



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

Recuperación de bacteriófagos de distintas fuentes de agua y evaluación de su capacidad lítica contra *Mycobacterium smegmatis*

Por:

Chavarría Gil Kevin Alberto
2202036102
Lic. En Química Farmacéutica Biológica

Asesor Externo

Dra. Julieta Luna Herrera
Ced. Prof.: 12974342

Asesor interno

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera
No. Económico: 8140

Proyecto de investigación para liberación de servicio social
19 de enero del 2024 a 19 de julio del 2024

Índice

Introducción	3
Planteamiento del problema y justificación.....	4
Objetivos.....	5
Objetivo General	5
Objetivos específicos:.....	5
Antecedentes	5
Bacterias del género <i>Mycobacterium</i>	5
Bacteriófagos (<i>características</i>)	6
Materiales y métodos	9
Material biológico, muestras de agua y medios de cultivo	9
Cepas de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	9
Muestras de agua	9
Medios de cultivo	10
Metodología.....	10
Recuperación de muestras	10
Filtración primaria	11
Filtración secundaria.....	11
Pre-enriquecimiento.....	11
Prueba de gota	11
Prueba de doble capa.....	12
Recuperación y conservación	12
Resultados.....	13
Recuperación de Bacteriófagos en Muestras de Agua	13
Cuantificación de Bacteriófagos mediante Técnica de Doble Capa	14
Recuperación y Conservación de Bacteriófagos	15
Análisis de resultados	16
Conclusiones	18
Referencias Bibliográficas.....	19
Anexo 1. Calendario de actividades	20

Introducción

En la actualidad, la resistencia bacteriana a los antibióticos representa una amenaza significativa para la salud pública global, generando la necesidad urgente de encontrar alternativas terapéuticas efectivas. En este contexto, los bacteriófagos han emergido como una opción prometedora debido a su capacidad para infectar y destruir bacterias específicas sin afectar a otros microorganismos benéficos.

El planteamiento de este estudio se centra en la recuperación de bacteriófagos a partir de diversas fuentes de agua, reconociendo que estos ambientes acuáticos albergan una diversidad biológica considerable, que incluye bacteriófagos con propiedades variadas. Sin embargo, a pesar de la abundancia de bacteriófagos en el entorno acuático, su potencial terapéutico y su especificidad contra bacterias patógenas específicas, como *Mycobacterium tuberculosis*, aún no se ha explorado completamente.

El problema subyacente es la necesidad imperante de desarrollar estrategias novedosas y específicas para combatir patógenos bacterianos, especialmente aquellos que presentan resistencia a los antibióticos convencionales. *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, representa un desafío particular debido a su capacidad para resistir el tratamiento estándar y persistir en el organismo humano.

La resolución de este problema no solo contribuirá al avance del conocimiento científico en el campo de la terapia con bacteriófagos, sino que también abrirá nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias más específicas y eficaces contra bacterias patógenas resistentes. Además, al abordar la recuperación de bacteriófagos de fuentes de agua diversas, se ampliará la comprensión de la diversidad de estos virus en el entorno, promoviendo su potencial aplicación en la lucha contra enfermedades infecciosas.

Planteamiento del problema y justificación

En la actualidad, la resistencia bacteriana a los antibióticos representa una amenaza significativa para la salud pública global, generando la necesidad urgente de encontrar alternativas terapéuticas efectivas. En este contexto, los bacteriófagos han emergido como una opción prometedora debido a su capacidad para infectar y destruir bacterias específicas sin afectar a otros microorganismos benéficos.

El planteamiento de este estudio se centra en la recuperación de bacteriófagos a partir de diversas fuentes de agua, reconociendo que estos ambientes acuáticos albergan una diversidad biológica considerable, que incluye bacteriófagos con propiedades variadas. Sin embargo, a pesar de la abundancia de bacteriófagos en el entorno acuático, su potencial terapéutico y su especificidad contra bacterias patógenas específicas, como *Mycobacterium tuberculosis*, aún no se ha explorado completamente.

El problema subyacente es la necesidad imperante de desarrollar estrategias novedosas y específicas para combatir patógenos bacterianos, especialmente aquellos que presentan resistencia a los antibióticos convencionales. *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis, representa un desafío particular debido a su capacidad para resistir el tratamiento estándar y persistir en el organismo humano.

La falta de información detallada sobre la diversidad y eficacia de los bacteriófagos presentes en distintas fuentes de agua limita nuestro entendimiento y aplicación de estas entidades virales en terapias antimicrobianas. Esta brecha de conocimiento subraya la importancia de investigar la recuperación de bacteriófagos de diferentes ambientes acuáticos y evaluar su capacidad lítica contra *Mycobacterium smegmatis*, un modelo representativo de las especies relacionadas con *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos

Objetivo General

Recuperar bacteriófagos de distintas fuentes de agua y evaluar la capacidad lítica de contra *Mycobacterium smegmatis*

Objetivos específicos:

- Obtener muestras de agua de diversas fuentes para la obtención de bacteriófagos
- Realizar pruebas de la capacidad lítica de los bacteriófagos obtenidos contra *Mycobacterium smegmatis*
- Amplificación de título de bacteriófagos

Antecedentes

Bacterias del género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* está compuesto por diversos bacilos aerobios estrictos, caracterizados por una pared celular compleja que incluye peptidoglicano y ácidos micólicos, lo que les confiere resistencia al ácido y al alcohol, conocidas como BAAR (Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes). Estas bacterias tienen un crecimiento lento, lo que contribuye a la dificultad en su manejo clínico.

La pared celular de las bacterias del género *Mycobacterium* se compone de tres capas: la primera es una capa de peptidoglicano, cuya estructura es similar a la de otras bacterias; la segunda es una capa más ancha compuesta por polisacáridos como el arabinogalactano y ácidos micólicos; y la tercera es una capa externa de grosor variable, cuya composición exacta aún no se ha determinado completamente, aunque se le atribuye una estructura de glucolípidos (Hayashi & Morita, 2019).

Importancia clínica de la bacteria *Mycobacterium smegmatis*

M. smegmatis fue la segunda especie de micobacteria reconocida después de *Mycobacterium tuberculosis*. Se ha aislado del suelo y del agua, considerándose un microorganismo ambiental, por lo que ha sido clasificada como una micobacteria de bajo potencial patógeno, pero de gran importancia en investigación.

M. smegmatis está clasificada en el grupo IV de la clasificación de Runyon, como una micobacteria de rápido crecimiento, aunque algunos autores, como Casal, la incluyen en el Grupo V de micobacterias escotocromógenas de crecimiento rápido (Phillips & Von Reyn, 2001). Debido a su rápido crecimiento y bajo patogenicidad, *M. smegmatis* se utiliza ampliamente como modelo en estudios de biología molecular y de resistencia a antibióticos, especialmente para entender mecanismos aplicables a otras micobacterias más patógenas como *M. tuberculosis*.

Epidemiología y cuadro clínico de infecciones causadas por *Mycobacterium smegmatis*

Las infecciones por *M. smegmatis* son infrecuentes y generalmente ocurren en pacientes con enfermedades subyacentes como la enfermedad broncopulmonar obstructiva. Se ha asociado también con infecciones de la piel y tejidos blandos tras traumatismos, cirugías (especialmente cirugía cardíaca), y procedimientos invasivos como inyecciones de esteroides. Además, se han reportado casos esporádicos de bacteriemia relacionada con catéteres, endocarditis, linfadenitis e infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos. Las cepas aisladas de heridas suelen ser clínicamente significativas, mientras que en las secreciones respiratorias su relevancia es más dudosa y generalmente requieren aislamiento repetido en pacientes con enfermedad respiratoria crónica para ser consideradas como patógenas (Phillips & Von Reyn, 2001).

Bacteriófagos (características)

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan bacterias mediante el reconocimiento de sitios específicos en la superficie de la pared celular bacteriana (Agún, 2017). Son altamente específicos, ya que no solo infectan una especie particular de bacteria, sino que su actividad infectiva se limita a un número reducido de cepas dentro de esa especie (Cárdenas et al., 2018). Estos virus están

ampliamente distribuidos en el ambiente, sin importar las condiciones ambientales, siempre que su hospedero bacteriano esté presente (Rios, 2019).

Los bacteriófagos están constituidos principalmente por proteínas y material genético (DNA o RNA). El material genético se encuentra dentro de una estructura proteica llamada cápside. La cápside está conectada a una cola, la cual está conformada por proteínas y se une a la cápside mediante un cuello. En la cola se localizan los receptores de unión al sitio diana en la pared bacteriana, así como estructuras que permiten fijarse a la misma (Agún, 2017).

Clasificación de los bacteriófagos

La mayoría de los bacteriófagos descritos hasta la fecha pertenecen al orden Caudovirales, que se subdivide en tres familias: Myoviridae, que se caracteriza por poseer colas contráctiles y rígidas; Podoviridae, con colas cortas no contráctiles; y Siphoviridae, que tienen colas largas y flexibles. Todas estas familias comparten una cabeza icosaédrica que contiene DNA de doble cadena en su interior (Buttimer et al., 2017).

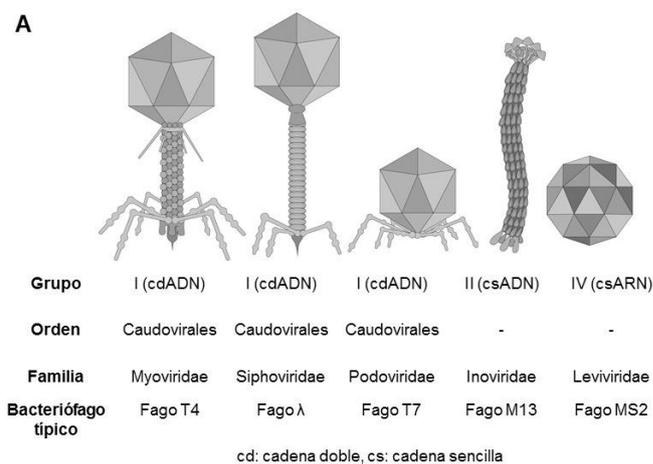


Figura 1. Familias de bacteriófagos. (Rojas E., 2021)

Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos

Los bacteriófagos no pueden replicarse por sí mismos, por lo que requieren de una célula bacteriana hospedera que les proporcione la maquinaria y los componentes

necesarios para la replicación. Existen dos ciclos principales de replicación de los bacteriófagos: el ciclo lítico y el ciclo lisogénico (Kakasis & Panitsa, 2019).

Durante el ciclo lítico, el bacteriófago se adhiere a la superficie bacteriana a través de la adsorción, inyecta su genoma en el interior de la bacteria (penetración), y utiliza la maquinaria de la célula para replicarse (fase de eclipse). En este punto, el bacteriófago decide si seguir el ciclo lítico o lisogénico, dependiendo de las condiciones ambientales. En el ciclo lítico, el proceso es rápido y concluye con la lisis de la célula bacteriana, liberando nuevas partículas virales (Kakasis & Panitsa, 2019). En el ciclo lisogénico, el genoma del fago se integra en el ADN bacteriano, permaneciendo latente hasta que se activan las condiciones para entrar en el ciclo lítico.

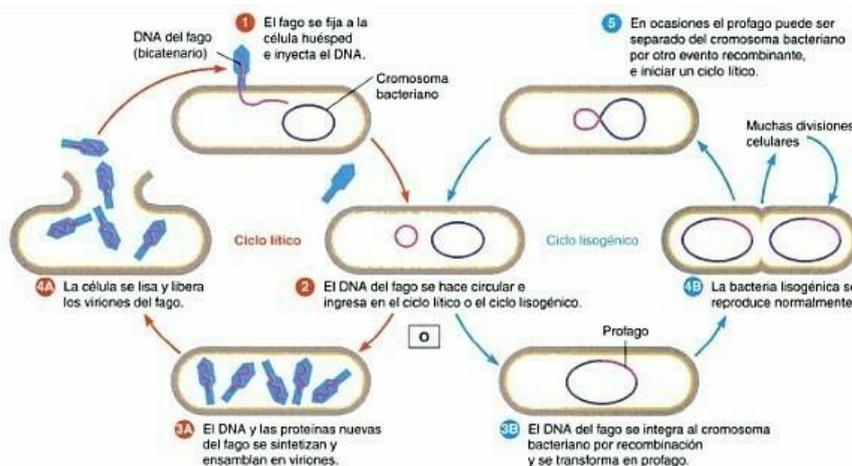


FIGURA 2. Ciclo lisogénico del bacteriófago λ .

Figura 2. Comparación de ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos (Orihuel, 2016)

Fuentes de aislamiento de bacteriófagos

Los bacteriófagos se encuentran en diversas fuentes ambientales, ya que su distribución está estrechamente vinculada a la de sus hospederos bacterianos. Las fuentes de aislamiento incluyen agua de mar, ríos, lagos, aguas residuales, muestras de tejidos de animales infectados o colonizados, organismos filtradores como camarones, almejas y rotíferos, superficies inanimadas contaminadas y productos lácteos, entre otros (Saucedo et al., 2020; Tan et al., 2021; Rocha et al., 2022).

Materiales y métodos

Material biológico, muestras de agua y medios de cultivo

Cepas de *Mycobacterium smegmatis*

Las cepas de *Mycobacterium smegmatis* utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de un aislado clínico proporcionado por el laboratorio de Inmunoquímica II de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional. Estas cepas se almacenaron y mantuvieron en condiciones óptimas de refrigeración a 4°C, en medio 7H11, con sello de Parafilm para evitar la desecación; antes de ser utilizadas en los experimentos de recuperación y cuantificación de bacteriófagos.

Muestras de agua

Las muestras de agua fueron recolectadas de diversas fuentes, incluyendo agua de mar, ríos, lagos, y aguas residuales. Las muestras se recolectaron en tubos estériles de 100 mL con tapa de rosca y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento para asegurar la capacidad lítica de los bacteriófagos presentes.

Tabla 1. Muestras recuperadas de agua y lugar de recuperación

No de muestras	Lugar de recuperación	Tipo de agua
1	Agua purificada, Tepeji del rio de Ocampo, Hidalgo	Tratada
2	Hospital La Raza, Gustavo A. madero, Ciudad de México	Tratada
3	Rio San Jerónimo, Tepeji del rio de Ocampo, Hidalgo	Pluvial, caudal limpio
4	Rio Santa Teresa, Tepeji del rio de Ocampo, Hidalgo	Pluvia, caudal limpio
5	UAM unidad Xochimilco, Coyoacán, Ciudad de México	Tratada
6	Rio Santa Teresa (Sedimento), Tepeji del rio de Ocampo, Hidalgo	Pluvial, caudal limpio
7	Atizapán de Zaragoza, Estado de México	Contaminada, caudal contaminado

8	Atizapán de Zaragoza, Estado de México	Contaminada, caudal contaminado
9	Agua estancada, Atizapán de Zaragoza, Estado de México	Contaminada, caudal contaminado
10	Agua purificada "Aguam" Coyoacán, Ciudad de México	Tratada

Medios de cultivo

El medio Middlebrook 7H9 es un medio líquido enriquecido diseñado para el crecimiento de micobacterias en cultivos líquidos. Contiene sales inorgánicas, glicerol como fuente de carbono, y a menudo se suplementa con OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) para favorecer el crecimiento y neutralizar toxinas (American Type Culture Collection [ATCC], n.d.). El pH se ajusta a un rango de 6.6 a 7.0. Para evitar la formación de agregados bacterianos, especialmente con especies como *Mycobacterium smegmatis*, se suele añadir Tween 80 (CDC, 2013). Es muy utilizado en estudios de susceptibilidad a antibióticos, crecimiento bacteriano y ensayos genéticos (Versalovic et al., 2011).

El Middlebrook 7H11 es un medio sólido basado en agar, derivado del medio 7H10, pero enriquecido con caseína hidrolizada para mejorar el crecimiento de micobacterias. Se utiliza comúnmente para cultivar micobacterias en placas, ofreciendo una superficie sólida que permite el aislamiento de colonias individuales (Whitman, 2012). El medio suele suplementarse con glicerol y OADC para optimizar el crecimiento bacteriano. Al ser un medio selectivo, es ideal para el cultivo de especies micobacterianas más exigentes y también para la identificación de colonias en estudios de diagnóstico y microbiología clínica (CDC, 2013).

Metodología

Recuperación de muestras

Se recolectaron muestras de diferentes fuentes de agua utilizando frascos estériles de 100 mL con tapa de rosca. Las muestras se clasificaron según su origen en agua natural no contaminada, agua tratada y agua contaminada. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C para preservar la integridad de los posibles bacteriófagos presentes antes de su procesamiento.

Filtración primaria

Las muestras de agua se homogenizaron y se transfirieron a alícuotas de 50 mL en dos tubos estériles con tapa de rosca, los cuales fueron etiquetados con la ubicación de recolección y la fecha. Para facilitar la liberación de bacteriófagos de sus células hospedadoras y de organismos filtradores como rotíferos, **baño de ultrasonido** (Sonicador, 5.6 L, 1,5 gal, Serie CPX, sin calentador, Mod. 3800, 230 V) durante 30 segundos a una frecuencia de 40 kHz . La filtración primaria se llevó a cabo utilizando un tapón de algodón y una membrana filtrante, eliminando partículas de mayor tamaño. Las alícuotas obtenidas se recolectaron en tubos estériles y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento posterior.

Filtración secundaria

Las muestras filtradas en la etapa anterior se sometieron a una filtración secundaria utilizando una membrana de poro de 0.22 µm. Esta filtración fina permitió la eliminación de microorganismos y partículas no deseadas, asegurando que solo los bacteriófagos permanecieran en el filtrado. Las alícuotas obtenidas se recolectaron en tubos estériles, se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

Pre-enriquecimiento

Para favorecer la amplificación de bacteriófagos, se tomó un volumen de 20 mL de cada muestra filtrada y se le añadieron 8 mL de caldo 7H11 y 100 µL de una suspensión de *Mycobacterium smegmatis* previamente enriquecida. Esta mezcla se incubó en una incubadora con agitación a 37°C durante 24 horas para aumentar la superficie de contacto y la posibilidad de infección de los bacteriófagos. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento.

Prueba de gota

Las cepas de *M. smegmatis* se ajustaron al 0.5 en la escala del nefelómetro de McFarland y se sembraron en placas con medio 7H9 con sales mediante estría masiva utilizando un hisopo estéril. Se colocaron 6 µL de cada dilución correspondiente sobre la placa, asegurando que la gota no se expandiera a otros

cuadrantes. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas. Las diluciones restantes se conservaron en refrigeración para análisis posteriores.

Prueba de doble capa

En la prueba de doble capa, se utilizó un medio semisólido compuesto por un 70% de medio sólido 7H9 y un 30% de caldo 7H11, preparado en tubos de 15 mL. El medio fue calentado hasta alcanzar un estado líquido y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, evitando que se solidificara. En este punto, se añadieron 20 µL de la disolución del bacteriófago y 100 µL de la cepa de *Mycobacterium smegmatis*, ajustada a 3 en la escala del nefelómetro de McFarland. Posteriormente, la mezcla fue agitada y vertida en una caja de Petri que contenía 10 mL de agar 7H9.

Recuperación y conservación

Las placas líticas de interés obtenidas en la doble capa se seleccionaron y recuperaron utilizando una punta estéril recortada. La punta se insertó en la placa lítica y se colocó en un tubo que contenía 3 mL de caldo 7H11 junto con 100 µL de una suspensión de *M. smegmatis* ajustada al 2 en la escala del nefelómetro de McFarland. Los tubos se incubaron a 37°C durante 6 horas en agitación a 150 rpm, junto con un control negativo que contenía solo la suspensión bacteriana sin bacteriófagos, para observar la lisis bacteriana en tubo. Después del periodo de incubación, se compararon los tubos con el control y se seleccionaron aquellos que mostraron una disminución total de la turbidez, indicando lisis bacteriana.

Una vez purificados los bacteriófagos, se seleccionó un morfotipo al azar para realizar ensayos de conservación. El morfotipo seleccionado se cuantificó mediante la técnica de doble capa y se conservó simultáneamente en diferentes condiciones: refrigeración a 4°C, congelación a -20°C y temperatura ambiente (24°C), en agua destilada estéril, y caldo 7H11 con sales. Los ensayos de conservación se realizaron en intervalos de quince días, uno, tres y cinco meses, cuantificando cada vial después de cada periodo utilizando la técnica de doble capa para evaluar la capacidad lítica de los bacteriófagos.

Resultados

Recuperación de Bacteriófagos en Muestras de Agua

Se recolectaron un total de 10 muestras de agua provenientes de diversas fuentes. Después de realizar la prueba de gota para detectar la presencia de bacteriófagos capaces de infectar *Mycobacterium smegmatis*, se encontraron resultados positivos en 2 de las 10 muestras. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la prueba de gota en muestras de agua

No de muestras	Resultados
1	Positivo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Positivo

Los resultados de la prueba de gota se muestran en las figuras 1 y 2. Se observó un crecimiento masivo de *Mycobacterium smegmatis* en las secciones donde se colocaron las muestras 2 a 9, así como en el control. En contraste, se detectó inhibición del crecimiento en las muestras 1 y 2 debido a la presencia del bacteriófago.

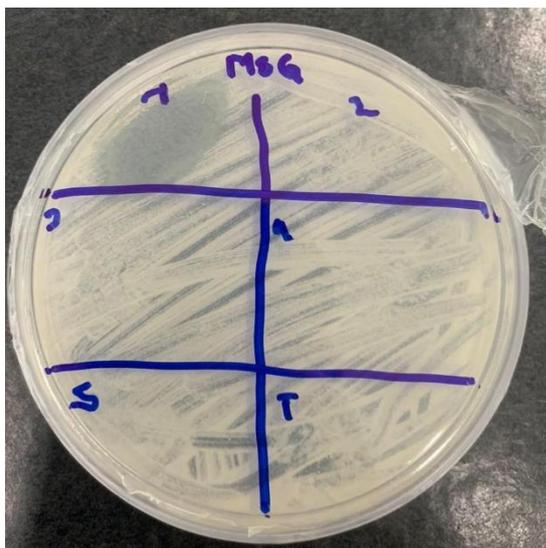


Figura 3. Prueba de gota positiva de (muestra de agua 1)



Figura 4. Prueba de gota positiva (muestra de agua 10)

Cuantificación de Bacteriófagos mediante Técnica de Doble Capa

Las muestras que resultaron positivas en la prueba de gota fueron sometidas a cuantificación mediante la técnica de doble capa. Se utilizó una dilución que consistió en 5 mL de medio, 30 μL de *Mycobacterium smegmatis*, y 1 μL de la suspensión de fagos. Los resultados obtenidos mostraron la formación de placas líticas, las cuales se cuantificaron para determinar la carga de bacteriófagos presentes en las muestras positivas. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cuantificación de bacteriófagos en muestras positivas mediante la técnica de doble capa

Muestra Positiva	Número de Placas Líticas	UFP/mL (Unidades formadoras de placas/ MI)
1	0	0
10	5	5×10^3

Las placas líticas se observan como pequeñas áreas puntiformes de inhibición en el agar, visibles como puntos claros. Para mejorar su visualización, se puede utilizar un fondo negro. Dependiendo del tamaño de las placas, algunas pueden apreciarse a simple vista; sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario utilizar un estereoscopio para una mejor observación.

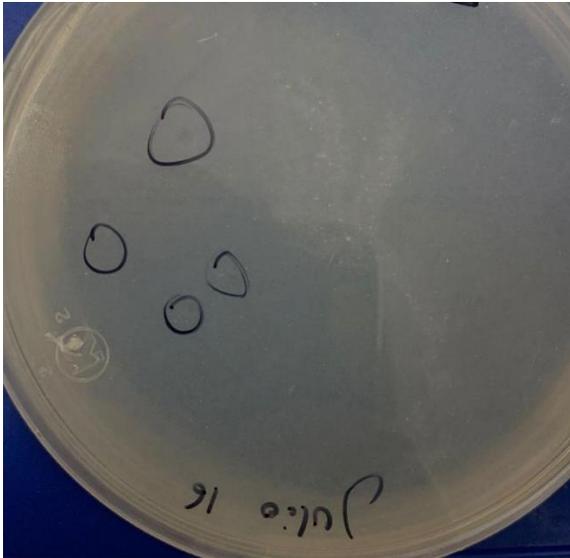


Figura 5. Placas líticas obtenidas de la muestra 10 de agua



Figura 6. Ampliación de placa lítica (muestra 10 de agua)

Recuperación y Conservación de Bacteriófagos

Las placas líticas obtenidas fueron seleccionadas para recuperación mediante picadura. Posteriormente, los fagos fueron resuspendidos en 1 mL de buffer y se amplificaron en 8 mL de medio de cultivo. Estos fagos se sometieron a una nueva prueba de doble capa para confirmar su actividad lítica, donde se observaron nuevamente placas líticas en ambas muestras positivas.

Finalmente, se evaluó la viabilidad de los fagos bajo diferentes condiciones de almacenamiento (refrigeración, congelación, y temperatura ambiente). Se observó una disminución significativa en el título de fagos cuando se almacenaron a temperaturas de congelación, lo que sugiere que la refrigeración es la mejor opción para mantener la viabilidad de los fagos.

Tabla 3. Evaluación de la capacidad lítica de bacteriófagos bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Condición de Almacenamiento	T0 (Inicial)	T1 (15 días)	T2 (1 mes)
Refrigeración (4°C)	5 × 10 ³ UFP/mL	4.8 × 10 ³ UFP/mL	4.5 × 10 ³ UFP/mL
Congelación (-20°C)	5 × 10 ³ UFP/mL	2.5 × 10 ³ UFP/mL	0 UFP/mL
Temperatura Ambiente (24°C)	5 × 10 ³ UFP/mL	3 × 10 ³ UFP/mL	2 × 10 ³ UFP/mL
UFP: Unidades Formadoras de Placas			

Análisis de resultados

En este estudio, la recuperación y evaluación de bacteriófagos contra *Mycobacterium smegmatis* se realizaron a partir de diez muestras de agua, de las cuales solo dos resultaron positivas para la presencia de bacteriófagos, según la prueba de gota. Este resultado subraya la naturaleza específica y a veces escasa de los bacteriófagos en ambientes acuáticos, dependiendo de las condiciones ambientales y de la presencia de hospedadores bacterianos adecuados.

De las 10 muestras de agua analizadas, las pruebas de gota detectaron la presencia de bacteriófagos en las muestras 1 y 10. Sin embargo, solo la muestra 10 mostró actividad lítica significativa en la técnica de doble capa, evidenciada por la formación de placas líticas. La muestra 1, aunque positiva en la prueba de gota, no presentó placas líticas, lo que sugiere que los fagos presentes en esta muestra pueden haber tenido una actividad lítica reducida o una concentración insuficiente para causar lisis visible.

La prueba de gota es útil para una detección inicial de fagos, pero no siempre refleja su capacidad lítica completa. La técnica de doble capa, al permitir la observación directa de placas líticas en un medio sólido, proporciona una evaluación más precisa

de la capacidad de los fagos para lisar células bacterianas. La falta de placas líticas en la muestra 1 podría deberse a varios factores, incluyendo una baja concentración de fagos líticos o una interacción ineficaz con el hospedador utilizado en el ensayo.

La cuantificación de bacteriófagos mediante la técnica de doble capa se realizó utilizando una dilución compuesta por 5 mL de medio, 30 μ L de *M. smegmatis* y 1 μ L de la suspensión de fagos. De estas diluciones, se observó la formación de cinco placas líticas, indicando la actividad lítica de los fagos presentes en las muestras positivas. Este resultado es indicativo de la eficacia de los fagos en lisar cepas de *M. smegmatis*, lo que refuerza su potencial uso en aplicaciones terapéuticas o de biocontrol.

Para la recuperación y conservación de los fagos, se utilizó un procedimiento que incluyó la recolección de las placas líticas mediante picadura, seguida de la recuperación en 1 mL de buffer y la ampliación en 8 mL de medio de cultivo. Esta estrategia permitió maximizar la cantidad de fagos recuperados para análisis posteriores. Sin embargo, durante el proceso de crioconservación, se observó una disminución en el título de fagos cuando se sometieron a congelación. Este hallazgo sugiere que la congelación puede dañar la integridad de los fagos, lo que resulta en una menor capacidad infectiva.

Los resultados de conservación muestran que, para mantener la viabilidad de los bacteriófagos, es preferible almacenarlos en condiciones de refrigeración (a 4°C) sin llegar a la congelación. Este comportamiento es consistente con estudios previos que señalan la sensibilidad de los fagos a las bajas temperaturas extremas y la consiguiente pérdida de viabilidad.

En resumen, la baja tasa de recuperación de bacteriófagos en las muestras de agua, junto con los resultados de conservación, destacan la importancia de optimizar las condiciones de almacenamiento y manejo de estos agentes biológicos para su uso potencial en futuras aplicaciones.

Conclusiones

El estudio realizado ha logrado demostrar la eficacia de las técnicas empleadas para la recuperación y evaluación de bacteriófagos en muestras de agua. La combinación de la prueba de gota y la técnica de doble capa permitió identificar la presencia de bacteriófagos en las muestras analizadas, con la muestra 10 mostrando una capacidad lítica significativa. La muestra 1, aunque positiva en la prueba de gota, no presentó actividad lítica en la técnica de doble capa, lo que resalta la importancia de utilizar métodos complementarios para una evaluación exhaustiva de la actividad de los fagos.

La técnica de doble capa reveló que la muestra 10 contenía fagos con alta capacidad lítica, evidenciada por la formación de placas en el medio sólido. Este hallazgo es relevante, ya que indica que los fagos presentes tienen un potencial considerable para lisar *Mycobacterium smegmatis*, lo cual es prometedor para posibles aplicaciones en biotecnología y terapia bacteriana.

En cuanto a la conservación de los fagos, los resultados mostraron que la refrigeración a 4°C es la mejor opción para mantener la viabilidad de los fagos a lo largo del tiempo. La congelación a -20°C, por otro lado, resultó en una disminución significativa del título de fagos, lo que sugiere que esta técnica no es ideal para la preservación a largo plazo. Estos hallazgos son cruciales para la adecuada conservación de fagos en estudios futuros y aplicaciones prácticas.

En general, la metodología utilizada en este estudio ha demostrado ser efectiva para la detección y cuantificación de bacteriófagos. La combinación de pruebas permitió una comprensión más completa de la presencia y capacidad lítica de los fagos, subrayando la necesidad de enfoques metodológicos adecuados en la investigación de estos agentes biológicos. Los resultados obtenidos ofrecen una base sólida para futuras investigaciones, con implicaciones potenciales en terapia contra bacterias patógenas y análisis ambiental.

Referencias Bibliográficas

- Agún García, S. (2017). *Evaluación de bacteriófagos como desinfectantes* (Trabajo Fin de Máster, Universidad Complutense de Madrid). Tutor: E. Gómez-Lucía Duato.
- American Type Culture Collection (ATCC). (n.d.). Middlebrook 7H9 Broth Medium (ATCC® Medium: 271). Retrieved from <https://www.atcc.org/>
- Buttimer C, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Front Microbiol.* 2017 Jan 20;8:34. doi: 10.3389/fmicb.2017.00034. PMID: 28163700; PMCID: PMC5247434.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). Bacteriological examination of sputum specimens. In *Manual for the laboratory diagnosis of tuberculosis* (pp. 28-35). World Health Organization. <https://www.who.int/tb/publications/tb-diagnosis-laboratory-manual/en/>
- Cárdenas, J., Castillo, O., Cámara, C. y González, V. (2018). Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Bol Venez Infectol*, 29 (1), 11 - 19. Recuperado el 13 de diciembre del 2023 de <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/06/904945/02-cardenas-j-11-19.pdf>
- Hayashi, J. M., & Morita, Y. (2019). Mycobacterial membrane domain, or a primordial organelle? *PubMed*, 92(3), 549-556. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31543716>
- Kakasis, A. y Panitsa, P. (2019). Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53 (1), 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>
- Orihuel, E. (2016, Abril 13). *Bacteriófagos: pequeños grandes aliados en la lucha contra los patógenos alimentarios*. Christeyns. <https://www.christeyns.com/es-es/bacteriofagos-pequenos-grandes-aliados-en-la-lucha-contra-los-patogenos-alimentarios-2/>
- Phillips, M., & Von Reyn, C. F. (2001). Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1363-1374. <https://doi.org/10.1086/323126>
- Ríos, M. (2019). Caracterización genómica, morfológica y replicativa del bacteriófago XaF18 DE *Xanthomonas vesicatoria*. [Tesis de maestría no publicada]. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A. C.
- Rocha, M., Silva, B., Bonecker, C., Anjos, M. Y Melo, P, (2022). 65. colers al Bahia Stale, Brazil: News records and limitations to studies, *genetian Journal Of Blology*. 82, hilips://dol.org/10.1590/1519-6984.236345,
- Rojas, E. (2021, septiembre 15). *El enemigo de mi enemigo es... Un virus que ataca a las bacterias: los bacteriófagos*. RDU UNAM. https://www.revista.unam.mx/2021v22n4/el_enemigo_de_mi_enemigo_es_un_virus_que_ataca_a_las_bacterias_los_bacteriofagos/
- Saucedo, J., Honorio, C., Vallenás, Y, y Acuña, A. (2020). Bacteriófagos: aliados para combatir enfermedades bacterianas en acuicultura. Un primer punto de partida e la acuicultura ecológica, *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7, 107-121, Recuperado el 18 de abril

de 2021 de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext18pid=S2311-25812020000200008&lng=es&ting=es,

- Tan, C., Rukayadi, Y., Hasan, H., Abdul-Mutalib, N. A, Jambari, N. 1409. H, Thung, T., Lee, E. y Radu, S. (2021), Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Lule Bacteriophages From Seawater Samples. *Frontiers microbiology*, 12.
- Versalovic, J., Carroll, K. C., Funke, G., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Warnock, D. W. (2011). *Manual of clinical microbiology* (10th ed.). ASM Press.
- Whitman, W. B. (Ed.). (2012). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5* (2nd ed.). Springer.

Anexo 1. Calendario de actividades

Objetivo	Actividades	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6
Obtener muestras de agua de diversas fuentes.	Obtención de muestras de agua	X					
Filtrar Aguas obtenidas	Realizar la filtración primaria y secundaria	x	x				
Proliferar <i>Mycobacterium Smegmatis</i>	Proliferar y dar mantenimiento al medio de cultivo	X	X	X	X	X	X
Ampliar la muestra de bacteriófagos	Realizar el enriquecimiento de la muestra utilizando la bacteria		x	x			
Identificar bacteriófagos	Realizar prueba de gota para visualizar las placas lisogénicas en un medio sólido			x	x		
Cuantificar y aislar bacteriófagos	Se realiza un extendido en placa para cuantificar la forma de placas y las UFP				x	x	
Recuperar y conservar bacteriófagos	Se recuperan los fagos a partir de las placas y se evalúa su conservación					x	x