del ciclo lítico de los fagos de *P. aeruginosa*.

Parámetro	F1	F2	F5	F6	F8
Constante de adsorción ($\text{ml UFC}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$1,7 \times 10^{-7}$	$3,4 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$
Tiempo de eclipse (min)	$4,5 \pm 2,9$	$50,0 \pm 2,0$	$4,5 \pm 2,9$	$4,5 \pm 2,9$	$4,5 \pm 2,9$
Tiempo de latencia (min)	$5,0 \pm 2,5$	$55,0 \pm 2,0$	$5,0 \pm 2,5$	$5,0 \pm 2,5$	$5,0 \pm 2,5$
Tamaño de explosión (UFP/UFC)	$500,0 \pm 5,0$	$120,0 \pm 5,0$	$1870,0 \pm 5,0$	$370,0 \pm 5,0$	$1870,0 \pm 5,0$
MOI	≥ 10	≥ 2	≥ 35	≥ 7	≥ 35
$P(1)$	$\sim \geq 90\%$	$\sim 80\%$	$\sim 100\%$	$\sim \geq 90\%$	$\sim 100\%$

MOI, multiplicidad de infección; $P(1)$, distribución de *Poisson*; UFP, unidades formadoras de placas; UFC, unidades formadoras de colonias.

7. Cinética de adhesión de los bacteriófagos

En las curvas de lisis el período de inicio de la fase de eclipse fue de unos 14min, siendo el del fago F2 el mayor (50min). Todos los fagos evaluados presentaron un inicio de fase de latencia de aproximadamente unos 15min, excepto para el fago F2, cuya fase de latencia fue de 55min. El tamaño de explosión calculado se generó a los $45 \pm 3\text{min}$ de iniciada la infección, y fue de $b=330\text{UFP/UFC}$, exceptuando para los aislados F5 y F8, los cuales exhibieron un tamaño de máxima propagación de $b \geq 1870\text{UFP/UFC}$ (Tabla 3). El fago F2 fue el que presentó el menor número de fagos producidos por bacteria infectada ($b=125\text{UFP/UFC}$) y el mayor periodo de tiempo para la explosión ($60 \pm 5\text{min}$). En las cinéticas de adhesión de fagos líticos, la representación del logaritmo de la fracción o del

porcentaje de fagos libres (no adheridos) respecto al tiempo, correspondió a una recta de pendiente negativa, cuya ecuación puede plantearse como $\log P = \log P_0 - kBt/2,3$; donde P_0 es el número inicial de partículas de fago, P el número de fagos libres (no adsorbidos) al tiempo t , B es la concentración de bacteria hospedadora, y k es lo que se denomina *constante de adsorción*. Los valores de k encontrados normalmente fueron del orden de $10^{-9}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$, para fagos que reconocen varios cientos de receptores celulares, hasta valores del orden de $10^{-11}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$ para fagos que reconocen 2 o 3 receptores por célula [22]. Las constantes de adhesión k , calculadas a partir de las curvas de lisis en un ciclo obtenidas, fueron de $1,7 \times 10^{-7}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$ para los fagos F1, F5, F6 y F8, y de $3,4 \times 10^{-9}\text{ml.UFC}^{-1}\text{min}^{-1}$ para el fago F2. Se encontró que a los 5min de comenzada la infección, quedó libre (sin adherir) una menor cantidad de

fagos en 4/5 de los aislados, en contra posición a lo presentado por el fago F2, cuyo valor fue mayor. Esto puede deberse bien sea porque, aunque todos los aislados reconocen receptores de superficie similares de la bacteria hospedadora (por ser fagos específicos para *P. aeruginosa*), los aislados F1, F5, F6 y F8 presentaron una mayor fuerza de interacción. Posiblemente estos fagos reconocen un mayor número de receptores para la misma célula que el bacteriófago F2. Un comportamiento que se ha reportado en la familia Siphoviridae, con ciclos infectivos largos de ~80min [37].

Conclusiones

Las características exhibidas por los diversos fagos encontrados en este estudio, incluyendo la resistencia al tratamiento con solventes lipídicos, los hace posibles miembros agrupables en el orden Caudovirales, y probablemente en las familias Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae. Los aislados virales seleccionados son lítico-específicos y capaces de generar placas de lisis de gran tamaño, con características de estabilidad y perfil infectivo deseables para ser candidatos en el desarrollo de potenciales agentes antagónicos con interés biomédico, basados en enzibióticos para el control de patógenos multirresistentes a los antibióticos como *P. aeruginosa*.

Referencias bibliográficas

- 1- RICE S., VAN DEN AKKER B., FRANCESCO D. J. *Water Health* 10: 181-196. 2012.
- 2- HILL D., ROSE B., PAJKOS A., ROBINSON M., BYE P., BELL S., HARBOUR, C. *J. Clin. Microbiol.* 43(10): 5085-5090. 2005.
- 3- RICE L. *J Infect Dis* 197(8): 1079-1081. 2008.
- 4- EL DIDAMONY G., ASKORA A., SHEHATA A. *Curr. Microbiol.* 70(6): 786-791. 2015.
- 5- CHATTERJEE M., ANJU C. P., BISWAS L., KUMAR V. A., MOHAN C. G., BISWAS R. *Int. J. Med. Microbiol.* 306(1): 48-58. 2016.
- 6- SCHOOLEY R. T., BISWAS B., GILL J. J., HERNANDEZ-MORALES, A. LANCASTER, J. LESSOR, L., SEGALL, A. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(10): e00954-17. 2017.
- 7- ZHANG Y., HU Z. *Biotechnol. Bioeng.* 110(1): 286-295. 2013
- 8- KNEZEVIC P., OBREHT, D. PETROVIC O. *Curr. Microbiol.* 59(2): 173-180. 2009.
- 9- AHIWALE S., PRAKASH D., GAJBHIYE M. JAGDALE, S. PATIL, N., KAPADNIS B. *Curr. Microbiol.* 64(4): 305-311. 2012.
- 10-PIRES D., VILAS BOAS D., SILLANKORVA S., AZEREDO J. *Infections. Virol.* 89:7449 -7456. 2015.
- 11- DEL CASTILLO C., GÓMEZ A., NOÉ M. *Manual de laboratorio. Prácticas de virología.* FMVZ-UNAM. México DF (México). 2003.
- 12-GAVIRIA, A., GONZÁLEZ, M., CASTAÑO, O. *Rev. MVZ Córdoba* 17(1): 2852-2860. 2012.
- 13-BEDOYA L., BUSTAMANTE A., JURADO A., NIÑO C., ZAMBRANO C., VERGEL Z. A., PORTILLA L., NAVIA D., GAVIRIA A., ALBORNOZ G. *Aislamiento y detección de bacteriófagos específicos para Pseudomona sp obtenidos a partir de muestras de tierra.* Universidad Del Quindío. Armenia (Colombia). 2013.
- 14-KNEZEVIC P., OBREHT D., PETROVIC O. *Curr. Microbiol.* 59(2): 173-180. 2009.
- 15-CEYSSENS J., NOBEN P., ACKERMANN W., VERHAEGEN J., DE VOS D., PIRNAY P., MERABISHVILI M., VANECHOUTTE M., CHIBEU A., VOLCKAERT G., LAVIGNE R. *Environ. Microbiol.* 11(5): 1303-1313. 2009.
- 16-COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma N° 2986-93. 1993.
- 17-LEGNANI P., LEONI E., RAPUANO S., TURIN D., VALENTI C. *Int. J. Food Microbiol.* 53(2-3):153-158. 1999.
- 18-PAYARES B., VILLASMILF., MATOS R., LARREAL Á., BARBOZA Y., LEVY A. *Multiciencias* 13(1): 16-22. 2013.
- 19-PRADA, C., HOLGUIN, A., GONZÁLEZ, A., VIVES, M. Univ. Sci. (Pontif. Univ. Javeriana, Fac. Cienc.) 20(1): 43-59. 2015.
- 20-CONCEPCIÓN R., VÁZQUEZ M., LÓPEZ R. *Rev. Aquatic* 18:3-10. 2003.
- 21-Jensen E., Schrader H., Rieland B., Thompson T., Lee K., Nickerson K., Kokjohn T. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 575-580. 1998.
- 22-DINI C. Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (Para obtener el título de Doctor en Ciencias Exactas). Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires (Argentina) 142pp. 2011.

- 23-GUTTMAN, B., RAYA, R., KUTTER, E. *Basic phage biology*. En: KUTTER, E. Y A. SULAKVELIDZE (eds) *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press. New York (USA). 29-66. 2004.
- 24-FORTIER L., MOINEAU S. *Phage production and maintenance of stocks, including expected stocks lifetimes*. En: CLOKIE M., KROPINSKI A. (eds) *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Humana Press. Michigan (USA). 203-219. 2009.
- 25-BERNHARDT G., WANG N., STRUCK K., YOUNG R. *Science* 292(5525): 2326-2329. 2001.
- 26-MANIV I., JIANG W., BIKARD D., MARRAFFINI L. *J. Bacteriol.* 198(6): 941-950. 2016.
- 27-AMITAI G., SOREK R. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(2): 67-76. 2016.
- 28-MAXWELL K. *PLoS Pathog.* 12(1): e1005282. 2016.
- 29- LANDER E. *Cell* 164(1): 18-28. 2016.
- 30-SPRICIGO D. La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos (para obtener el título de Doctor en Ciencias). Facultat de Biociències. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona (España). 181pp. 2011.
- 31-TANJI Y., SHIMADA T., FUKUDOMI H., MIYANAGA K., NAKAI Y., UNNO H. *J. Biosci. Bioeng.* 100(3): 280-287. 2005.
- 32-RUSSO, T. *Capsule and Lipopolysaccharide*. En: DONNENBERG M. S. (ed). *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Academic Press. Boston (USA). 379-403 pp. 2002.
- 33-HASSAN A., FRANK J. *Int. J. Food Microbiol.* 96(1): 103-109. 2004.
- 34-SHARMA M., RYU J., BEUCHAT J. *J. Appl. Microbiol.* 99(3): 449-459. 2005.
- 35-ABEDON T. *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*. Cambridge University Press. New York (USA). 508 pp. 2008.
- 36-SEGUNDO A., HERNÁNDEZ E., LÓPEZ O., TORRES O. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 41(3): 17-26. 2010.
- 37- DE SMET J., ZIMMERMANN M., KOGADEEVA M., CEYSSENS P., VERMAELEN W., BLASDEL B., HO B., JANG U.; LAVIGNE R. *ISMEJ*. 10(8):1823-1835. 2016.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

CIENCIA

Vol.26 N°1, 2

Esta revista fue editada en formato digital y publicada en junio de 2018, por el Fondo Editorial Serbiluz, Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve