



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

René Ricardo Sánchez Rico

Ingeniero en Alimentos

TITULO DE LA TESIS

Lisis de *Arthrobacter sp.* por un nuevo bacteriófago para el control biológico de biomasa derivada de la degradación de ácido tereftálico

Dirigida por

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Dr. Claudio GaribayOrijel

México, D.F. 23 de Enero de 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 23 del mes de enero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:

Lisis de *Arthrobacter sp.* por un nuevo bacteriófago para el control biológico de biomasa derivada de la degradación de ácido tereftálico

Presentada por el alumno:

Sánchez Rico René Ricardo
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)
Con registro:

A	1	0	0	0	6	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Claudio Garibay Orijel

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Victor Hugo Pérez España



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

Dra. María Guadalupe Ramírez Sotelo **SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México DF el día 23 del mes enero del año 2012, el (la) que suscribe René Ricardo Sánchez Rico alumno (a) del Programa de Maestría en ciencias en Bioprocesos con número de registro A100064, adscrito a Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Claudio Garibay Orijel y Dr. Jesús Agustín Badillo Corona y cede los derechos del trabajo intitulado **Lisis de *Arthrobacter sp.* por un nuevo bacteriófago para el control biológico de biomasa derivada de la degradación de ácido tereftálico**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección agaribayo@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



René Ricardo Sánchez Rico

Declaración de originalidad

"Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

Rene Ricardo Sánchez Rico

Vo. Bo. del director o directores de tesis.

Dr. Claudio Garibay Orijel

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

"Yo Rene Ricardo Sánchez Rico declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita."

Créditos

El trabajo de esta tesis se realizó en los laboratorios de Bioingeniería y Biología Molecular del área de Posgrado de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Jesús Agustín Badillo Corona y el Dr. Claudio Garibay Orijel.

Para el desarrollo de esta tesis de Maestría se obtuvo el apoyo del Conacyt a través de la beca con número de registro 345696.

Las Microscopías fueron tomadas en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) en el área de Microscopía con el apoyo de la Maestra María Esther Sánchez Espindola.

El vínculo con la ENCB se dio gracias a la Dra. Mayahuel Ortega Áviles del Centro de Nanociencias, Micro y Nanotecnologías del IPN.

El vínculo con el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) se dio gracias a la Dra. Mayahuel Ortega Avilés y al Dr. Luis Lartundo del Centro de Nanociencias, Micro y Nanotecnologías del IPN para la observación y toma de nuevas micrografías electrónicas.

Resumen

Una consecuencia a considerar cuando se realiza el tratamiento biológico de aguas residuales que contienen compuestos aromáticos como el ácido tereftálico es la generación de una enorme cantidad de biomasa o lodos residuales. La problemática asociada a los lodos aparece cuando éstos dejan de ser un producto para convertirse en un residuo. Los procesos de tratamiento diseñados para lograr una reducción de bacterias pueden incurrir en capital substancial y altos costos de operación. El desarrollo del tratamiento de lodos con bacteriófagos puede proporcionar un control efectivo del costo a largo plazo de bacterias potencialmente patógenas. Las bacteriófagos son virus que infectan y lisan bacterias. Aquí la potencial aplicación de las técnicas con fagos es en los sistemas de tratamiento de aguas residuales para mejorar las emisiones de efluentes y lodos al ambiente. El propósito principal de este proyecto fue el aislar y el caracterizar bacteriófagos capaces de lisar a las bacterias degradadoras de ácido tereftálico, *Arthrobacter sp.* y *Brevundimonas sp.*, de diversas fuentes de suelo y cuerpos de agua para el control biológico de éstas. Un bacteriófago capaz de lisar a *Arthrobacter* fue aislado de una muestra de suelo. Este fago fue caracterizado morfológicamente usando Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y molecularmente utilizando técnicas de biología molecular. Algunos fragmentos del genoma del fago, generados por digestión con enzimas de restricción, fueron clonados en el vector pBlueScript II KS y posteriormente secuenciados y analizados. Las Imágenes de TEM mostraron fagos con cápsides isométricas y cola larga no contráctil, similares a las que presentan plataforma basal descritas para la familia *siphoviridae* del orden de los *caudovirales*. Dos de los fragmentos del genoma secuenciados y analizados muestran similitud con los genes de una proteína encargada de mediar la longitud de la cola de dos bacteriofagos que infectan a bacterias de los generos *Gordonia* y *Rhodococcus*. La similitud de estos fragmentos fue de 36-41%, la cual es baja y podría sugerir que el fago aislado está relacionado con los fagos que infectan a los generos mencionados pero no muestran una alta similitud con genomas de bacteriofagos previamente reportados por lo que el fago aislado en el presente trabajo y aquí reportado podría tratarse de un nuevo bacteriofago de *Arthrobacter sp.*

Abstract

One of the aspect to consider when bio treating residual waters containing aromatic compounds such as tereftalic acid is the high biomass generated in the treatment. There is a problem when the sludge generated is no longer a product but a residue. Treatment of this sludge, to reduce bacterial number mainly, is costly. Treatment of residual sludge with bacteriophages could represent an effective and inexpensive process to reduce the number of potentially pathogenic bacteria. Bacteriophages are viruses that infect and lyse bacteria specifically and could then be used to lyse bacteria that are present at high number in residual sludge. The main objective of the present thesis was to isolate and characterize bacteriophages from diverse sources of soil and water capable of lysing tereftalic acid-degrading bacteria *Arthrobactersp* and *Brevundimonas sp.* Such bacteriophages could then be used to biologically control their growth. A bacteriophage capable of infecting *Arthrobactersp* was isolated from a soil sample. Using Transmission Electron Microscopy and DNA sequencing the isolated phage was characterized. Some DNA fragments from the phage's genome, generated by restriction digestion, were cloned into vector pBlueScript II KS and sequenced. TEM images showed phages with isometric capsids and long non-contractile tails, similar to the basal platforms described for the family *siphoviridae* of the order *caudovirales*. Two of the DNA fragments sequenced from the phage's genome showed similarity with the genes coding for a protein in charge of modulating the tail's length in bacteriophages that infect bacteria of the genus *Gordonia* and *Rhodococcus*. The similarity was in the order of 36-41%, which is considered low and may suggest that the isolated phage is related to the bacteriophages that infect bacteria of the mentioned genus but not identical to any reported previously, thus could be a new phage discovered for *Arthrobacter. sp.*

Contenido

Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
1. Introducción.....	1
1.1. Lodos residuales.....	1
1.2. Ácido Tereftálico.....	1
1.2.1. Degradación de ácido terftálico.....	2
1.2.2. Microorganismos degradadores de ácido tereftálico.....	2
1.3. Problemas asociados a la disposición de lodos.....	4
1.4. Bacteriófagos.....	6
1.4.1. Uso de los bacteriófagos.....	9
1.4.2. Naturaleza del virion.....	11
1.4.3. Genomas.....	12
1.4.4. Clasificación.....	13
1.4.5. Ciclo de replicación.....	15
2. Hipótesis.....	18
3. Justificación.....	19
4. Objetivos.....	20
4.1. General.....	20
4.2. Particulares.....	20
5. Materiales y Métodos.....	21
5.1. Medios de cultivo.....	21
5.2. Buffers y Soluciones.....	21
5.2.1. Reactivos.....	22
5.3. Bacterias.....	22
5.4. Mantenimiento de los microorganismos.....	23
5.5. Colección de muestras.....	23
5.6. Tapices bacterianos.....	23
5.7. Aislamiento y purificación de bacteriófagos.....	24
5.8. Titulación del bacteriófago.....	24
5.9. Microscopía electrónica.....	25
5.10. Identificación genética del bacteriófago aislado.....	26
5.10.1. Ensayo del contenido del ADN del bacteriófago.....	26
5.10.2. Extracción y purificación del ADN del bacteriófago.....	26
5.10.3. Digestión del ADN del fago y el plásmido con enzimas de restricción.....	27
5.10.4. Desfosforilación del plásmido.....	27
5.10.5. Ligación de fragmentos de ADN.....	27
5.10.6. Preparación de las Células Calcio-Competentes.....	28
5.10.7. Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	28
5.10.8. Extracción del plásmido (Lisis Alcalina).....	28
5.10.9. Secuenciación del inserto.....	29
5.11. Biocontrol.....	30
6. Resultados.....	31

6.1.	Aislamiento de los Bacteriófagos	31
6.1.1.	<i>Arthrobacter sp.</i>	31
6.1.2.	<i>Brevundimonassp.</i>	33
6.2.	Análisis de contenido de ADN.....	34
6.3.	Microscopía electrónica	36
6.4.	Identificación genética del bacteriófago aislado	38
6.4.1.	Extracción y purificación del ADN del fago.....	38
6.4.2.	Digestión del ADN del fago y el plásmido con enzimas de restricción.....	39
6.4.3.	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α	39
6.4.4.	Extracción del plásmido	40
6.4.5.	Secuenciación del inserto	41
6.5.	Biocontrol.....	42
7.	Conclusiones.....	44
8.	Referencias.....	45

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Molécula de ácido terftálico</i>	2
<i>Figura 2. Placa de lisis formada en un césped de Arthrobacter sp.</i>	33
<i>Figura 3. Placas de lisis formadas en un césped de Arthrobacter sp. después de dos pases consecutivos</i>	33
<i>Figura 4. Ensayo del contenido de ADN del bacteriófago que infecta la cepa Arthrobacter sp. En el Carril 1 y 3 no se rompe la capsida, y en el carril 2 y 4 se rompe la capsida liberando el material genético del bacteriófago. El carril 5 representa el marcador de peso molecular.</i>	35
<i>Figura 5. Micrografías electrónicas del bacteriófago que infecta la cepa Arthrobacter sp.</i>	37
<i>Figura 6. Placas de lisis producidas por el fago que infecta Arthrobacter sp. Dilución del Stock: 10^{-5}</i>	38
<i>Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la extracción. En carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: ADN del bacteriófago.</i>	38
<i>Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación del ADN viral. Carril 1, muestra con ADN; carril 2 marcador de peso molecular</i>	38
<i>Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación de las digestiones con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. A) ADN del bacteriofago digerido con BamHI, B) ADN del bacteriofago digerido con EcoRI, C) ADN del bacteriofago digerido con BamHI y EcoRI, D) pBlueScript KS(-) II digerido con BamHI y EcoRI, E) pBlueScript KS(-) II digerido con EcoRI, F) pBlueScript KS(-) II digerido con BamHI, M) Marcador de peso molecular</i>	39
<i>Figura 10. Cinética de Arthrobacter sp. en medio con ácido tereftálico. A+F : Cinética en la cuál se agregaron 2 ml del stock del bacteriófago a las 113 (la flecha indica el momento de la inoculación) . C: Cinética control, sin inóculo del bacteriófago.</i>	43

Índice de Tablas

<i>Ventajas e inconvenientes de los Procesos de estabilización de lodos</i>	7
<i>Ventajas e inconvenientes de los Procesos de eliminación de lodos</i>	8
<i>Fuentes de muestreo para el aislamiento de bacteriófagos</i>	23
<i>Aislamiento de bacteriófagos de diversas fuentes para la cepa Arthrobacter sp.</i>	31
<i>Aislamiento de bacteriófagos de diversas fuentes para la cepa Brevundimonas sp.</i>	35
<i>Concentración del fago</i>	36
<i>Proteínas que tiene similitud con las secuencias 347F y 359R clonadas en el plásmido pBlueScript KS(-) II</i>	41

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Lodos residuales

Hoy en día la necesidad de minimizar residuos, así como su disposición adecuada y segura, son aspectos de suma importancia mundialmente, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas tecnológicas y cambios en las políticas de manejo que permitan generar residuos no peligrosos y estables para su correcta disposición o *reaprovechamiento* (Oropeza, 2006).

Los lodos generados en el tratamiento del agua residual son considerados residuos peligrosos, de acuerdo con lo establecido en la NOM-052-ECOL-1993 (DOF, 1993). Sin embargo, estos lodos poseen características benéficas que pueden ser aprovechadas como son el contenido de nutrientes y materia orgánica (Castrejón *et al.*, 2000). Una definición amplia de lodo podría ser la siguiente: Cualquier sólido, semi-sólido o líquido de desecho generado por una planta municipal, comercial o industrial de tratamiento de aguas residuales, de aguas de consumo o instalaciones de control de la contaminación atmosférica u otra clase de desechos de similares características y efectos (Mahamud *et al.*, 1996a)

En las últimas décadas se ha observado el fenómeno del aumento en la contaminación del terreno y de los cuerpos acuíferos debido a las aguas residuales que contienen compuestos del ácido ftálico (ácido orto-bencen di-carboxílico, ácido meta-bencen di-carboxílico y ácido para-bencen di-carboxílico) (Kleerebezem *et al.*, 2005). Por tal razón se ha dado gran importancia a los tratamientos biológicos para la degradación de los principales contaminantes como compuestos aromáticos, aromáticos clorados y alifáticos clorados (Macarie and Guyot, 1992) entre los que destaca el Acido Tereftálico (AT) y sus derivados (Martínkova *et al.*, 2009).

1.2. Ácido Tereftálico

El ácido tereftálico (PAT por sus siglas en inglés) es un ácido dicarboxílico aromático cuya fórmula molecular es $C_8H_6O_4$ (Figura 1). El PTA es un importante químico a granel cuya aplicación más conocida es en tereftalato de polietileno (PET), que es empleado ampliamente para la fabricación de botellas para la venta de bebidas carbonatadas (Kleerebezem *et al.*, 2005). Es un compuesto

orgánico tóxico debido a sus propiedades teratógenas, mutagenas y carcinógenas (Vamsee-Krishna and Phale, 2008). Ha sido añadido a la lista de contaminantes de prioridad por la agencia de protección ambiental en Estados Unidos (Thiruvengkatachari et al., 2006), y en México está considerado como residuo peligroso de acuerdo a la Nom-052-SEMARNAT-1993.

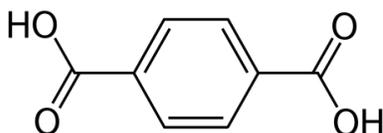


Figura 1. Molécula de ácido terftálico

1.2.1. Degradación de ácido terftálico

Debido a su acumulación en el medio ambiente, a su creciente demanda en la industria química ya que el ácido tereftálico es uno de los principales componentes del PET, al deterioro ambiental que genera y a los problemas de salud que produce, se han estudiado procesos químicos (Masuda et al., 1997) y recientemente procesos biológicos para la degradación de este compuesto y algunos precursores (Wang and Gu, 2006) en donde la degradación por bacteria es eficiente ya que el ácido tereftálico es totalmente biotransformado o mineralizado por los microorganismos. Por cada tonelada producida de PTA, se generan 3-10 m³ de aguas residuales con 5-20 gDQO/L (Kleerebezem et al., 2005).

1.2.2. Microorganismos degradadores de ácido tereftálico

Ya que las velocidades de fotólisis e hidrólisis química son muy lentos dentro de los procesos físicos y químicos, respectivamente, el rompimiento metabólico por microorganismos se considera una de las principales rutas para la degradación ambiental de los esteres de ftalatos (Juneson et al., 2002). Se han encontrado varios tipos de microorganismos que degradan esteres de ftalatos incluyendo especies aerobias y anaerobias (Wang and Gu, 2006, Sivamurthy and Pujar, 1989).

Algunos géneros involucrados en la biodegradación de este tipo de compuestos además de algunos otros y que son de interés en el presente trabajo se mencionan a continuación.

1.2.2.1. *Arthrobacter* sp.

Diversos estudios han mostrado que las bacterias que pertenecen al género *Arthrobacter* forman una fracción numéricamente importante en suelos de diferentes partes del mundo.(Jones and Keddie, 2006). Estas bacterias, están bien adaptadas a vivir en la tierra porque son muy resistentes a la desecación y al ayuno de nutrientes. Adicionalmente, presentan una flexibilidad nutricional inusitada, y pueden degradar incluso algunos herbicidas y pesticidas (diazinón, fenoxiácéticos y m-clorobenzoato) (Brown et al., 1978).

Al género *Arthrobacter*, pertenecen un grupo de bacterias corniformes de las cuales varias cepas son industrialmente usadas para la producción de ciertos aminoácidos tales como el ácido glutámico.(Le Marrec et al., 1996).Su característica peculiar es su ciclo de crecimiento bacilo-coco(Prescott et al., 2004), además de que pueden formar micelios cortos (Conn, 1948). Cuando *Arthrobacter* crece en fase exponencial, las bacterias son bacilos irregulares, ramificados, que se pueden reproducir por división crepitante. Cuando entran en la fase estacionaria las células cambian a una morfología cocoide. Al ser transferidas a un medio nuevo, las células cocoides producen brotes y de nuevo se observan como bacilos de crecimiento activo (Prescott et al., 2004).Existe ahora mucha evidencia de que especies de este género pueden utilizar un amplio y diverso rango de substratos orgánicos como única fuente de carbono y energía. Wang y Gu (2006) encontraron que *Arthrobacter* sp. P-46 fue capaz de degradar DMTP (Dimetil tereftalato) del agua residual en una planta de tratamiento.

1.2.2.2. *Brevundimonas* sp.

El género *Brevundimonas* fue propuesto basado en una reclasificación de dos especies de *Pseudomonas* como *Brevundimonas diminuta* y *Brevundimonas vesicularis*. Al momento hay 10 especies de *Brevundimonas* con nombres publicados con validez (Ryu et al., 2007).

El género *Brevundimonas* pertenece a la familia *Caulobactereacea*, son organismos oligótrofos y quimiorganótrofos, con un metabolismo respiratorio estrictamente aerobio. Algunas especies de *Brevundimonas* producen prosthecae (son filamentos en células bacterianas que se reproducen

por gemación). Son células Gram negativas en forma de vara de 0.4-0.5 x 1-2 μm (Segers et al., 1994).

Algunas especies tienen la habilidad de degradar y desintoxicar componentes aromáticos y organofosforados. *Brevundimonas aveniformes* fue aislada de lodos activados y realizó una mayor eliminación biológica de fósforo en un reactor en lote (Ryu et al., 2007). Las capacidades metabólicas inusuales de algunas cepas de *Brevundimonas* han sido investigadas por la bioconversión de componentes intermediarios de la producción de cefalosporina (Segers et al., 1994)

Estos microorganismos son bacterias acuáticas, al menos algunas especies han sido aisladas de agua mineral. Las especies proteobacterales pueden ser aisladas del suelo (ej. *B. alba*). Las especies no proteobacterales se han identificado en especímenes clínicos tales como cultivos de sangre, fluidos biológicos infectados, orina, heridas, vagina, ojo y en cultivo de tejidos (Segers et al., 1994).

1.3. Problemas asociados a la disposición de lodos

Recientemente se han realizado estudios que reportan que los lodos residuales que en México han significado un grave problema, pueden ser reutilizados sin riesgo a la salud y al ambiente, demostrando que incrementan del 10 al 85% el rendimiento de los cultivos en relación con fertilizantes comunes, así, estos desechos podrían ser aprovechados después de ser sometidos a diversos procesos de estabilización, generando biosólidos que podrían aplicarse como fertilizantes dependiendo de las características del suelo, el problema es la alta concentración bacteriana que presentan, ya que esto los vuelve residuos peligrosos creando la necesidad de mandarlos a confinamientos o incinerarlos (Oropeza, 2006).

Una consecuencia a considerar cuando se realiza el tratamiento de compuestos aromáticos como el ácido tereftálico es la generación de una enorme cantidad de biomasa las cuales se pueden considerar como lodos. Se puede considerar que una persona descarga 370 L de aguas residuales con un contenido de sólidos de 300 mg/L (Jiménez, 2002).

Los procesos más comúnmente utilizados para el tratamiento de lodos residuales, generados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, son la digestión aerobia, digestión anaerobia,

compostaje, estabilización química e incineración (Mahamud et al., 1996b). Algunas ventajas y desventajas de estas tecnologías están resumidas en las tablas 1 y 2.

En general, las líneas de tratamiento de lodos residuales se encuentran enfocadas a dos aspectos fundamentales, que son: a) Reducción de volumen: pueden obtenerse por un simple espesamiento (con el que la sequedad del producto podrá alcanzarse en algunos casos el 10 o muy excepcionalmente, el 20%, sin que, por ello, pueda manejarse con pala), deshidratación por drenaje natural, escurrido mecánico, secado térmico, o también como continuación de una deshidratación, y por una incineración. b) Reducción del poder de fermentación o estabilización: Consiste en reducir su actividad biológica (tendencia a la putrefacción) y su contenido de microorganismos causantes de enfermedades. La estabilización puede obtenerse mediante procesos tales como: digestión anaerobia o aerobia, estabilización química, pasteurización, cocción, etc. (Oropeza, 2006).

Existen diferentes motivos para proceder a un tratamiento adecuado de los lodos, que pueden resumirse en seis fundamentales: *Motivaciones concernientes a la salud pública, Opinión pública Aspectos legales, Consideraciones económicas y Aspectos medioambientales.*

La problemática asociada a los biosólidos aparece cuando éstos dejan de ser un producto para convertirse en un residuo. Por ello es preciso buscar tratamientos adecuados que permitan, preferentemente, una utilización racional de los citados biosólidos y sólo en caso de ser inviable esta alternativa, proceder al procesado de los mismos como residuo de la forma más conveniente, tanto desde el punto de vista económico como ambiental (Mahamud et al., 1996a).

Ya se ha visto que el lodo puede ser procesado bien como un recurso con un potencial aprovechable o como un residuo (Mahamud et al., 1996b). Paralelamente, los procesos de tratamiento de lodos pueden dividirse en dos grandes categorías. Por un lado, existen una serie de tratamientos que podríamos denominar de estabilización de los lodos, es decir, consisten fundamentalmente en someterlos a un tratamiento con vistas a su utilización posterior. Por otra parte se utilizan también una serie de procesos conducentes a una casi total eliminación de la materia orgánica del lodo, obteniendo así un residuo más manejable y prácticamente inerte (Mahamud et al., 1996a).

Sin bien estos procesos son utilizadas para la estabilización y la disposición final de los lodos residuales, un hecho que aún no se potencializa de los lodos, es que pueden ser convertirlos en un recurso aprovechable y no peligroso. Los procesos de tratamiento diseñados para lograr una reducción de bacterias pueden incurrir en capital substancial y costos de operación. El desarrollo del tratamiento de lodos con bacteriófagos puede proporcionar un control efectivo del costo a largo plazo de bacterias potencialmente patógenas. El conocimiento de la importancia de los bacteriófagos en ecosistemas acuáticos y terrestres ha despertado el interés en las más amplias aplicaciones ambientales (Withey et al., 2005). Existe también un potencial uso de técnicas con bacteriófagos que influyen en el tratamiento de aguas residuales, sin embargo este tema será discutido con más detalle en la sección de uso de los bacteriófagos.

1.4. Bacteriófagos

Los Bacteriófagos o fagos son las estructuras biológicas con ácidos nucleicos más abundantes sobre la tierra (10^{31}). Están ampliamente extendidos, incluyendo alimentos (García et al., 2010), y orígenes diversos como agua, suelo, aire además del lugar en que se encuentre su célula huésped (Kutateladze and Adamia, 2010). Los bacteriófagos, que generalmente se denominan en forma abreviada fagos, son virus que infectan bacterias (García et al., 2010). También han sido definidos como entidades biológicas, agentes infecciosos y parásitos intracelulares obligados, (Withey et al., 2005). Claramente no es un problema diferenciar a los virus de organismos microscópicos superiores. Incluso dentro de una definición amplia de microbiología, que abarca organismos procariontes y eucariontes microscópicos tales como algas, protozoos y hongos, en la mayoría de los casos será suficiente (Cann, 2005). Algunos grupos de organismos procarióticos, sin embargo, han especializado ciclos de vida parasitaria intracelular, y se pueden confundir con la definición mencionada arriba. Estas son las Rickettsias y las Clamidias, bacterias parásitas intracelulares obligadas (Prescott et al., 2004), las cuales han evolucionado para estar asociados a la célula y que pueden existir fuera de sus anfitriones por solo un corto periodo de tiempo antes de perder la viabilidad. Por lo tanto es necesario agregar más cláusulas a lo que constituye un virus. Estas son: (i) las partículas víricas son producidas del ensamble de componentes preformados, mientras que otros agentes crecen a partir de un aumento en la suma integrada de sus componentes y se reproducen por división (Cann, 2005) (ii) Las partículas virales (viriones) por sí mismas no crecen o se someten a división (Rittmann and McCarty, 2001) y (iii) Los virus carecen de la información genética que codifica el aparato necesario para la generación de energía metabólica o para la síntesis de proteínas (ribosomas) (Cann, 2005)

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de los Procesos de estabilización de lodos

Proceso	Ventajas	Desventajas
DIGESTIÓN ANAEROBIA	<p>Importante reducción de sólidos volátiles (entre un 40 y un 60%)</p> <p>Bajos costes de operación si se recupera el metano producido</p> <p>Se tratan por encima de 7.500 m³/día</p> <p>Buena reducción del número de microorganismos patógenos</p> <p>Lodos utilizables para agricultura</p> <p>Reducción de la masa total de lodo</p>	<p>Elevado volumen de inversión preciso para llevar a cabo su instalación</p> <p>Posibilidad de depósitos minerales en el equipo, dificultades de limpieza y posible formación de espumas</p> <p>Potencial producción de olores</p> <p>Peligrosidad de los gases inflamables producidos</p> <p>Presenta sobrenadantes con elevadas DBO, DQO, sólidos en suspensión y NH₃</p> <p>Puede presentar problemas de "digestión ácida" ya que los microorganismos productores de metano son de crecimiento lento (tiempos de residencia que van de los 17 a los 30 días)</p>
DIGESTIÓN AEROBIA	<p>Bajo coste inicial, sobre todo para pequeñas instalaciones</p> <p>El sobrenadante es menos problemático que en el caso de los procesos anaerobios</p> <p>Control de operación simple</p> <p>Amplio intervalo de aplicación</p> <p>Buena desinfección del lodo (en el caso de procesos termófilos)</p> <p>Poca generación de olores con un diseño y operación adecuados</p> <p>Reducción de la masa total de lodo</p>	<p>Altos costes energéticos</p> <p>Generalmente menor reducción de sólidos volátiles que el proceso de digestión anaerobia</p> <p>Puede precisar la adición de álcali para reducir la bajada de pH</p> <p>Pueden producirse espumas</p> <p>Existe la posibilidad de dispersión de patógenos por medio de aerosoles</p> <p>El lodo es difícil de deshidratar por medios mecánicos</p> <p>Las bajas temperaturas afectan negativamente su rendimiento</p> <p>Aplicable generalmente a EDAR de tamaño reducido con una capacidad de tratamiento por debajo de 17.000 m³/día aunque se ha utilizado con éxito en plantas mayores. Instalaciones típicas pueden tratar caudales de agua del orden de 3.000-6.000 m³/día</p>
COMPOSTEO	<p>Se obtiene un producto de alta calidad comercializable para su uso en agricultura</p> <p>Admite ser combinado con otros procesos y presenta costos iniciales bajos</p>	<p>Requiere contenidos en sólidos entre el 40 y el 60% así como la incorporación de un agente de textura</p> <p>Es preciso disponer de un sistema de aireado a presión o bien de volteado mecánico, y debido a ello existe una posible dispersión de patógenos a través del polvo</p> <p>Elevados costes de operación y grandes requerimientos de terreno</p> <p>Precisa la incorporación de otro material como fuente de carbono</p> <p>Es un productor potencial de olores aunque la observancia de procedimientos adecuados de operación y diseño minimizan la aparición de olores desagradables.</p>

Fuente: (Mahamud et al., 1996b, Mahamud et al., 1996a)

Tabla 2. Ventajas e inconvenientes de los Procesos de eliminación de lodos

Proceso	Ventajas	Desventajas
OXIDACIÓN HÚMEDA	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de dióxido de carbono y productos inocuos • Fuertes reducciones del contenido en sólidos de los lodos producidos así como de la carga contaminante de los mismos • Tiempo de residencia es superior a 40 minutos • Reducción media del contenido en sólidos volátiles de un 80% 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada temperatura (260°C) y presión (100 atm)
INCINERACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> • Los biosólidos son reducidos a cenizas in-situ • La combustión destruye todos los microorganismos presentes y oxida los compuestos orgánicos tóxicos • Los metales pesados en las cenizas son menos solubles • Un diseño adecuado puede hacer la incineración económicamente viable • Existencia de la tecnología adecuada para mantener el nivel de emisiones a la atmósfera en valores admisibles • Es una alternativa de depósito a largo plazo pues produce una notable reducción de volumen. Las cenizas representan un 20% del volumen total de materia seca (un 30% en peso) y del orden del 4% del volumen de tortas que tuvieran un 20% de contenido en sólidos 	<ul style="list-style-type: none"> • De tipo económico dado que es la alternativa más costosa de eliminación de lodos (combustible) • Las instalaciones de incineración suelen plantear comúnmente serios problemas de contestación social por posibles problemas medioambientales

Fuente: (Mahamud et al., 1996a, Mahamud et al., 1996b)

El trabajo de Twort en 1915 describe la transformación vidriosa de algunas colonias del género *Micrococcus*, que, en lugar de su apariencia normal, opaca y de color blanco cremoso, adquieren un aspecto transparente como el del cristal; cuando una colonia normal contactaba con una vidriosa en poco tiempo adquiría el mismo aspecto. La palabra bacteriófago que significa *devorador de bacterias*, fue acuñada por d'Herelle, que, al parecer redescubrió independientemente este fenómeno en 1917. Los bacteriófagos en pocos minutos, son capaces de aniquilar *in vitro*, grandes poblaciones de bacterias patógenas (Douglas and Guinea, 1978), pero se ha comprobado que tienen un espectro muy limitado de bacterias huéspedes susceptibles de ser infectadas y lisarse (Kutateladze and Adamia, 2010). Normalmente, las bacterias huéspedes de un fago concreto son variantes muy relacionadas de una especie. Generalmente cada cepa bacteriana es susceptible de ser infectada por un grupo de fagos, aunque estos puedan diferir ampliamente entre ellos respecto a otras características.

Aunque los bacteriófagos son excesivamente pequeños para observarse incluso con microscopios ópticos, es posible sin embargo, observarlos como puntos móviles utilizando microscopios adecuados de campo oscuro, e incluso contar el número de partículas liberadas por la explosión de una célula bacteriana infectada (Douglas and Guinea, 1978). Las dimensiones de los fagos pueden estimarse comprobando la capacidad de paso de los mismos a través de filtros ultra finos con poros de tamaño conocido (Alberts, 1996). En el trabajo rutinario, las características fenotípicas se interpretan a través del aspecto de las calvas producidas en los cultivos bacterianos (Madigan et al., 2003). Sin embargo existe la posibilidad de que aparezcan calvas no producidas por bacteriófagos.

Una placa se deriva de la infección de una sola bacteria por una sola partícula de bacteriófago. (Douglas and Guinea, 1978). La progenie del virus sintetizada por la primera infección, de igual manera, infecta a las bacterias vecinas, las cuales a su vez liberan otra generación de partículas víricas hijas (Prescott et al., 2004). Si las bacterias están creciendo en un medio semisólido (por ejemplo, agarosa o agar), la difusión de las partículas víricas es limitada. Bajo estas circunstancias, el resultado de sucesivas rondas de infección es una zona de difusión de la lisis bacteriana (Douglas and Guinea, 1978) que, después de varias horas de incubación, comienza a ser visible a simple vista como relativamente clara (Prescott et al., 2004). Debido a que cada placa contiene la progenie de una simple partícula viral, los bacteriófagos derivados de una sola placa son idénticamente genéticos el uno al otro (Douglas and Guinea, 1978).

1.4.1. Uso de los bacteriófagos

Una alternativa que surge actualmente hacia la disposición de los lodos, es la utilización de *bacteriófagos*. Aquí la potencial aplicación de las técnicas con fagos es en los sistemas de tratamiento de aguas residuales para mejorar las emisiones de efluentes y lodos al ambiente (Withey et al., 2005). La mortalidad de bacterias mediada por fagos tiene el potencial para influir en resultados del tratamiento mediante el control de la abundancia de los principales grupos funcionales bacterianos (Thomas et al., 2002). El tratamiento con fagos tiene el potencial de controlar los problemas en los procesos ambientales de tratamiento de aguas residuales tales como: espuma en plantas de lodos activados, bacterias patógenas y reducir la competencia entre bacterias no deseadas, y poblaciones microbianas funcionalmente importantes. La aplicación exitosa de la terapia fágica al tratamiento de aguas residuales requiere un completo entendimiento de las interacciones y dinámicas de las comunidades microbianas. Se deben desarrollar también

estrategias para hacer frente a la especificidad del huésped y la resistencia de la célula huésped, al igual que consideraciones de seguridad en relación con la emergencia de patógenos (Withey et al., 2005).

La formación de espuma es un problema de separación de sólidos a nivel mundial causado por la proliferación de microorganismos filamentosos en las plantas de lodos activados (Wanner, 1994) y es detectado como una espuma espesa y estable en las cuencas de aireación y clarificadores. La formación de espuma es perjudicial para la productividad y la eficiencia de la planta. En la actualidad los métodos usados para el control de la espuma, tales como la manipulación por la edad de los lodos, no son adecuados para controlar todas las espumas. Los microorganismos aislados de la espuma, comúnmente incluyen los géneros de *Corynebacteria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Dietzia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, y *Skermania* (Thomas et al., 2002). Considerando la riqueza de bacterias en lodos activados uno podría esperar que también fuese una importante fuente y ambiente ideal para el aislamiento de nuevos fagos (Withey et al., 2005).

La habilidad de los bacteriófagos para lisar y/o lisogenizar sus bacterias huéspedes les permite ser usados como herramientas biológicas (Thomas et al., 2002). Una de estas es la terapia con fagos, que es el uso de los fagos en el tratamiento de patógenos humanos (Brussow, 2005). La terapia con fagos ha despertado recientemente, el interés como una alternativa a la terapia con antibióticos, a la luz del aumento a la resistencia de patógenos a los antibióticos (Kutateladze and Adamia, 2010). Otros posibles usos de los fagos como agentes de biocontrol incluyen el tratamiento de floraciones de algas (Thomas et al., 2002) enfermedad en los peces (Nakai et al., 1999) y fuego bacteriano (enfermedad contagiosa causada por *Erwinia amylovora* que afecta a diversos vegetales de la familia de las rosáceas entre las cuales se encuentra el peral y el manzano) en los árboles (Thomas et al., 2002).

Otros usos que se le han dado a los bacteriófagos son la descontaminación de las reses muertas y productos crudos tales como los vegetales y los frutos frescos (García et al., 2008) además de desinfectar equipo y superficies de contacto (biosanitización con fagos). Otra aplicación es el llamado biocontrol con fagos que entre otros incluye extender la vida de anaquel de productos perecederos utilizándolos como conservadores naturales (García et al., 2010).

La alta frecuencia de partículas virales en el medio ambiente tiene un efecto positivo a nivel ecológico, ya que la predación de bacterias constituye un factor de control y a la vez de estímulo

para el crecimiento de las poblaciones bacterianas (Ashelford et al., 2003). Esta misma predación cumple un papel importante en la red alimentaria, debido a que la lisis celular contribuye al ciclo de nutrientes, al dejar circundantes sustancias disueltas y pequeñas partículas que luego son asimiladas por bacterias heterótrofas (Fuhrman and Schwalbach, 2003).

Los fagos también son un mecanismo potencial para la diseminación de genes dentro de grupos relacionados de bacterias y aún en estado de profagos, brindan una ventaja fenotípica en el huésped al transferir información que permite a la célula adaptarse a cambios ambientales. Esta transferencia de genes de una bacteria donante a una receptora se conoce como transducción, lo que contribuye de manera significativa a mantener el contenido genético total (Ashelford et al., 2003, Lorenz and Wackernagel, 1994).

1.4.2. Naturaleza del virion

Los virus poseen dos estados, uno extracelular y otro intracelular (Prescott et al., 2004). En el estado extracelular un virus es una partícula minúscula que contiene ácido nucleico rodeado por proteína y que dependiendo del virus específico, contiene otros componentes macromoleculares. En este estado extracelular, la partícula vírica, también llamada virión, es metabólicamente inerte, y carece de funciones respiratorias y biosintéticas (Madigan et al., 2003). El virión es la estructura mediante la cual el genoma del virus se transporta desde la célula en la que se ha producido a otra célula en la que el ácido nucleico vírico, puede ser introducido (Birge, 2006). Una vez dentro de la nueva célula se inicia el estado intracelular (Madigan et al., 2003). Durante este estado tiene lugar la replicación del virus: se producen nuevas copias del genoma vírico, y se sintetizan los componentes de la cubierta del virus (Prescott et al., 2004). Cuando un genoma vírico se introduce y se reproduce en una célula hospedadora, el proceso se denomina *infección*. La célula que puede ser infectada por un virus que, además, se reproduce en ella, se denomina *hospedador o huésped* (Madigan et al., 2003).

Las partículas víricas (viriones) varían ampliamente en tamaño y forma (Rittmann and McCarty, 2001). Los virus son más pequeños que las células, oscilando en tamaño desde 0.02 a 0.3 μm . El virus de la viruela, uno de los virus más grandes tiene un diámetro de unos 200 nm (algo más pequeño que la bacteria más pequeña), mientras que los poliovirus están entre los más pequeños, con sólo 28 nm de diámetro (aproximadamente el tamaño de un ribosoma) (Madigan et al., 2003).

El virión es una estructura constituida de varios tipos de proteínas, resultado de la expresión de los genes que se codifican en su genoma viral. La cápside del fago T4, uno de los más complejos estructuralmente, se conforma de varios tipos de proteínas resultado de los genes *gp 23, 24, 20, 22* (Birge, 2006) *soc gp* y *hoc gp*. Éstas tienen un cuello conector (genes 3, 15) con un collar (genes *wac*) que le conectan con la cola contráctil. La cola se compone de un tubo de 144 moléculas proteicas codificadas por *gen 19*, el cual se recubre por una vaina de 144 glicoproteínas (*gen 18*), organizadas en 24 anillos. La formación de la plataforma basal y las espículas requiere de la expresión de los genes 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 25, 29, 48, 53, 54. Las largas fibras son compuestas por la expresión de los genes 34, 36, 37 (Birge, 2006).

De acuerdo con los trabajos realizados por Caspar en 1962, se denominó virión a una partícula infectiva completa, ésta se compone de una nucleocápside, la cual contiene el ácido nucleico recubierto por una capa proteínica simétrica llamada cápside y los capsómeros que son aquellas estructuras superficiales de la cápside indispensables para la infección (Birge, 2006).

La *cápside* de un bacteriófago se forma por la unión electrostática de uno o varios tipos de subunidades proteicas idénticas organizadas de manera simétrica en forma icosaédrica como los fagos T4, T7 y λ , o en forma helicoidal filamentosa como los fagos M13, fd, fd1 (Cann, 2005). Según los estudios de Caspar y Klug en 1962, la estructura icosaédrica permite la unión de múltiples unidades simétricas en una cubierta cerrada con la menor disposición de energía libre. Esto explica la abundancia de virus con esta morfología en la naturaleza (Calendar, 2006).

La estructura viral de los bacteriófagos más complejos como T4, λ , T7, T3, Mu, P2, P4 y $\phi 29$ incluyen un túnel inyector o *cola* la cual puede ser corta ($\phi 29$), larga contráctil (T4) o larga no contráctil (λ), una plataforma basal, espículas ($\phi 29$) y fibras. Elementos esenciales para el reconocimiento y la absorción del fago hacia la célula huésped. Además, en el interior del fago se encuentran las proteínas andamio que se encargan del ensamblaje correcto del ADN en las cápsides junto con proteínas de expulsión que actúan en el momento de la infección de un nuevo huésped (Calendar, 2006).

1.4.3. Genomas

A diferencia de las células, los virus contienen o bien ADN o ARN como material genético y en ambos casos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena (Calendar, 2006), encapsulado por una cubierta proteica que exhibe los elementos estructurales necesarios para una infección

específica. Se dividen en dos tipos según contengan ADN o ARN. Sin embargo existe un tercer tipo que usa ambos, ADN y ARN, pero en distintos estadios de su ciclo replicativo. Este último grupo incluye a los retrovirus, que contiene un genoma de ARN en el virión, pero se replica a través de un intermediario de ADN (Cann, 2005). La conformación y organización proteica de sus cápsides, les confiere la habilidad de permanecer viables por largos períodos de tiempo en el ambiente a la exposición de ADN-asas, variaciones de pH y temperatura (Calendar, 2006).

En los virus, sus genomas son más pequeños en comparación con los genomas bacterianos y tienen una capacidad limitada de contener información. Sin embargo, se han desarrollado estrategias para obtener una máxima capacidad para el almacenamiento de la información genética (Cann, 2005). Esto consiste en traslapar genes, es decir, que el segmento de ácido nucleico en el cual se encuentra codificado el gen *a*, también se encuentra únicamente el inicio del gen *b*. Una segunda estrategia consiste en la superposición de genes, el segmento que contiene al gen *c* también posee el gen *d* siendo el producto de *c* más grande que *d*. La multiplicidad de marcos de lectura característica de los genomas virales implica la necesidad de una compleja regulación y coordinación de la expresión de estos genes (Birge, 2006).

1.4.4. Clasificación

Las primeras clasificaciones de bacteriófagos fueron realizadas por Bradley en 1967, quien las agrupó de acuerdo con las características morfológicas más contrastantes de los fagos en cinco grupos. Los fagos con cola contráctil conformaban el grupo I. Los fagos que poseían una cola larga pero no contráctil fueron el grupo II. Los fagos con cola corta, el grupo III. Los grupos IV y V, que luego fueron un solo grupo, consistían de bacteriófagos con cola que exponían su capsómero tanto largo y corto. Por último, el grupo VI o de los fagos filamentosos (Tikhonenko, 1970).

El desarrollo tecnológico en el campo de la Microscopía Electrónica de Transmisión y Cristalografía de Rayos X, ha permitido dilucidar hasta las más finas características morfológicas de los virus, las que a su vez, con el tipo de ácido nucleico y con el rango de infección son esenciales para su clasificación (Calendar, 2006).

El tipo de ácido nucleico que poseen los virus es importante para su clasificación, debido a la presencia de genomas virales de ARN en hebra sencilla, hebra doble, virus de ADN, hebra doble o sencilla, lineal, circular o segmentada (Cann, 2005). El tipo de ácido nucleico es determinante en la replicación durante la infección del huésped. Un tipo de clasificación se ha desarrollado

dependiendo del comportamiento del ácido nucleico en el momento de la infección. Basados en que todo un ARN mensajero (mARN) es designado como un ARN(+) y la secuencia que es complementaria (ADN o ARN) a este mensajero se denomina negativa (-) (Alberts, 1996). Con este criterio se han creado seis clases de virus. La clase I, se caracteriza por los virus que tienen ADN de cadena doble. En la clase II, los virus tienen ADN de cadena sencilla, cuya secuencia es igual a su ARN mensajero. En la infección, el virus se convierte en hebra doble en una forma replicativa (RF). Los virus agrupados en la Clase III son aquellos cuyo genoma es ARN de cadena doble. Los virus con ARN (+) de cadena sencilla, es decir que su genoma constituye un mARN son la Clase IV y los de ARN (-) son la Clase V. Los virus de ARN que envuelven una transcripción reversiva como primer paso, están agrupados en la Clase VI (Cann, 2005).

El Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (ICTV por sus siglas en inglés), es una organización que fue creada en el 1966 y dedicada a la clasificación los virus. Actualmente para los virus se reconoce una jerarquía de especie, genero, familia y orden (Cann, 2005).

Los fagos están clasificados en 13 familias basados en su forma, tamaño, tipo de ácido nucleico, y presencia/ausencia de envoltura o lípidos en su estructura. Muchos de ellos pertenecen a el orden *Caudovirales* (5360 de 5568 reportados a la fecha) con una cabeza icosaédrica y una cola y un ADN de doble cadena (Ackermann, 2007). De acuerdo a las características morfológicas de la cola, están clasificados en tres familias, caracterizadas por ser fagos sin membrana lipídica, compuestos de una cabeza con simetría icosaédrica: *Myoviridae* (cola contráctil), *Siphoviridae* (cola larga no contráctil), y *Podoviridae* (cola extremadamente corta). El resto de los fagos son cúbicos, filamentosos, o fagos pleomórficos con ADN de doble cadena (dsDNA por sus siglas en inglés), ADN de una sola cadena (ssDNA por sus siglas en inglés), ARN de doble cadena, o ARN de cadena simple (García et al., 2010). Algunas estructuras como cuello, collar, cubierta de la cola, plataforma basal, espículas y fibras o apéndices pueden ser características de este orden. El genoma de los caudovirales es una molécula de doble hebra de ADN no segmentado (Ackermann, 2007).

En el caso de la morfología de los actinofagos (fagos que infectan actinomicetos) tienen características tales como cabezas en forma icosaédrica, y largas colas no contráctiles que los colocan en la familia viral *Siphoviridae* (Thomas et al., 2002).

1.4.5. Ciclo de replicación

La infección es el proceso en el cual el fago reconoce y se adhiere a la célula huésped e inyecta su ácido nucleico atravesando la membrana celular hasta llegar al citoplasma. El genoma viral en el interior de la bacteria puede permanecer en estado atemperado como profago, insertándose en el cromosoma bacteriano o replicándose para formar múltiples partículas virales que conlleva a la lisis celular.

Los bacteriófagos con cola, por ejemplo, son maquinarias macromoleculares complejas que entregan su genoma dentro del citoplasma huésped mientras que su cápside y la cola permanecen unidos a la superficie de la célula. La expulsión del ADN de la cápside es disparada por la interacción específica de la proteína de la cola del fago con un receptor bacteriano (Leforestier et al., 2008).

Dependiendo de su estilo de vida, los fagos están divididos en virulentos y temperados. Los fagos virulentos estrictamente siguen el ciclo lítico por el que ellos se multiplican dentro de la célula bacteriana para finalmente lisarla y liberar la progenie. Por el contrario los fagos pueden entrar a un ciclo lisógeno debida a la inserción de ADN dentro del cromosoma bacteriano (profago) donde éste se replica como parte del genoma del huésped hasta que pueda ser inducido al ciclo lítico (Pitt and Gaston, 1995).

En el medio ambiente, la infección que es siempre un evento al azar, está altamente influenciada por la densidad bacteriana. Esto quiere decir que a mayor densidad de huésped, mayor oportunidad de infección (Fuhrman and Schwalbach, 2003). El reconocimiento y la interacción altamente específica entre la célula huésped y el fago hacen parte del proceso inicial de la infección conocido como *adsorción*. Parcialmente mediados por las proteínas asociadas a la cola que distintivamente reconocen receptores específicos en la bacteria (Madigan et al., 2003). El fago se adhiere a los receptores específicos en la membrana bacteriana que puede contener lipopolisacáridos, receptores de glucosa, galactosa o antígenos O (Lomovskaya et al., 1980, Calendar, 2006, Woods et al., 2002). Este evento es afectado por factores como el ambiente iónico y la temperatura (Adams, 1959). La unión se debe probablemente a interacciones electrostáticas influida por el pH y por la presencia de cationes divalentes tales como Ca^{+2} y Mg^{+2} (Lomovskaya

et al., 1980, Prescott et al., 2004). De la misma manera, las bajas temperaturas hacen inestable el proceso de la adsorción fago-huésped (Puck et al., 1951).

Sobre una adsorción irreversible, el fago inyecta el ácido nucleico. El ADN viral es introducido a la célula atravesando la membrana exterior, el espacio periplásmico (Gram negativas) y una membrana interior (Dreiseikermann, 1994). Se espera que la complejidad de la membrana en las células gram negativas provee una mayor variedad de receptores para los fagos, permitiendo así la evolución de los virus para adaptarse a los diferentes tipos de infección (Hemphill and Whiteley, 1975).

Una vez que la placa basal está firmemente asentada en la superficie celular, se producen cambios conformacionales en la placa basal y en la vaina. La vaina se reorganiza de tal forma que se contrae pasando de una conformación de cilindro de 24 anillos a otra de 12 anillos de longitud (fago T4) haciéndose más corta y más ancha y es entonces cuando el tubo central es empujado a través de la pared celular bacteriana. Finalmente el ADN de la cabeza es extruído, pasa a través del tubo del tallo y *penetra* en la célula huésped. Parece ser que el tubo interacciona con la membrana plasmática para formar un poro a través de la cual pasa el ADN (Prescott et al., 2004).

Una vez que el ADN viral se encuentra en el interior de la bacteria, puede mantenerse como profago cromosomal o extracromosomal en estado latente por varias generaciones (Susskind and Botstein, 1978). Sin embargo, en el ciclo lítico, poco después de la inyección, se detiene la síntesis de ADN, del ARN y de las proteínas del huésped. Las proteínas recién sintetizadas secuestran toda la maquinaria de la célula y la forzan a producir exclusivamente las proteínas estructurales del fago (García et al., 2010). La RNA polimerasa comienza a sintetizar mRNA tempranos (mRNA transcritos antes de que se sintetice el ADN del fago) que dirigen la síntesis de los factores proteicos y las enzimas necesarios para tomar el control de la célula huésped y fabricar los ácidos nucleicos virales. Algunas enzimas tempranas específicas del virus degradan el ADN de la célula huésped, deteniendo simultáneamente de esta forma la expresión génica y proporcionando la materia prima (nucléotidos) para la síntesis del ADN viral (Prescott et al., 2004).

En el caso del fago T4, tras la replicación del ADN viral, El mRNA tardío dirige la síntesis de tres tipos de proteínas: i) proteínas estructurales del fago, ii) proteínas que ayudan al ensamblaje del fago sin convertirse en parte de la estructura del virión y iii) proteínas que participan en la lisis celular y la liberación de fagos. Todas las proteínas necesarias para el ensamblaje de los fagos se sintetizan de forma simultánea y se utilizan en 4 líneas de subensamblaje relativamente

independientes. La placa basal se compone de 15 productos génicos. Cuando se ha finalizado la placa basal, se construye sobre ella el tubo del tallo y se ensambla alrededor del tallo. La procápside del fago se construye de forma independiente a partir de más de 10 proteínas, y a continuación se combina espontáneamente con el conjunto ensamblado del tallo. La procápside se ensambla con ayuda de las denominadas *proteínas de andamio*, que se degradan o eliminan una vez que ha concluido la construcción. En la base de la procápside, en su punto de unión con la cola, se localiza una *proteína portal especial*. Esta proteína forma parte de la estructura que ayuda a iniciar el ensamblaje de la cabeza y contribuye al movimiento del ADN hacia afuera y hacia adentro de la cabeza (Bazinet and King, 1985, Dreiseikelmann, 1994).

En cuanto a los mecanismos de empaque estos varían también en cada caso, la cantidad de ADN empacado en el fago λ está determinado por sus sitios terminales o secuencias *cos* (Sambrook and Russell, 2001). El fago T4 utiliza el método de cabeza llena, que quiere decir que el cápsido se llenará de la suficiente cantidad de material genético que le permita mantener la integridad de su cápsido y finalmente de la liberación de nuevas partículas virales que constituyen el fin de una infección lítica, donde la célula huésped puede ser lisada por el incremento de partículas virales en su interior, aunque en los fagos filamentosos, la liberación de tales partículas no establece una lisis (Calendar, 2006). Muchos fagos lisan sus células huésped al final de la fase intracelular. En este proceso se dirige la síntesis de una endolisina que ataca el peptidoglicano de la pared celular (Prescott et al., 2004).

Este estudio concierne la explotación de bacteriófagos como agentes naturales, no tóxicos y factibles para el biocontrol de bacterias degradadoras de ácido tereftálico.

2. HIPÓTESIS

Es posible realizar el control biológico de bacterias de los géneros *Arthrobacter* y *Brevundimonas* mediante el uso de bacteriófagos aislados del ambiente.

3. JUSTIFICACIÓN

La generación excesiva de lodos con alto contenido de biomasa al degradar un compuesto, ha llevado a la búsqueda de nuevos mecanismos para el reaprovechamiento, disposición o eliminación de estos lodos. La alta especificidad de los fagos podría ser utilizada para generar lisados que pueden ser aprovechados como sustrato para la producción de otros compuestos o el crecimiento de microorganismos.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Aislar bacteriófagos que sean capaces de infectar a *Arthrobacter sp.* y/o *Brevundimonas sp.* y que puedan ser utilizados para el control biológico de estos microorganismos.

4.2. Particulares

Aislar e identificar genéticamente un bacteriófago a partir de diversas fuentes que sea capaz de infectar a *Arthrobacter sp.* y/o *Brevundimonas sp.*

Caracterizar por microscopía electrónica el bacteriofago aislado

Determinar la capacidad de los fagos aislados en el control biológico de los lodos generados, *Arthrobacter sp.*, al degradar ácido tereftálico

Determinar la capacidad de los fagos aislados en el control biológico de los lodos generados, *Brevundimonas sp.*, al degradar ácido tereftálico

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Medios de cultivo

Se utilizaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento bacteriano, a continuación se detalla su composición:

Medio PYCa(peptona, extracto de levadura, , nitrato de calcio; (Williams et al., 1980).. Se utilizó peptona 0.5% (p/v), extracto de levadura 0.3% (p/v) y Nitrato de calcio 0.25% (p/v).

Agar PYCa. Su composición es la del medio PYCa suplementado con 15 g/l de agar.

Agar PYCa suave. Su composición es la del medio PYCa suplementado con 5 g/l de agar.

Medio con ácido tereftálico. Para realizar 1 L de medio se deben agregar a 5 g de ácido tereftálico($C_8H_6O_4$) 2.41 g de NaOH (para disolver el ácido), 0.814 g de NH_4NO_3 , 0.150 g de KH_2PO_4 , 0.075 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.075 g de NaCl.

Agar Ácido tereftálico. Su composición es la del medio ácido tereftálico suplementado con 15 g/l de agar.

LB (Luria-Bertani). Triptona (1% w/v), extracto de levadura (0.5% w/v), NaCl(1% w/v).. Posteriormente fue suplementado con ampicilina (1 μ l de antibiótico/ ml de medio LB).

Agar LB (Luria-Bertani). Su composición es la del medio LB suplementado con 15 g/l de agar.

5.2. Buffers y Soluciones

SMS Su composición incluye 5 g de NaCl, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 50 ml de Tris-Cl (pH 7.5) 1 M por Litro de H_2O destilada.

Mezcla colorante 2.5x SDS-EDTA. Su composición incluye 0.4% (v/v) de SDS, EDTA [30 mM], azul de bromofenol al 0.25% y 20% (p/v) de sacarosa.

Solución de lisis alcalina I. Su composición incluye glucosa [50 mM], Tris-Cl (pH 8) [25 mM] y EDTA (pH 8) [10 mM].

Solución de lisis alcalina II. Su composición incluye NaOH 0.2 N (recién diluido a partir de una solución 10 N) y 1% (p/v) de SDS.

Solución de lisis alcalina III. Su composición incluye 60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de Acido acético glacial y 28.5 ml de H₂O destilada.

Buffer de dilución de DNasa I. Su composición incluye Tris-Cl (pH 7.5) [10 mM], NaCl [150 mM], MgCl₂ [1 mM].

Tris 1M (Por litro). Su composición es de 121.1 g de Tris base en 1000 ml de agua.

TBE 5X y 0.5X (Sambrook et al., 2001). El TBE es usualmente almacenado en una concentración de 5X. para realizar el buffer a esta concentración se requiere de 54g de tris base, 27.5 de acido bórico, 20 mL de 0.5 M EDTA (pH 8.0). La solución concentrada tiene un pH de aproximadamente 8.3. Se debe diluir el buffer solo antes de usarlo.

5.2.1. Reactivos

Ácido fosfotungstico al 2%. Su composición es de 2 mg en 1 ml de agua destilada.

5.3. Bacterias

Las cepas utilizadas en este estudio pertenecen al género *Arthrobacter* y *Brevundimonas* identificadas previamente por nuestro grupo de trabajo (Neri, 2010).

5.4. Mantenimiento de los microorganismos

Las diferentes cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se mantuvieron viables a través de dos métodos. Por una parte se fueron resembrando en sus correspondientes medios sólidos cada 2 semanas y guardándose a 4 °C. Por otra parte, también se mantuvieron a través de la congelación a – 70 °C. Para ello cultivos líquidos de 18 h fueron centrifugados (4.000 x g, 10 minutos) y las células resuspendidas en glicerol 10 % hasta 1/5 del volumen de cultivo inicial. Esta suspensión se guardaba a – 70 °C. Los bacteriófagos se mantenían a 4 °C en forma de stock en medio SM. Además se añadían unas gotas de cloroformo para evitar la contaminación bacteriana.

5.5. Colección de muestras

Los lugares de muestreo fueron cuerpos de aguas negras y suelo, los cuales se resumen en la tabla 3. Las muestras de agua y de suelo se tomaron bajo condiciones asépticas y fueron colectadas usando tubos Falcón de 50 ml.

Tabla 3. Fuentes de muestreo para el aislamiento de bacteriófagos

Fuente	Lugar	# de muestras
Jardín	Áreas verdes en UPIBI, D.F	4
Jardín	Casa habitación Edo. De Méx.	4
Campo de soccer	Ecatepec de Morelos Edo. De Méx.	1
Río de los remedios	D.F.	4
Efluente de aguas negras	Ecatepec de Morelos Edo. De Méx.	4
Bosque de coníferas	Oaxaca	5
Laguna	Zumpango Edo. De Méx.	5

5.6. Tapices bacterianos

Se inocularon 20 ml de medio PYCa líquido con una colonia de la cepa bacteriana, se incubó en agitación continua (200 rpm) por toda la noche a 30 °C. Posteriormente, en un tubo de ensayo estéril se adicionaron 500 µl del cultivo bacteriano, y 3 ml de medio PYCa suave (previamente derretido). Se mezcló perfectamente en vortex, se vertió sobre una caja Petri preparada con medio

PYCa sólido para formar un ligero tapiz bacteriano. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó a 30 °C durante 16 h.

5.7. Aislamiento y purificación de bacteriófagos

En frascos de 250 ml que contenían 20 ml de caldo, peptona-extracto de levadura -calcio (PYCa) se inocularon con 1 ml de la suspensión de las bacterias huésped *Arthrobacter sp.* o *Brevundimonas sp.* y 2 g de la muestra de suelo a granel (EL-Tarabily et al., 1995). Estas fueron incubadas en un agitador (Orbital INO 650V-7) a 200 rpm durante 24 h a 30 °C. Tras la incubación, las suspensiones de cada frasco se centrifugaron durante 20 minutos a 5000 x g (Kameyama, comunicación personal) y el sobrenadante se filtró a través de membranas estériles con un tamaño de poro de 0.22µm (Millipore Corp.) y se recolectaron en tubos estériles. Filtrados de 0,2 ml fueron goteados en cajas Petri con agar PYCa (Sambrook et al., 2001), en las que previamente 0,5 ml de suspensión de los huéspedes (overnight) ya se habían esparcido en cajas Petri con medio PYCa, las cuales se secaron durante 30 minutos en una campana de flujo laminar (CFLV 101, SEV MR) (Thomas et al., 2002). Las cajas Petri fueron incubadas (VWR 1545) a 30 °C durante 24 h y se examinaron para placas de lisis. Placas de lisis individuales fueron retiradas de las placas de agar y se resuspendieron en 1 ml de caldo de PYCa durante 24 horas. Una muestra de este caldo se filtró y se gotearon en cajas Petri con medio PYCa previamente inoculadas con los posibles huéspedes. Placas de lisis individuales que se desarrollaron en estas cajas se retiraron, se resuspendieron, se filtraron y estas suspensiones de fagos purificados fueron almacenadas a 4 °C (Williams et al., 1980).

5.8. Titulación del bacteriófago

La concentración de partículas virales infecciosas en el stock se midió por ensayo en placa como se describe a continuación (Sambrook and Russell, 2001):

Se inoculó en medio PYCa, una sola colonia bacteriana apropiada de *Arthrobacter sp.* o *Brevundimonas sp.* y se dejó crecer toda la noche a 30° C con agitación a 200 rpm. Se fundió agar por calentamiento en un horno de microondas (LG MS-11465QP) por un corto periodo de tiempo. Las alícuotas de agar fundido o agarosa se almacenaron (3 mL para placas de 100 mm) sobre un bloque calefactor o un baño de agua a 47° C para mantener la solución fundida.

Se prepararon diluciones en series de 10 del stock de bacteriófagos y se mezcló suavemente cada dilución en vortex (Genle® -560) tapando el lado superior del tubo. Se repartieron 0.1 mL de un cultivo overnight del paso 1 dentro de una serie de tubos estériles (13 o 17 x 100 mm). Se adicionó 0.1 mL de cada dilución del stock de bacteriófago a un tubo de bacteria y se mezclaron las bacterias y los bacteriófagos por agitación suave en vortex. Se incubó la mezcla por 20 min a 30° C para permitir que las partículas del bacteriófago fuesen adsorbidas a la bacteria. Se removieron los tubos de la incubadora y se dejaron reposar a temperatura ambiente para permitir su enfriamiento. Se adicionó una alícuota del agar fundido al primer tubo. Se mezcló suavemente el contenido del tubo en vortex por 5 segundos y, sin demora, se vació el contenido total del tubo sobre el centro de una placa con agar (Tratando de evitar crear burbujas de aire). Se movió la placa suavemente para asegurar una distribución uniforme de la bacteria y el fago sobre la superficie del agar. Se repitió el procedimiento hasta que el contenido de todos los tubos fueron transferidos a placas separadas y etiquetados. Se colocó nuevamente las tapas de las placas y se permitió que la superficie de la placa con agar se solidificara por 5 minutos a temperatura ambiente. Se Invertieron las placas cerradas y se incubaron a 30° C toda la noche. El título final del stock se determinó aplicando la siguiente fórmula matemática (Douglas and Guinea, 1978):

$$\left(\frac{\text{No. de placas}}{\text{Vol. goteado (ml)}} \right) \times [\text{Ultima dilución con placas}] = \text{ufp / ml}$$

5.9. Microscopía electrónica

Método de la gota (Bozzola and Russell, 1999)

Una gota del stock del fago en medio SM, fue puesta sobre una rejilla de cobre de 400 mesh con Formvar/ carbón y se dejó absorber durante 5 minutos. El exceso del líquido fue retirado utilizando un trozo de papel filtro, y se colocó una gota de ácido fosfotúngstico al 2 % [ajustado a pH 7.0 con KOH 1 N] durante 5 minutos; el exceso de tinte fue extraído con papel filtro. La rejilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente se observó al microscopio electrónico de transmisión (JEM-1010; JEOL) a una tensión de aceleración de 60 kV. Las fotografías fueron tomadas a aumentos reales de 300, 400 y 500 k.

5.10. Identificación genética del bacteriófago aislado

Se llevaron a cabo diversos ensayos para determinar secuencias del bacteriófago y poder obtener información a cerca del mismo. Estas técnicas son descritas a continuación.

5.10.1. Ensayo del contenido del ADN del bacteriófago

Se realizó una solución de trabajo de DNasa pancreática I (1 µg/ml) como se menciona a continuación. Se diluyó 1 µl de la solución de stock de DNasa I con 1 ml del buffer de dilución DNasa I puesto en hielo previamente. Se mezcló la solución invirtiendo el tubo cerrado suavemente varias veces, teniendo cuidado de no formar burbujas ni espuma. La solución se almacenó en hielo hasta su uso. Se transfirieron 10 µl del stock del bacteriófago a un tubo para microcentrifuga. Se agregó 1 µl de la solución de trabajo de DNasa pancreática y la mezcla se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se agregaron 4 µl de una mezcla de colorante 2.5X SDS-EDTA y se incubó el tubo cerrado por 5 minutos a 65 °C. La muestra se cargo en un gel con 0.7% de agarosa (Sambrook and Russell, 2001).

5.10.2. Extracción y purificación del ADN del bacteriófago

Se transfirieron 200 µl del stock del bacteriófago a un tubo para microcentrifuga (HERMLE Z233 MK-2). Se agregaron 20 µl de la solución de trabajo de DNasa pancreática y la mezcla se incubó por 45 minutos a 37 °C. Se agregaron 80 µl de una mezcla de colorante 2.5X SDS-EDTA y se incubó el tubo cerrado por 5 minutos a 65 °C. La muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Se visualizó y se fotografió la banda de ADN utilizando un fotodocumentador con lámpara de UV (GEL LOGIC 440) de longitud de onda larga. Para reducir el deterioro del ADN se irradió el menor tiempo posible. Se pesó un tubo de microcentrifuga para el fragmento de ADN y se registró. Se cortó del gel de agarosa, el fragmento de interés, en un volumen mínimo, usando un bisturí limpio. Se transfirió la porción del gel cortada a un tubo y se determino el peso de este por diferencia. Se agregó –solución de enlace a membrana- en una proporción de 10 µl de solución por cada 10 mg de gel de agarosa. Se mezcló usando vortex y se incubó durante 10 minutos a 60°C. Se centrifugó el tubo brevemente a temperatura ambiente para asegurar que el contenido se quedase en el fondo del tubo. Se colocó una minicolumna SV en un tubo de colección y se transfirió la mezcla gel- solución de enlace a membrana a la minicolumna y se incubó por 1 minuto

a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16,000 x g (14 000 rpm) por 1 minuto. Se removió la minicolumna SV y se desechó el líquido del tubo de colección. Se regresó la minicolumna SV al tubo de colección y se lavó agregando, 700 µl de –solución de lavado de membrana-, a la minicolumna SV. Se centrifugó a 16,000 x g (14 000 rpm) por 1 minuto. Se vació el tubo de colección y se colocó la minicolumna SV. El lavado se repitió con 500 µl de solución de lavado de membrana y se centrifugó durante 5 minutos a 16,000 x g. Se removió la minicolumna y se vació el tubo de colección para re centrifugar durante un minuto a 16,000 x g. Se transfirió la minicolumna SV a un tubo limpio de microcentrifuga. Se aplicaron 50 µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó a 16,000 x g (14 000 rpm). Se desechó la minicolumna y el tubo de microcentrifuga conteniendo el ADN eluido se almacenó a -20 °C.

5.10.3. Digestión del ADN del fago y el plásmido con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción empleadas fueron con *EcoRI* y *BamHI*, cuyas concentraciones se usaron bajo las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante (Fermentas). Los volúmenes de reacción variaron de los 50 a los 100 µL pero siempre manteniendo la relación de concentraciones sugerida por los fabricantes. La cantidad de enzima empleada varió dependiendo del volumen de reacción, pero en su mayoría fue de 0.5 a 2 µl de enzima.

5.10.4. Desfosforilación del plásmido

La reacción de desfosforilación se llevó a cabo utilizando la enzima fosfatasa alcalina SAP (Shrimp alkaline phosphatase). La cantidad de enzima empleada fue de 1 U y los volúmenes para la reacción de 10 µl. Las condiciones para las reacciones fueron 30 minutos a 37°C y 15 minutos a 65°C para desactivar a la enzima.

5.10.5. Ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se realizaron con la enzima T4 DNA Ligasa de Fermentas. Los volúmenes de trabajo fueron de 25 µL y se siguieron las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. Los tubos de reacción fueron incubados de 16 a 18 h a 4°C.

5.10.6. Preparación de las Células Calcio-Competentes

De una caja Petri con colonias aisladas de la cepa *E. coli* (DH5 α), se picó una sola colonia y se sembró en 5 ml de medio LB y se incubó toda la noche a 200 rpm a 37 °C. Se transfirió 1 ml del inóculo a 50 ml de medio LB, el cuál fue agitado a 200 rpm a 37 °C durante 5 h. Se transfirió el matraz a un recipiente con hielo y se dejó incubar durante 15 min. Se transfirió el cultivo a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4°C Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 ml de una solución fría y estéril de CaCl₂ [0.1 M] mediante pipeteo suave. Se dejó en hielo 15 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 ml de una solución fría y estéril de CaCl₂ [0.1 M] mediante pipeteo suave. Se dejó en hielo 15 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 7.5 ml de una solución fría y estéril de CaCl₂ [0.1 M] mediante pipeteo suave. Se dejó en hielo 15 min y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 ml de una solución fría de CaCl₂ [0.1 M]/glicerol al 15% Se congelaron alícuotas en tubos de microcentrifuga estériles a -70 °C.

5.10.7. Transformación de *E. coli* DH5 α

Alícuotas de 100 μ L de células mantenidas en congelación se mezclaron con 4 μ L de DNA plasmídico y se incubaron en hielo por 5 min. Transcurrido este tiempo se inocularon por extensión con varilla en cajas Petri preincubadas a 37°C con ampicilina. Posteriormente se adicionaron 50 μ l de IPTG 0.1 M y 70 μ l de X-gal (20 mg/ml). Las cajas Petri se incubaron a 37°C hasta que el crecimiento de colonias fue el idóneo para su uso.

5.10.8. Extracción del plásmido (Lisis Alcalina)

5.10.8.1. Preparación de las células

Se inocularon 2 ml de medio LB con ampicilina, con una colonia de bacteria transformada, y se incubaron toda la noche a 37°C y 200 rpm. Se transfirieron 1.5 ml del cultivo a un tubo para microcentrifuga. Se centrifugó a 14000 rpm durante 30 s a 4 °C. La porción no utilizada del cultivo se almacenó a 4°C. Cuando la centrifugación se completó, se removió el medio por aspiración

suave dejando el pellet tan seco como fue posible. Se utilizó una bomba de vacío y una punta para micropipeta.

5.10.8.2. Lisis de las células

Se resuspendió el pellet bacterial en 100 µl de la solución de lisis alcalina I helada, utilizando vortex. Se agregaron 200 µl de la solución de lisis alcalina II recién preparada a cada suspensión bacterial. Se cerró el tubo herméticamente y se invirtió cinco veces rápidamente para mezclar el contenido. Se almacenó en hielo. Se agregaron 200 µl de la solución de lisis alcalina III helada. Se cerró el tubo y se dispersó la solución de lisis alcalina III a través del lisado bacterial viscoso invirtiendo el tubo varias veces. Se almacenó el tubo en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó el lisado bacterial a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C en microcentrifuga. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio.

5.10.8.3. Recuperación del ADN plasmidico

Se precipitaron los ácidos nucleicos del sobrenadante utilizando dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcló la solución utilizando el vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se colectaron los ácidos nucleicos precipitados por centrifugación a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante por aspiración suave. Se mantuvo el tubo en posición invertida durante 10 minutos, sobre papel toalla, para drenar todo el fluido. Las gotas en las paredes del tubo se removieron, utilizando una punta de micropipeta desechable. Se agregó 1 ml de etanol al 70% al pellet. Con el tubo ya cerrado se invirtió varias veces. El ADN se recuperó por centrifugación a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante por aspiración suave, al igual que las gotas de etanol en las paredes del tubo. Se dejó el tubo con la tapa abierta a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la evaporación de todo el etanol. Los ácidos nucleicos se disolvieron en 50 µl de TE (pH 8.0), el cual contenía 20 µg/ml de RNasa libre de DNasa. La solución se mezcló unos pocos segundos utilizando vortex y se almacenó a -20°C.

5.10.9. Secuenciación del inserto

El plásmido con el inserto ya extraído y purificado se envió a la compañía MACROGEN en Seúl, Korea. Las secuencias se recibieron en formato digital (.ab1) los cuales se analizaron y editaron

con los programas VECTOR y MEGA5. Las secuencias fueron traducidas en sus seis marcos de lectura a proteína. Posteriormente fueron comparadas en “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés, NCBI, disponible en red: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.11. Biocontrol

Las pruebas para el control biológico se realizaron con las bacterias en un medio con ácido tereftálico. Tres matraces con capacidad de 500 ml que contenían 95 ml de ácido tereftálico se inocularon con 5 ml con un cultivo de bacterias almacenadas en glicerol al 10%, y se incubaron a 30°C con agitación (200 rpm). Se tomaron dos muestras cada día y se midió la absorbancia a 570 nm. Después de 6 días de incubación, el cultivo de 100 ml se inoculó con 2 ml de la suspensión del bacteriófago y se tomaron dos muestras los siguientes dos días para medir absorbancia y observar el efecto del fago sobre la bacteria.

6. RESULTADOS

6.1. Aislamiento de los Bacteriófagos

6.1.1. *Arthrobacter sp.*

Para poder realizar el aislamiento de los fagos que infectan *Arthrobacter sp.* se tomaron muestras de diversas fuentes las cuales están listadas en la tabla 3 siguiendo la metodología descrita en en la sección 5.5. Los resultados obtenidos para cada muestra de suelo se observan en la tabla 4. Una muestra de suelo originaria del Estado de México en Ecatepec de Morelos produjo una zona clara, conocidas como placas de lisis o calvas, sobre *Arthrobacter sp.* (Figura 2).

La placa de lisis única sobre el césped de *Arthrobacter sp.* fue retirada del agar con ayuda de una pipeta Pasteur estéril para preparar un stock con un título alto sobre la misma cepa por la técnica de la doble capa (“overlay”) (Figura 2).

Tabla 4. Aislamiento de bacteriófagos de diversas fuentes para la cepa *Arthrobacter sp.*

Muestra	Resultado (calvas)	Resultado (calvas generadas a partir de las primeras)
Jardín (áreas verdes en UPIBI, D.F.)	-	NA
Jardín (casa habitación)	-	NA
Campo de soccer(Ecatepec de Morelos)	+	+
Río de los remedios (D.F.)	+	-
Efluente de aguas negras (Ecatepec de Morelos)	+	-

+ positivo; - negativo; NA No Aplica

En el caso de la muestra del Río de los Remedios se lograron aislar placas, aunque en la mayoría de los casos una sola fue encontrada, sin embargo, esta placa al ser retirada y re suspendida en medio PYCa para posteriormente gotearlo en nuevos tapices de bacterias en fase exponencial,

no formó nuevas calvas. Estos resultados indican que los fagos están probablemente presentes, sólo en un número limitado de concentración en este tipo de fuentes (Brown et al., 1978).

El hecho de que los fagos no se detectaran en algunos extractos de suelo concentrados puede reflejar una gran capacidad de retención viral del suelo en comparación con la de agua de río y aguas residuales. El aparente bajo número de fagos reflejado en las pocas placas de lisis encontradas, puede estar correlacionado con la adsorción del fago a los materiales del suelo (Casida and Liu, 1974). El grado de Adsorción de virus a suelos es generalmente más del 90 % para todos los virus (Kimura et al., 2008). Además Chattopadhy y Puls (2000) sugieren que los virus se adsorben a arcillas coloidales usando fuerzas de Van der Waals. Los fagos se adsorbían a partículas de caolinita y fueron observados usando TEM (Kimura et al., 2008, Chattopadhyay and Puls, 2000).

Una variedad de suelos, factores virales y ambientales afectan la adsorción de virus a los suelos, tales como el tipo de suelo, la capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica disuelta y asociada al suelo, el pH, la fuerza iónica y el tipo de virus. Estos parámetros interactúan en la adsorción viral sobre suelos, debido a que los virus están, en general, cargados negativamente por encima de su punto isoeléctrico, mientras que los suelos tienen sitios cargados negativamente y positivamente, además de sitios hidrofóbicos. El pH influye en la carga de ambos, del virus y del suelo, y la fuerza iónica y sus constituyentes determinan la fuerza de enlace entre ellos. En contraste, la materia orgánica (disuelta y asociada al suelo), debilita el enlace electrostático del virus al suelo. Los suelos, especialmente los que están ricos en materia orgánica, son en general adsorbentes débiles comparados con arcillas minerales (Vettori et al., 1999, Zhuang and Jin, 2003a, Zhuang and Jin, 2003b).

Una vez tratados con cloroformo, se observó que los fagos aislados infectaron normalmente, demostrando así que no son sensibles a cloroformo. Estos resultados permiten sugerir que este fago no pertenece a las familias plasmaviridae, corticoviridae y cystoviridae, las cuales poseen envoltura lipídica y son sensibles a cloroformo (Cann, 2005, Mural and Friedman, 1974).

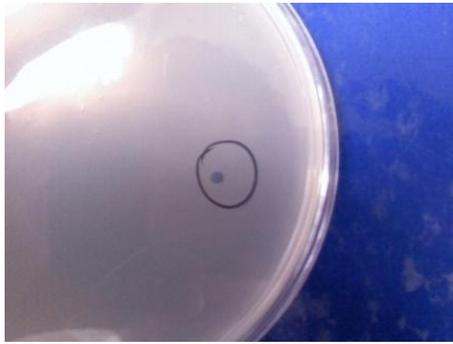


Figura 2. Placa de lisis formada en un césped de *Arthrobacter sp.*

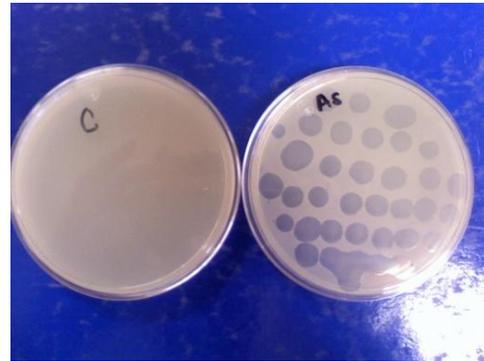


Figura 3. Placas de lisis formadas en un césped de *Arthrobacter sp.* después de dos pases consecutivos

6.1.2. *Brevundimonassp.*

Los bacteriófagos que infectan *Brevundimonas sp.* fueron buscados en algunas fuentes dónde se buscó también a los fagos para *Arthrobacter sp.*, y están listadas en la tabla 3. Además se probaron dos fuentes nuevas, Bosque de coníferas (Oaxaca) y Laguna de Zumpango en las cuales los resultados no fueron satisfactorios, probando ser también fuentes limitadas en estos virus.

La infección simultánea por diferentes virus bacterianos resulta en muchos casos en el crecimiento de uno de ellos únicamente, como por ejemplo está la coinfección de *E. coli* por T2 y T1 que resulta en la propagación únicamente del T2. Algunos virus muestran que la exclusión por superinfección está acompañada por la alteración de carbohidratos presentes en la membrana, lo cual evita la inyección del ADN de virus después de adsorbido (Wagner et al., 1983). El mecanismo de exclusión por superinfección se puede llevar a cabo por diferentes métodos, como lo es la modificación de la membrana celular (antígeno O), sin embargo, la intensidad con la cual puede alterarse ésta membrana depende del tipo de fago (Susskind and Botstein, 1978).

Existen diversos factores que afectan la inactivación y sobrevivencia de los virus en el suelos, además de su inefectividad al huésped. Entre estos están: *la temperatura*, que probablemente afecte las actividades enzimáticas, tales como la proteinasa, bajo condiciones altas de temperatura, lo cual resulte en una inactivación más rápida y descomposición de los virus. El *pH*: los virus se consideran materiales coloidales hidrofílicos y su adsorción depende grandemente de

las propiedades electrostáticas de la superficie del suelo a la que este factor grandemente contribuye. El tipo de suelo y su contenido de materia orgánica: se ha reportado que la sobrevivencia de los fagos se debe a la asociación con materiales coloidales y particulados, esto los protege contra la inactivación por luz UV ya que estos materiales sirven como un escudo para los virus.

Una de las razones de la inmunidad de las células huésped a la infección del fago probablemente resulte de los cambios en las propiedades de la superficie de la célula huésped. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* W23 mostró una falta de ácidos teicoicos cuando creció bajo limitaciones de condiciones limitantes de fosfato y no adsorbió al fago (Kimura et al., 2008).

Aunque la infección parezca un evento sencillo, y se espera que la complejidad de la membrana en las células gram negativas provee una mayor variedad de receptores para los fagos (Hemphill and Whiteley, 1975), hay varios factores o barreras intracelulares como lo son las restricciones específicas del huésped, la membrana externa de carga negativa, un periplasma con nucleasas y una membrana citoplasmática de carácter hidrofóbico constituyen un sistema de defensa para la bacteria hacia las moléculas de ADN exógeno (Lomovskaya et al., 1980).

6.2. Análisis de contenido de ADN

Se realizó la técnica descrita en la sección 5.9 en metodología para inferir si las calvas presentadas en los céspedes de la célula indicadora eran debidas a la presencia de un bacteriófago. En este análisis se utilizó DNasa Pancreática para degradar ADN bacteriano ya que llegan a existir restos de estos en los stocks o lisados de cultivos líquidos. El ADN viral se libera utilizando SDS y EDTA con calentamiento, ya que este proceso rompe la cubierta del fago. La muestra se cargó en un gel de agarosa el cual se muestra en la figura 4. Los carriles 2 y 4 representan el ADN del bacteriófago ya que solo estas muestras fueron sometidas al procedimiento descrito en esta sección.

Tabla 5. Aislamiento de bacteriófagos de diversas fuentes para la cepa *Brevundimonas sp.*

Muestra	Resultado (calvas)	Resultado (calvas generadas a partir de las primeras)
Jardín (áreas verdes en UPIBI, D.F.)	-	NA
Jardín (casa habitación)	-	NA
Campo de soccer(Ecatepec de Morelos)	-	NA
Río de los remedios (D.F.)	+	-
Efluente de aguas negras (Ecatepec de Morelos)	+	-
Bosque de coníferas (Oaxaca)	-	NA
Laguna de Zumpango	-	NA

+ positivo; - negativo; NA No Aplica

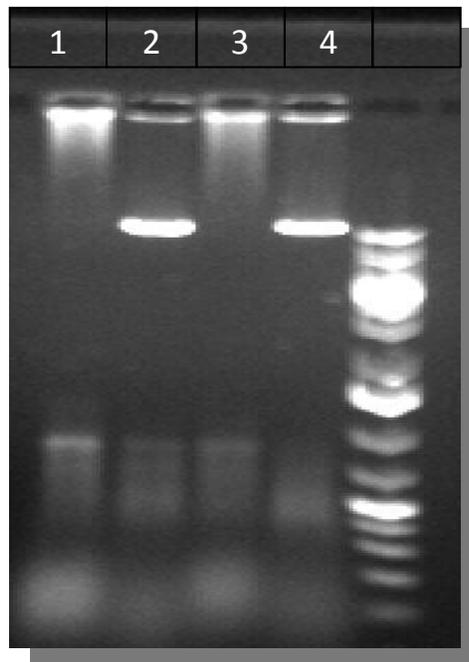


Figura 4. Ensayo del contenido de ADN del bacteriófago que infecta la cepa *Arthrobacter sp.* En el Carril 1 y 3 no se rompe la capsida, y en el carril 2 y 4 se rompe la capsida liberando el material genético del bacteriófago. El carril 5 representa el marcador de peso molecular.

6.3. Microscopía electrónica

A pesar de que el fago forma placas que fueron bastante uniformes en tamaño y apariencia (figura 6), fagos de diferentes grupos líticos muestran considerable diversidad en la morfología de la placa, y estas diferencias en la morfología de la placa son de gran ayuda para distinguir a los bacteriófagos. Sin embargo, esto no es suficiente para poder asegurar que estas placas de lisis son causadas por un bacteriófago. Las observaciones con el microscopio electrónico revelaron una cabeza hexagonal de 60 nm de ancho y 63 nm de largo, acoplado a una vaina (cola) de 110 nm de longitud y 9 nm de ancho. Este fago presenta una estructura entre la capsida y la cola parecida a un cuello de 34 nm de ancho. Una peculiar estructura al final de la cola parece ser evidencia de una placa basal. No se observaron fibras al final de la cola o la placa basal (Figura 5). Este fago encontrado es similar en tamaño y morfología al aislado por Einck (Einck et al., 1973), al estudiado por microscopía electrónica por Daems (Daems, 1963) y aquellos aislados por Trautwetter ((Trautwetter and Blanco, 1988).

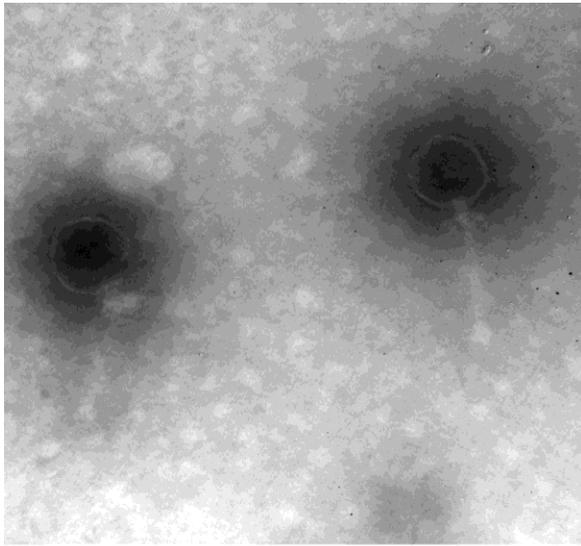
Todos los fagos que infectan las especies de *Arthrobacter* descritos hasta ahora pertenecen a la familia *Siphoviridae* (una característica de esta es la presencia de cola no contráctil) (Marrec et al., 1994). Esta característica de contener una placa basal además de poseer una cola larga puede situar a este fago en la familia *Siphoviridae* (Ackermann, 2007).

La concentración de los fagos en Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/ml) fue determinada mediante el conteo de placas. El resultado de un ensayo de placa realizado con la bacteria *Arthrobacter* sp. se obtuvo de dos diluciones de los fagos, 10^{-7} y 10^{-8} (Tabla 6). El número de placas multiplicado por el inverso de la dilución y se dividió entre la cantidad de dilución añadida a la caja Petri.

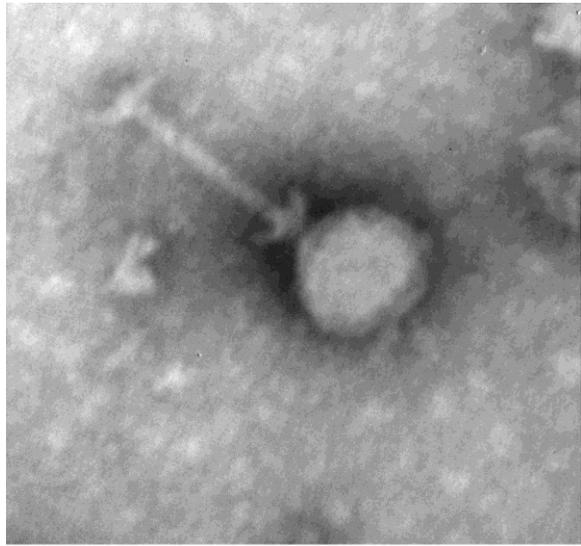
Tabla 6 Concentración del fago

Dilución	UFP/ml
10^{-7}	6×10^9
10^{-8}	7.1×10^9

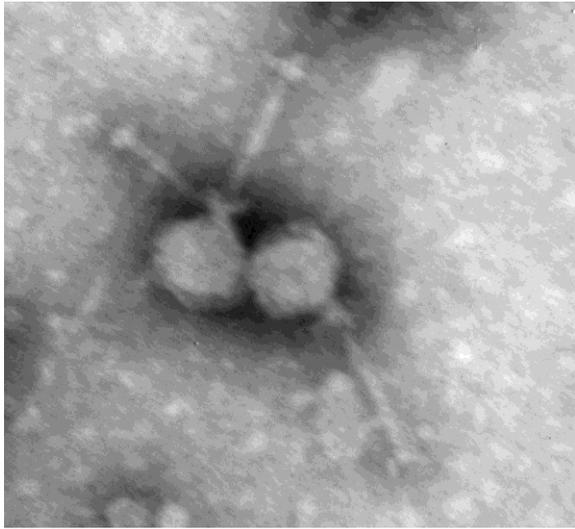
El promedio de las dos diluciones nos arroja una concentración del stock de 6.55×10^9 UFP/ml.



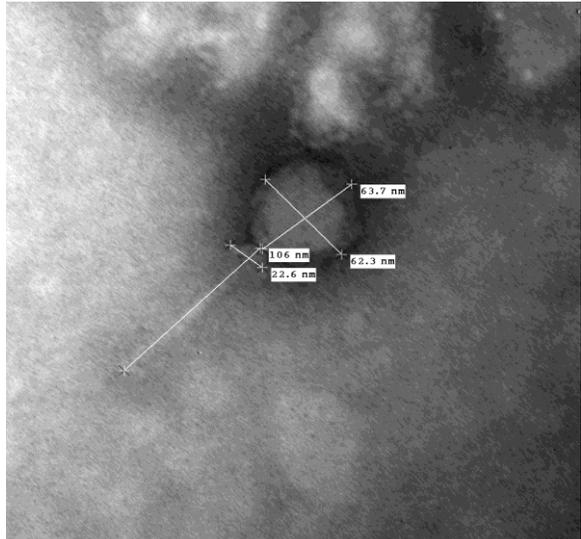
1AC X300K.tif
FAGOS
Print Mag: 118000x @ 51 mm
13:21 08/17/11
TEM Mode: Imaging
Microscopist: MA. ESTHER SANCHEZ ESPINDOLA
100 nm
HV=60kV
Direct Mag: 300000x
AMT Camera System



13 AC 500K.tif
Print Mag: 196000x @ 51 mm
20:58 09/08/11
TEM Mode: Imaging
20 nm
HV=60kV
Direct Mag: 500000x
AMT Camera System



12AC 400K.tif
Print Mag: 785000x @ 51 mm
20:55 09/08/11
TEM Mode: Imaging
100 nm
HV=60kV
Direct Mag: 2000000x
AMT Camera System



4AC M 400K.tif
Print Mag: 157000x @ 51 mm
20:21 09/08/11
TEM Mode: Imaging
20 nm
HV=60kV
Direct Mag: 400000x
AMT Camera System

Figura 5. Micrografías electrónicas del bacteriófago que infecta la cepa *Arthrobacter* sp.

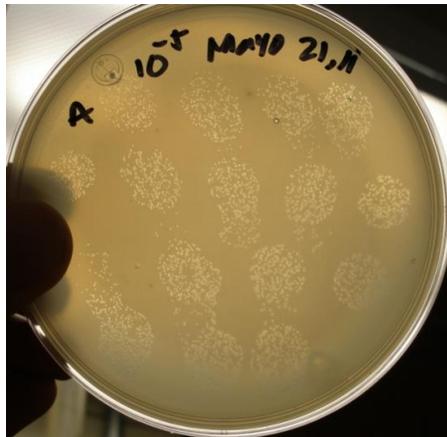


Figura 6. Placas de lisis producidas por el fago que infecta *Arthrobacter* sp. Dilución del Stock: 10^{-5}

6.4. Identificación genética del bacteriófago aislado

6.4.1. Extracción y purificación del ADN del fago

Para poder realizar la extracción del ADN del fago se tomaron alícuotas del stock, las cuales se trataron de acuerdo a lo descrito en la metodología en la sección 5.10.2, y en la figura 7 se observa el gel obtenido. La figura 8 muestra la purificación del ADN del fago. El material genético del bacteriófago se observa a un nivel de banda de 10 kb. Este resultado sirvió para obtener ADN viral libre, para la posterior digestión con las enzimas de restricción.

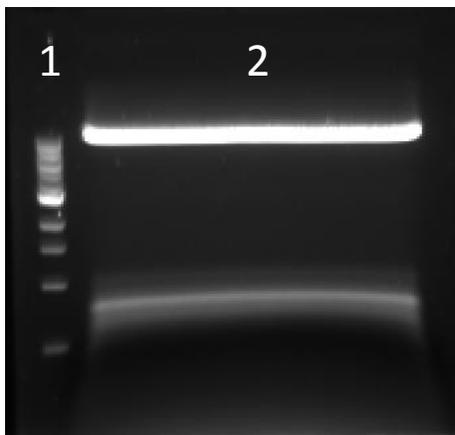


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la extracción. En carril 1: marcador de peso molecular; carril 2: ADN del bacteriófago.

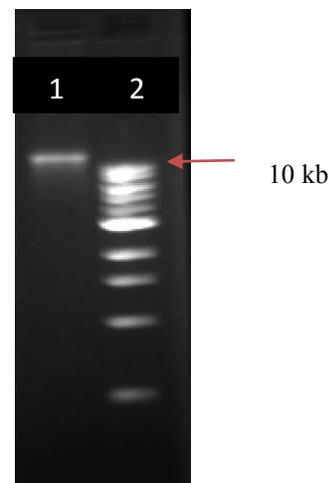


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación del ADN viral. Carril 1, muestra con ADN; carril 2 marcador de peso molecular

6.4.2. Digestión del ADN del fago y el plásmido con enzimas de restricción.

Con el fin de obtener información genómica del lo bacteriófago se le realizó un análisis de restricción. El ADN del bacteriófago y el ADN plasmidico fueron cortados con las enzimas restricción EcoRI y BamHI descritos en la sección 5.10.3 para obtener los fragmentos de diversos tamaños los cuales se observan como un patrón de bandas en la figura 9. Este patrón podría sugerir en un inicio, si se suman los pesos de cada banda, un peso aproximado del tamaño del ADN del bacteriófago.

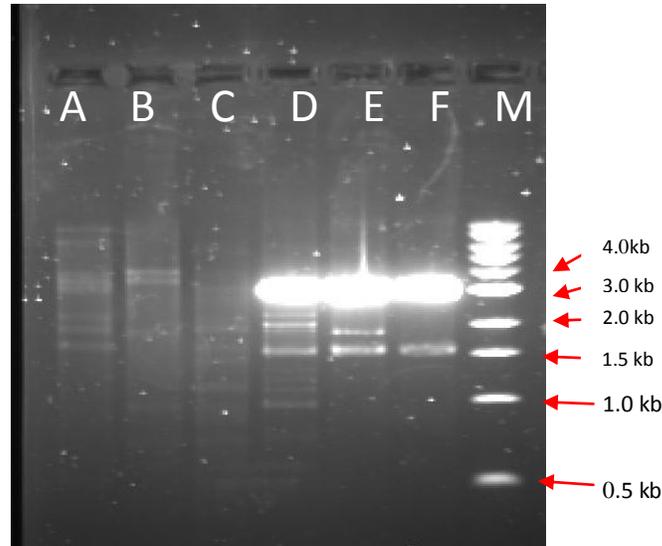


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación de las digestiones con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. A) ADN del bacteriofago digerido con BamHI, B) ADN del bacteriofago digerido con EcoRI, C) ADN del bacteriofago digerido con BamHI y EcoRI, D) pBlueScript KS(-) II digerido con BamHI y EcoRI, E) pBlueScript KS(-) II digerido con EcoRI, F) pBlueScript KS(-) II digerido con BamHI, M) Marcador de peso molecular

6.4.3. Transformación de *E. coli* DH5 α

Los insertos obtenidos de la digestión con las endonucleasas fueron ligados al vector como lo describe la sección 5.10.5. Posteriormente fueron introducidos a células quimio-competentes como lo describen la secciones 5.10.6 y 5.10.7. Se obtuvieron 12 clonas como resultado de la inserción de los distintos fragmentos genómicos del fago en el plásmido pBlueScript KS(-) II, las cuales fueron seleccionadas en base a que colonias que llevan plásmidos de tipo silvestre o no recombinantes, contienen activa la β -galactosidasa. Estas colonias son de color azul pálido en el centro y de un color azul denso en la periferia y aquellas colonias que llevan plásmidos recombinantes no contienen activa la β -galactosidasa. Estas colonias son de color blanco cremoso o como cascara de huevo azul, algunas veces con un punto azul pálido en el centro. La inserción

al plásmido de doble cadena sugiere que el genoma de este bacteriófago presente una doble hebra.

6.4.4. Extracción del plásmido

Para poder realizar la extracción del plásmido ya con el inserto, las colonias transformadas fueron transferidas a medio líquido conforme a lo descrito en la sección 5.10.8. Se purificaron y se corrieron en gel de agarosa. En la figura 10 se observa la fotografía del gel. El plásmido pBlueScript KS(-) II, tiene un un peso teórico de aproximadamente 2.9 kbp, en el carril P/E de la figura 10 la banda se encuentra casi a la misma altura que la banda de 3 kb del marcador. El fragmento que se cortó corresponde solo al sitio EcoRI y corre a la misma velocidad ya que el plásmido esta linealizado. El carril P que corresponde al plásmido sin cortar y este al presentar un estado circularizado corre más rápido en el gel y lo encontramos por encima de las 2 kb. Las clonas 11 y 12 que están representadas en los carriles con los mismos números, sugieren la presencia de un inserto en el plásmido.

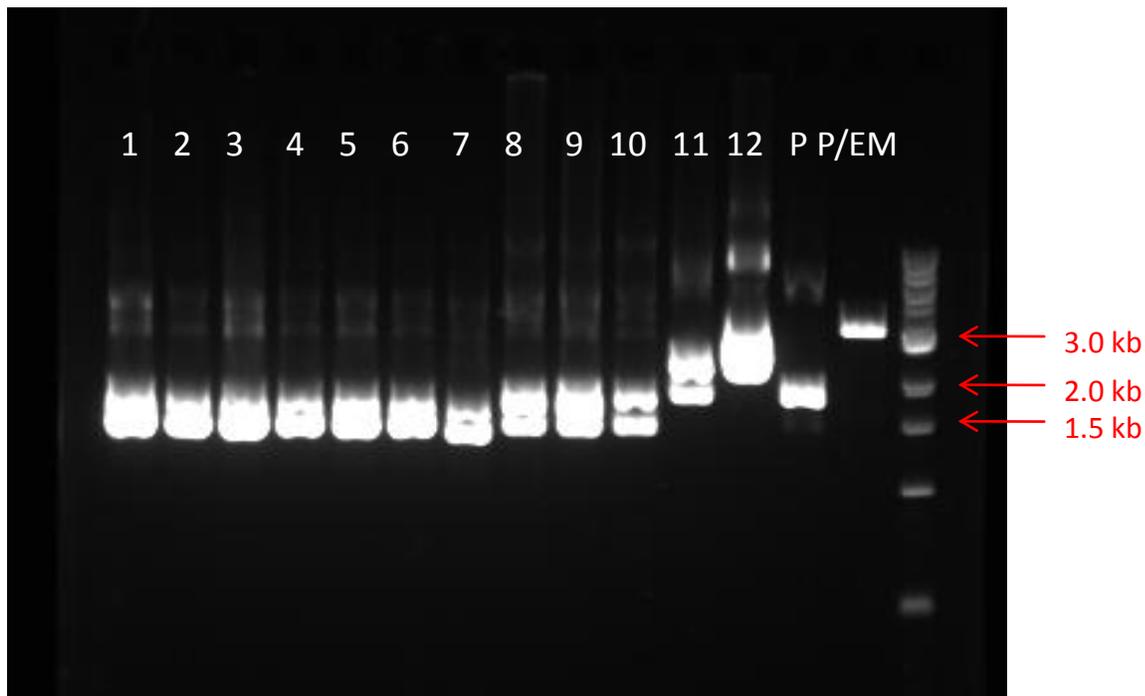


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la purificación de los plásmidos con insertos extraídos de la clona 1 a la 12. P: plásmido pBlueScript KS(-) II sin cortar ; P/E: plásmido cortado con EcoRI; M: Marcador de peso molecular

6.4.5. Secuenciación del inserto

Los plásmidos con el inserto fueron secuenciados con los primers M13F y M13R para obtener fragmentos complementarios para que esto permitiera un mejor análisis de los mismos.

Estas secuencias de ADN fueron traducidas a proteínas en sus seis marcos de lectura, las secuencias proteicas fueron sometidas al alineamiento proteína-proteína con la base de datos en el BLAST, indicando en el mayor de los casos que no se encontraba similitud significativa a alguna proteína.

La comparación de las secuencias de las proteínas codificadas por los 6 diferentes marcos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) con las existentes en el banco de datos mostró que dos de ellas presentan una similitud con proteínas. Los resultados se muestran a continuación:

Las Secuencias 347F y 359R (clona 12) que pertenecen al inserto y al vector, cortados con EcoRI y BamHI al mismo tiempo, arrojaron la siguiente secuencia de aminoácidos:

IWTGFVGLVQGIVAGFVGLSEAFQGAVNTAVSVWSGLGGFFSGLWAEIVNGVSTAVGSIGGFFE
GIPGKIQGFFAGAGSWLYGFGQNIQGLGDGVASMAGTIGNFFLNALPDFIREPFKQALGIASSKV
FAGYGQNI GEGVLVGVGRMQSRIDDRMANLVTVPDFAMTSGFGGSASGSGTRTGSGGGSIDDLI
RAIREQRPIQVNGAPGMDEETLARATAEQLLWRG*

Con similitud a proteínas enlistadas en la tabla 7.

Tabla 7. Proteínas que tiene similitud con las secuencias 347F y 359R clonadas en el plásmido pBlueScript KS(-) II

Descripción de la proteína	Maxima identidad (%)
phage tape measure protein [Gordonia phage GTE7] >gb AER26562.1 phage tape measure protein [Gordonia phage GTE7]	36
tape measure protein [Rhodococcus phage ReqiDocB7]	41

Las 20 secuencias restantes muestran poca o ninguna similitud con las secuencias disponibles en las bases de datos de BLAST y una similitud de más del 95% con plásmidos que incluyen el mismo pBlueScript KS(-) II utilizado en esta tesis. (www.ncbi.nlm.nih.gov). Esto podría ser indicativo de que se tiene un nuevo fago ya que no se encuentran reportadas estas secuencias.

Si bien las secuencias obtenidas no se parecen en su totalidad a las que podemos encontrar en la base de datos, y a pesar de que la relación entre los virus eucariotas y el fago aislado es poca, teniendo en cuenta que infectan células de dominio diferente y que el fago aislado no poseen membrana, estos resultados podrían sugerir que los fragmentos clonados y secuenciados pueden contener genes que pertenecen al fago encontrado.

Aunque las secuencias obtenidas del fago, no permiten obtener algún tipo de información que nos permita conocer más acerca del mismo, éstas pueden ser utilizadas en la elaboración de iniciadores (“primers”) específicos que permitan una amplificación más extendida del genoma de este fago (“primer walking”), y poder realizar un análisis con otras regiones del mismo genoma.

6.5. Biocontrol

Para poder determinar el efecto del bacteriófago sobre la cepa degradadora de ácido tereftálico, se realizó la cinética como se describe en la sección de 5.12 de metodología. El resultado de este experimento se puede observar en la figura 10.

Algunos fagos han revelado la dependencia de cationes divalentes para una infectividad óptima (principalmente Ca^{+2} y en algunos casos Mg^{+2}). Muchos fagos requieren de estos iones en un intervalo de concentración de 1 a 10 mM para el acoplamiento y el crecimiento intracelular, y es buena idea cuando se trabaja con mezclas de fagos o fagos no caracterizados incluir de 1-2 mM en todo el medio (Van Twest and Kropinski, 2009). Esto podría explicar la causa por la cual el fago no infectó en el medio AT. En cuanto a la composición del medio AT se debe decir que presenta una concentración de Mg^{+2} de 0.49 mM, la cual no es suficiente para alcanzar aquella requerida para la adsorción. Tal es el caso del incremento en ufp de fagos, cuando $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ fue agregado en el medio usado, lo cual confirmó los descubrimientos de Adams (1959) quien concluyó que los cationes divalentes tales como el Ca^{++} son requeridos para la adsorción de los fagos a los receptores (El-Tarabily *et. al.*, 1995).

Biocontrol en ácido tereftálico

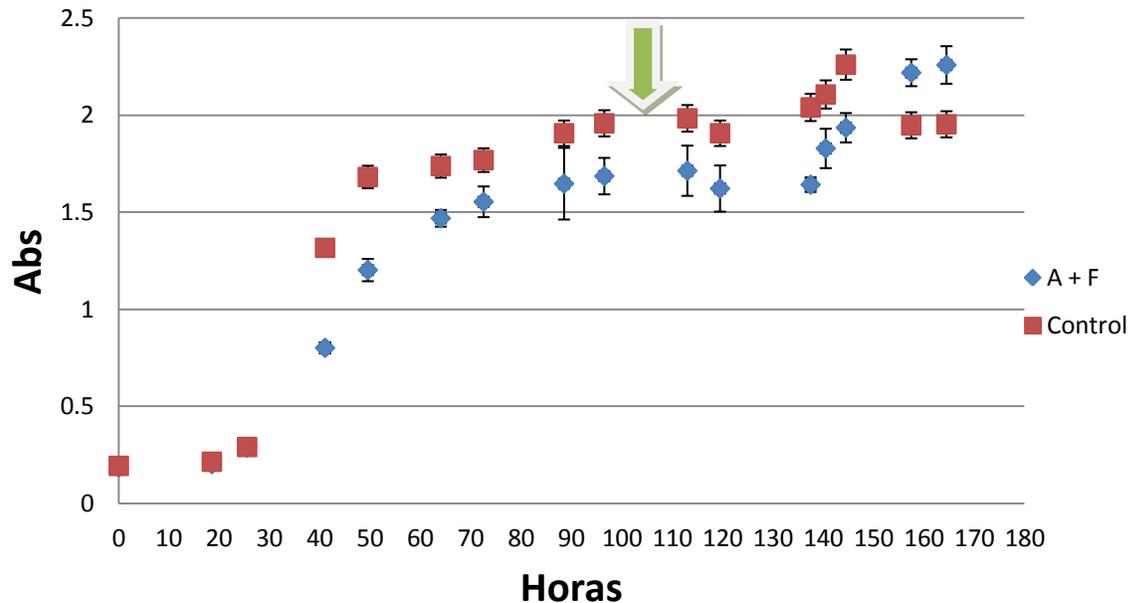


Figura 10. Cinética de *Arthrobacter sp.* en medio con ácido tereftálico. A+F : Cinética en la cuál se agregaron 2 ml del stock del bacteriófago a las 113 (la flecha indica el momento de la inoculación) . C: Cinética control, sin inóculo del bacteriófago.

Otro factor importante en el proceso de infección es la Multiplicidad de infección (MOI), es decir, el número de fagos que incorpora una célula diana es un proceso estadístico. Algunas células pueden absorber más de una partícula viral mientras que otras pueden no absorber ninguna. Se utilizan altos MOI cuando se requiere que toda la población de células este infectada (Adams, 1959).

Otro factor importante puede ser la fase de crecimiento en la cual se encuentre la célula. En un estudio se encontró que el fago de *Pseudomonas aeruginosa* BLB, no fue incapaz de multiplicarse en la fase estacionaria de su huésped (Schrader et al., 1997). Probablemente debido a la adsorción a células en proceso de muerte.

Ningún estudio se ha realizado acerca de la toxicidad de metales pesados y contaminantes ácidos para los virus. Ya que los virus son considerados inertes en un estado libre, el mecanismo sería un interesante tema para futuros estudios (Kimura et al., 2008).

7. CONCLUSIONES

Se aisló un bacteriófago del suelo con capacidad específica de infectar a la bacteria degradadora de ácido tereftálico *Arthrobacter sp.*

No fue posible aislar un fago con capacidad de infectar la cepa *Brevundimonas sp.*

En base a las imágenes obtenidas de TEM, el fago aislado expone un cápsido con cabeza hexagonal y con cola. Este fago muestra tener una cola larga y unas estructuras parecidas a las de plataforma basal que son similares a las descritas por la familia *siphoviridae* del orden de los *caudovirales*.

Los análisis realizados con la secuencias de proteínas del fago, mostraron similitud con proteínas virales de los fagos que infectan los géneros *Gordonia* y *Rhodococcus*. Sin embargo esta similitud es demasiado baja, lo cual podría sugerir el aislamiento de un nuevo fago para la cepa *Arthrobacter sp.*

No fue posible determinar la capacidad del fago de infectar *Arthrobacter sp* creciendo sobre ácido tereftálico.

8. REFERENCIAS

- ACKERMANN, H. W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*, 152, 227-43.
- ADAMS, M. H. 1959. *Bacteriophages*, Interscience Publishers.
- ALBERTS, B. 1996. *Biología molecular de la célula*, Omega.
- ASHELFORD, K. E., DAY, M. J. & FRY, J. C. 2003. Elevated Abundance of Bacteriophage Infecting Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 285-289.
- BAZINET, C. & KING, J. 1985. The DNA translocating vertex of dsDNA bacteriophage. *Annu Rev Microbiol*, 39, 109-29.
- BIRGE, E. A. 2006. *Bacterial and bacteriophage genetics*, Springer.
- BOZZOLA, J. J. & RUSSELL, L. D. 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*, Jones and Bartlett.
- BROWN, D. R., HOLT, J. G. & PATTEE, P. A. 1978. Isolation and characterization of Arthrobacter bacteriophages and their application to phage typing of soil arthrobacters. *Appl Environ Microbiol*, 35, 185-91.
- BRUSSOW, H. 2005. Phage therapy: the Escherichia coli experience. *Microbiology*, 151, 2133-40.
- CALENDAR, R. 2006. *The bacteriophages*, Oxford University Press.
- CANN, A. J. 2005. *Principles of molecular virology*, Elsevier Academic Press.
- CASIDA, L. E. & LIU, K. C. 1974. Arthrobacter globiformis and Its Bacteriophage in Soil. *Appl Microbiol*, 28, 951-9.
- CASTREJÓN, A., BARRIOS, J. A., JIMENEZ, B., MAYA, C., RODRÍGUEZ, A. & GONZÁLEZ, A. 2000. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LODOS RESIDUALES DE MÉXICO. *UNAM*, 1, 1-14.
- CONN, H. J. 1948. The most abundant groups of bacteria in soil. *Bacteriol Rev*, 12, 257-73.
- CHATTOPADHYAY, S. & PULS, R. W. 2000. Forces dictating colloidal interactions between viruses and soil. *Chemosphere*, 41, 1279-86.
- DAEMS, W. T. 1963. A preliminary report on the fine structure of a bacteriophage of Arthrobacter polychromogenes Schippers-Lammertse, Muysers et Klatser-Oedekerck. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 29, 16-21.
- DOUGLAS, J. & GUINEA, J. 1978. *Bacteriófagos*, Omega.
- DREISEIKELMANN, B. 1994. Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev*, 58, 293-316.
- EINCK, K. H., PATTEE, P. A., HOLT, J. G., HAGEDORN, C., MILLER, J. A. & BERRYHILL, D. L. 1973. Isolation and characterization of a bacteriophage of Arthrobacter globiformis. *J Virol*, 12, 1031-3.
- EL-TARABILY, K. A., KURTBOKE, D. I. & HARDY, G. E. S. J. 1995. Partial characterization of Streptomyces phages from the soils of Jarrah Forest in Western Australia. *Actinomycetes VI*.
- FUHRMAN, J. A. & SCHWALBACH, M. 2003. Viral Influence on Aquatic Bacterial Communities. *The Biological Bulletin*, 204, 192-195.
- GARCIA, P., MARTINEZ, B., OBESO, J. M. & RODRIGUEZ, A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol*, 47, 479-85.
- GARCÍA, P., RODRÍGUEZ, L., RODRÍGUEZ, A. & MARTÍNEZ, B. 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 373-382.
- HEMPHILL, H. E. & WHITELEY, H. R. 1975. Bacteriophages of Bacillus subtilis. *Bacteriol Rev*, 39, 257-315.
- JIMÉNEZ, B. E. 2002. *La contaminación ambiental en México*, Colegio de Ingenieros Ambientales de México.

- JONES, D. & KEDDIE, R. 2006. The Genus *Arthrobacter* The Prokaryotes. In: DWORKIN, M., FALKOW, S., ROSENBERG, E., SCHLEIFER, K.-H. & STACKEBRANDT, E. (eds.). Springer New York.
- JUNESON, C., WARD, O. P. & SINGH, A. 2002. Biodegradation of dimethyl phthalate with high removal rates in a packed-bed reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 7-10.
- KIMURA, M., JIA, Z.-J., NAKAYAMA, N. & ASAKAWA, S. 2008. Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. *Soil Science & Plant Nutrition*, 54, 1-32.
- KLEEREBEZEM, R., BECKERS, J., HULSHOFF POL, L. W. & LETTINGA, G. 2005. High rate treatment of terephthalic acid production wastewater in a two-stage anaerobic bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 91, 169-79.
- KUTATELADZE, M. & ADAMIA, R. 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol*, 28, 591-5.
- LE MARREC, C., MOREAU, S., LOURY, S., BLANCO, C. & TRAUTWETTER, A. 1996. Genetic characterization of site-specific integration functions of phi AAU2 infecting "*Arthrobacter aureus*" C70. *J Bacteriol*, 178, 1996-2004.
- LEFORESTIER, A., BRASILES, S., DE FRUTOS, M., RASPAUD, E., LETELLIER, L., TAVARES, P. & LIVOLANT, F. 2008. Bacteriophage T5 DNA ejection under pressure. *J Mol Biol*, 384, 730-9.
- LOMOVSKAYA, N. D., CHATER, K. F. & MKRTUMIAN, N. M. 1980. Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. *Microbiol Rev*, 44, 206-29.
- LORENZ, M. G. & WACKERNAGEL, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*, 58, 563-602.
- MACARIE, H. & GUYOT, J. P. 1992. Inhibition of the methanogenic fermentation of p-toluic acid (4-methylbenzoic acid) by acetate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 398-402.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. & BROCK, T. D. 2003. *Brock biology of microorganisms*, Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall/Pearson Education.
- MAHAMUD, L. M., GUTIÉRREZ, L. A. & SASTRE, A. H. 1996a. Biosólidos generados en la depuración de aguas (I): Planteamiento del problema. *Ingeniería del Agua*, 3, 47-62.
- MAHAMUD, L. M., GUTIÉRREZ, L. A. & SASTRE, A. H. 1996b. Biosólidos generados en la depuración de aguas (II): Métodos de tratamiento. *Ingeniería del Agua*, 3.
- MARREC, C. L., MICHOTEY, V., BLANCO, C. & TRAUTWETTER, A. 1994. áU2, a temperate bacteriophage specific for '*Arthrobacter aureus*', whose integrative functions work in other corynebacteria. *Microbiology*, 140, 3071-3077.
- MARTÍNKOVA, L., UHNÁKOVÁ, B., PÁTEK, M., NESVERA, J. & KREN, K. 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. A Review. *Environment International*, 35, 162-177.
- MASUDA, T., MIWA, Y., TAMAGAWA, A., MUKAI, S. R., HASHIMOTO, K. & IKEDA, Y. 1997. Degradation of waste poly(ethylene terephthalate) in a steam atmosphere to recover terephthalic acid and to minimize carbonaceous residue. *Polymer Degradation and Stability*, 58, 315-320.
- MURAL, R. J. & FRIEDMAN, D. I. 1974. Isolation and characterization of a temperate bacteriophage specific for *Rhodopseudomonas spheroides*. *J Virol*, 14, 1288-92.
- NAKAI, T., SUGIMOTO, R., PARK, K. H., MATSUOKA, S., MORI, K., NISHIOKA, T. & MARUYAMA, K. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Diseases of aquatic organisms*, 37, 33-41.
- OROPEZA 2006. Lodos residuales: estabilización y manejo. *Caos conciencia*, 1, 51-58.
- PITT, T. L. & GASTON, M. A. 1995. Bacteriophage typing. *Methods Mol Biol*, 46, 15-26.
- PRESCOTT, L. M., HARLEY, J. P. & KLEIN, D. A. 2004. *Microbiología*, McGraw-Hill Interamericana de España.
- PUCK, T. T., GAREN, A. & CLINE, J. 1951. THE MECHANISM OF VIRUS ATTACHMENT TO HOST CELLS. *The Journal of Experimental Medicine*, 93, 65-88.
- RITTMANN, B. E. & MCCARTY, P. L. 2001. *Environmental biotechnology: principles and applications*, McGraw-Hill.

- RYU, S. H., PARK, M., LEE, J. R., YUN, P. Y. & JEON, C. O. 2007. *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 1561-5.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W., IRWIN, N. & JANSSEN, K. A. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHRADER, H. S., SCHRADER, J. O., WALKER, J. J., WOLF, T. A., NICKERSON, K. W. & KOKJOHN, T. A. 1997. Bacteriophage infection and multiplication occur in *Pseudomonas aeruginosa* starved for 5 years. *Can J Microbiol*, 43, 1157-63.
- SEGERS, P., VANCANNEYT, M., POT, B., TORCK, U., HOSTE, B., DEWETTINCK, D., FALSEN, E., KERSTERS, K. & DE VOS, P. 1994. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Büsing, Döll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 499-510.
- SIVAMURTHY, K. & PUJAR, B. G. 1989. Bacterial Degradation of Dimethylterephthalate. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68, 375-377.
- SUSSKIND, M. M. & BOTSTEIN, D. 1978. Molecular genetics of bacteriophage P22. *Microbiol Rev*, 42, 385-413.
- THIRUVENKATACHARI, R., OUK KWON, T. & SHIK MOON, I. 2006. Degradation of phthalic acids and benzoic acid from terephthalic acid wastewater by advanced oxidation processes. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 41, 1685-97.
- THOMAS, J. A., SODDELL, J. A. & KURTBOKE, D. I. 2002. Fighting foam with phages? *Water Sci Technol*, 46, 511-8.
- TIKHONENKO, A. S. 1970. *Ultrastructure of bacterial viruses*, Plenum Press.
- TRAUTWETTER, A. & BLANCO, C. 1988. Isolation and preliminary characterization of twenty bacteriophages infecting either *brevibacterium* or *arthrobacter* strains. *Appl Environ Microbiol*, 54, 1466-71.
- VAMSEE-KRISHNA, C. & PHALE, P. 2008. Bacterial degradation of phthalate isomers and their esters. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 19-34.
- VAN TWEST, R. & KROPINSKI, A. M. 2009. Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol*, 501, 15-21.
- VETTORI, C., STOTZKY, G., YODER, M. & GALLORI, E. 1999. Interaction between bacteriophage PBS1 and clay minerals and transduction of *Bacillus subtilis* by clay-phage complexes. *Environ Microbiol*, 1, 347-55.
- WAGNER, E. F., AUER, B. & SCHWEIGER, M. 1983. *Escherichia coli* virus T1: genetic controls during virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 102, 131-52.
- WANG, Y. P. & GU, J. D. 2006. Degradability of dimethyl terephthalate by *Variovorax paradoxus* T4 and *Sphingomonas yanoikuyae* DOS01 isolated from deep-ocean sediments. *Ecotoxicology*, 15, 549-57.
- WILLIAMS, S. T., WELLINGTON, E. M. H. & TIPLER, L. S. 1980. The Taxonomic Implications of the Reactions of Representative *Nocardia* Strains to Actinophage. *Journal of General Microbiology*, 119, 173-178.
- WITHEY, S., CARTMELL, E., AVERY, L. M. & STEPHENSON, T. 2005. Bacteriophages--potential for application in wastewater treatment processes. *Sci Total Environ*, 339, 1-18.
- WOODS, D. E., JEDDELOH, J. A., FRITZ, D. L. & DESHAZER, D. 2002. *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a temperate bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. *J Bacteriol*, 184, 4003-17.
- ZHUANG, J. & JIN, Y. 2003a. Virus retention and transport as influenced by different forms of soil organic matter. *J Environ Qual*, 32, 816-23.
- ZHUANG, J. & JIN, Y. 2003b. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: effects of ionic strength and composition. *J Contam Hydrol*, 60, 193-209.

