

VARIABILIDAD GENÉTICA DE COLIFAGOS SOMÁTICOS AISLADOS A PARTIR  
DE MUESTRAS DE AGUA DEL LAGO GUAMUEZ (NARIÑO-COLOMBIA)

MAIRA ALEJANDRA QUIROZ CABRERA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2015

VARIABILIDAD GENÉTICA DE COLIFAGOS SOMÁTICOS AISLADOS A PARTIR  
DE MUESTRAS DE AGUA DEL LAGO GUAMUEZ (NARIÑO-COLOMBIA)

PRESENTADO POR:  
MAIRA ALEJANDRA QUIROZ CABRERA

ASESORA:  
EDITH MARIELA BURBANO ROSERO  
phD.. Ciencias

Trabajo presentado como requisito final para optar al título de Biólogo  
Modalidad Trabajo de investigación

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
SAN JUAN DE PASTO  
2015

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”.

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

Edith Mariela Burbano Rosero

---

Dolly Revelo Delgado  
Jurado

---

Andrés Lizasoain Cuelho  
Jurado

San Juan de Pasto, Marzo 16 de 2015.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por ser siempre el guía en mi camino.

A mi familia por su apoyo incondicional y comprensión que hizo posible culminar esta etapa de mi vida.

Al grupo de investigación en Biotecnología microbiana, liderado por el Doctor Pablo Fernández Izquierdo por el apoyo brindado en el desarrollo de la investigación y por el acceso al laboratorio de Biotecnología Microbiana.

A mi asesora de Trabajo de Grado, la Doctora Edith Mariela Burbano por su asesoría, acompañamiento, paciencia y enseñanza transmitida en el transcurso de la investigación.

Al Doctor Pablo Fernández por sus consejos, por su amistad y orientación en el transcurso de mi carrera.

A Guido Villota e Iván Otero por brindarme su amistad incondicional, por transmitirme sus conocimientos y enseñarme a amar la biología.

A mis compañeros de carrera Karen Castillo, Alexandra Bolaños, Vanesa Pabón, Alejandra Ordoñez y Andrés Felipe Angulo por su apoyo, consejos y por todos los momentos compartidos.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi madre Rosa Elvira Cabrera, quien ha sido mi ejemplo a seguir, porque cada paso que he dado ha sido de tu mano, porque me has acompañado y guiado durante esta larga travesía que es la vida.

A mis hermanos Jeison y Yeferson Quiroz que junto con mis sobrinas, son mi razón de existir, porque sin su apoyo, consejos y compañía no habría sido posibles salir adelante y culminar esta etapa de mi vida.

A mis abuelos Elvia María Salazar y Eligio Cabrera que siempre estuvieron apoyándome y siendo un ejemplo para salir adelante, luchando por mis metas y propósitos.

## RESUMEN

La contaminación de agua es uno de los mayores problemas de salud pública, principalmente en áreas donde los sistemas de tratamiento de agua potable son insuficientes. El factor de riesgo más importante está asociado con la exposición a agentes biológicos que incluyen bacterias patógenas, helmintos, protozoos y virus entéricos. Desde el punto de vista de la salud pública, los virus entéricos son el grupo de organismos patógenos más críticos debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja, son muy resistentes a los sistemas de desinfección y el control a nivel de laboratorio es costoso. Uno de los indicadores más eficientes en la vinculación de estos patógenos, es la detección de colifagos somáticos, cuya presencia puede estar ligada con el transporte de genes asociados a factores de virulencia que pueden conferir una ventaja evolutiva para las células hospederas y en consecuencia para los propios genes.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad genética de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua de tres puntos seleccionados del Lago Guamuez (ambiente impactado por contaminación antropogénica), para ello se utilizaron los marcadores moleculares BOX-PCR y corte con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *DraI* y *HinfI*. La caracterización morfológica y microscópica fue esencial para relacionar los fagos encontrados con el grado de contaminación antropogénica. Adicionalmente, se amplificaron los genes *lt*, *st*, *rfb0101*, *fliCH4*, *Stx2*, *terD* asociados con factores de virulencia e islas de patogenicidad.

Los resultados indicativos de este estudio permitieron determinar que los siete colifagos aislados pertenecen a las familias *Microviridae*, *Siphoviridae* y *Myoviridae*, familias reportadas en ambientes contaminados con materia fecal. El corte con endonucleasas no dio los resultados esperados, no obstante, el marcador BOX-PCR fue más eficiente en la generación de polimorfismos, pero no fue discriminatorio para familia y tipo de fago. Todos los colifagos somáticos aislados amplificaron los genes que codifican para las toxinas ST y 2 colifagos somáticos amplificaron para LT, evidenciado un peligro microbiológico en la población que usa las aguas del lago para actividades de consumo, cultivo de trucha y riego.

Palabras claves: colifagos somáticos, Toxinas ST y LT.

## ABSTRACT

Water pollution is a major public health problem, mainly in areas where systems of potable water are inadequate. The most important risk factor is associated with exposure to biological agents including pathogenic bacteria, helminthes, protozoa and enteric viruses. From the standpoint of public health, enteric viruses are the group most critical pathogens, because the minimal infectious dose is very low, are very resistant to disinfection systems and control in the laboratory is costly. One of the most efficient indicators in linking these pathogens, is the detection of somatic coliphages, whose presence can be linked to the transport of genes associated with virulence factors that may confer an evolutionary advantage to the host cells, and consequently for the genes in themselves

The aim of this work was to study the genetic variability of somatic coliphages isolated from water samples from three selected points of Lago Guamez (environment impacted by anthropogenic pollution) to this molecular markers BOX-PCR and cut with the restriction enzymes EcoRI, HindIII, Dral and HinfI were used. The morphological and microscopic characterization was essential to relate the phage found to the degree of anthropogenic pollution. Additionally *lt*, *st*, *rfb0101*, *fliCH4*, *Stx2*, *terD* genes associated with virulence factors and pathogenicity islands were amplified.

The indicative results of this study have revealed that the seven isolated phages belong to families *Microviridae*, *Siphoviridae* and *Myoviridae*, families reported in contaminated environments with fecal matter. The endonuclease cleavage did not give the expected results, however, the marker BOX-PCR was more efficient in generating polymorphisms, but it was not discriminatory for family and phage type. All somatic coliphages isolated amplified genes coding for toxins ST and 2 somatic coliphages amplified genes coding for toxins LT, evidenced a microbiological hazard for the population that uses the lake for consumption activities, trout farming and irrigation.

**Key words:** BOX-PCR, RFLP. Somatic coliphages, ST and LT toxins,

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Bacteriófagos</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1 Estructura</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2 Ciclo de vida</b>	<b>18</b>
<b>1.1.3 Ecología de Bacteriófagos</b>	<b>19</b>
<b>1.1.4 Detección y caracterización de bacteriófagos</b>	<b>19</b>
<b>1.1.5 Islas de patogenicidad</b>	<b>21</b>
<b>1.1.6 Factores de adherencia y colonización</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Colifagos</b>	<b>24</b>
<b>1.2.1 Relaciones ecológicas entre colifagos somáticos y células hospederas</b>	<b>25</b>
<b>1.3 Caracterización de bacteriófagos por RFLP [<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>]-Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Caracterización de bacteriófagos por BOX-PCR [BOX-A1R- <i>Based Repetitive Extragenic Palindromic</i>]</b>	<b>25</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>28</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>28</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Área de estudio</b>	<b>29</b>
<b>4.1.1 Diseño muestral</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Aislamiento de colifagos somáticos</b>	<b>30</b>
<b>4.2.1 Recolección de muestras de agua</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2 Preparación del medio stock para la cepa hospedera <i>Escherichia coli</i> (ATCC 13706)</b>	<b>31</b>
<b>4.2.3 Procesamiento de muestras de agua para ensayos de detección de colifagos somáticos</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Titulación de colifagos somáticos aislados</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Verificación de infectividad por lisis de colifagos somáticos sobre la bacteria hospedera <i>Escherichia coli</i> ATCC 13706</b>	<b>32</b>

	<b>Pág</b>	
4.5	Caracterización de colifagos somáticos	32
4.5.1	Caracterización por microscopia electrónica de transmisión	32
4.5.2	Caracterización molecular de colifagos	32
4.5.2.1	Extracción de ácido nucleico	32
4.5.2.2	Caracterización del tipo de material genético DNA/RNA	33
4.5.2.3	Caracterización de DNA de colifagos utilizando enzimas de restricción	33
4.5.2.4	Caracterización molecular de colifagos somáticos por la técnica de BOX-PCR [BOX-A1R- <i>Based Repetitive Extragenic Palindromic</i> BOX -A1R]	34
4.5.2.5	Amplificación de genes asociados a islas de patogenicidad en colifagos somáticos	34
4.5.2.6	Secuenciación de los productos de la amplificación de los genes <i>st</i> y <i>lt</i>	35
4.5.2.7	Edición y análisis de secuencias	36
4.5.2.8	Construcción de dendrograma a partir de los fragmentos generados por BOX-PCR	36
4.6	Análisis estadístico	36
5.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	37
5.1	Caracterización físico-química de muestras de agua del Lago Guamuez	37
5.2	Aislamiento de colifagos somáticos	38
5.2.1	Detección de colifagos somáticos	38
5.3	Caracterización de colifagos somáticos	40
5.3.1	Caracterización morfológica y microscópica de colifagos somáticos	40
5.4	Caracterización molecular de colifagos somáticos	46
5.4.1	Extracción de DNA de colifagos somáticos	46
5.4.2	Caracterización del tipo de material genético de fago DNA/RNA	
5.4.3	Caracterización molecular por BOX-PCR (BOX-A1R- <i>Based Repetitive Extragenic Palindromic</i> BOX -A1R)	48
5.4.4	Caracterización molecular de colifagos somáticos utilizando enzimas de restricción por RFLP [ <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ]	50
5.4.5	Amplificación por PCR de los genes <i>lt</i> , <i>st</i> , <i>rfb0101</i> , <i>fliCH4</i> , <i>Stx2</i> , <i>terD</i> asociados a factores de virulencia	51
5.4.6	Secuenciación de los productos de la amplificación de los genes <i>st</i> y <i>lt</i>	52
	<b>CONCLUSIONES</b>	56
	<b>RECOMENDACIONES</b>	57
	<b>LITERATURA CITADA</b>	58
	<b>ANEXOS</b>	67

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1. Secuencias de <i>Primers</i> para amplificación de genes asociados a virulencia en colifagos somáticos</b>	35
<b>Tabla 2. Recuentos de bacterias mesófilas y número de colifagos somáticos aislados de las muestras de agua del Lago Guamuez</b>	39
<b>Tabla 3. Características morfológicas macroscópicas de colifagos somáticos aislados en el Lago Guamuez y colifago control</b>	41
<b>Tabla 4. Familia, tipo y media aritmética del tamaño de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez. LCB x ACB: Largo de la cabeza Vs Ancho de cabeza. LC x AC: Longitud de la cauda Vs Anchura de cauda</b>	44
<b>Tabla 5. Similitud de colifagos somáticos que tiene genes homólogos a las toxinas LT de acuerdo con la secuenciación</b>	52

## LISTA DE FIGURAS

	Página.
<i>Figura 1.</i> Esquema del fago T4	17
<i>Figura 2.</i> Ciclos líticos y lisogénico del fago lambda.	18
<i>Figura 3.</i> Morfotipos de bacteriófagos	20
<i>Figura 4.</i> Clasificación de fagos con base en la morfología y tipo de ácido nucleico	20
<i>Figura 5.</i> Mapa Lago Guamuez indicando los tres puntos de muestreo	30
<i>Figura 6.</i> Colifagos somáticos. A. Enumeración de colifagos en agar TSA modificado (APHA, 1998); B. Recuento de colifagos para extracción de DNA; C. Verificación de Infectividad de colifagos sobre la bacteria hospedera <i>Escherichia coli</i> ATCC 13706	40
<i>Figura 7.</i> Microfotografía electrónica de transmisión (MET) de los colifagos somáticos aislados, usando la técnica de tinción negativa.	43
<i>Figura 8.</i> Extracción de DNA de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez	46
<i>Figura 9.</i> Caracterización del tipo de material genético de fago DNA/RNA de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez	47
<i>Figura 10.</i> Perfil molecular obtenido con BOX-PCR de los aislados de Colifagos somáticos.	48
<i>Figura 11.</i> Dendrograma de muestras de colifagos somáticos provenientes del Lago Guamuez	49
<i>Figura 12.</i> Gel de agarosa donde se identifica la ausencia de cortes con enzimas de restricción para el DNA de los diferentes colifagos somáticos y <i>Escherichia coli</i> ATCC13706	51
<i>Figura 13.</i> PCR para la detección de LT/ST en colifagos somáticos	52

## LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo A. Graficas de parámetros físico-químicos determinados en muestras de agua del Lago Guamuez teniendo en cuenta cada punto de muestreo	68
Anexo B. Tabla de Parámetros físico-químicos de muestras de agua Lago Guamuez	69

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de agua es uno de los mayores problemas de salud pública, principalmente en áreas donde los sistemas de tratamiento de agua potable son insuficientes, esto genera problemas de salubridad y enfermedades vehiculadas con el consumo de agua contaminada por residuos tóxicos o patógenos (Glynn & Gary, 1999). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), cada año se presentan a nivel mundial alrededor de dos mil millones de casos de enfermedades diarreicas, las cuales en su mayoría son transmitidas por el consumo de agua contaminada. En países en desarrollo 1,9 millones de niños menores de 5 años de edad fallecen a causa de estas enfermedades, siendo la diarrea una de las principales manifestaciones epidemiológicas y la principal causa de muerte (Organización Mundial de Gastroenterología, 2012).

Dentro del contexto de la protección de salud pública, se hace imprescindible una adecuada y constante evaluación de la calidad sanitaria del agua; para ello una importante herramienta en la vigilancia epidemiológica es la evaluación de la presencia de microorganismos indicadores como *Escherichia coli*, Coliformes y Enterococos (Bessler *et al.*, 1975; Brezina & Baldini. 2008; OMS, 2012; Organización Mundial de Gastroenterología, 2012). Sin embargo, existen estudios que revelan una cierta deficiencia en el empleo de estos microorganismos, ya que son susceptibles a los cambios ambientales al igual que a los tratamientos aplicados para descontaminación de agua, lo que genera un gran inconveniente al momento de realizar estudios de calidad acuática, por lo tanto, evaluar estos indicadores no reflejarían la calidad real de las aguas, haciendo necesario considerar otros bioindicadores (Sinton *et al.*, 1999; Cadillo y León, 2001).

En este sentido se han realizado diferentes trabajos en los que se demuestra que los colifagos somáticos son excelentes indicadores de contaminación fecal en ambientes acuáticos como consecuencia de su capacidad para sobrevivir en ambientes adversos, aun cuando se han aplicado tratamientos para la desinfección con el objetivo de destruir los coliformes y *Enterococcus intestinais*, además varias investigaciones reportan el aislamiento de bacteriófagos en aguas en las que no se detectaron coliformes termotolerantes ni otros indicadores microbiológicos (Borrego *et al.*, 1990; Sinton *et al.*, 1999., Abedon 2008, Burbano, 2009). De esta manera, la gran estabilidad de dichos virus hace que en muchas ocasiones los tratamientos aplicados para la depuración del agua no consiga eliminarlos completamente, dispersándolos en el medio (Glynn y Gary, 1999; OMS, 2012).

Por lo anteriormente expuesto, es transcendental el estudio de colifagos somáticos, ya que la ausencia de coliformes no ofrece ninguna seguridad que los virus estén ausentes y por lo tanto no exime de una posible infección; pues se debe tener en cuenta que estos colifagos tienen la capacidad de inducir a cambios en las bacterias, generados principalmente por la incorporación de segmentos de DNA viral que codifican para proteínas (toxinas, factores o propiedades de señalización) como las enterotoxinas termolábiles (LT), termoestables (ST), que son entre otros,

factores asociados a la virulencia de amplia atención epidemiológica (Schwartzbrod, 1995; Dini, 2011). Esta capacidad de infección a células patógenas, al igual que la transferencia de los genes asociados a las islas de patogenicidad amplifica la necesidad de ejecutar estudios relacionados con su diversidad, con la finalidad de estimar el peligro microbiológico al que están expuestas las poblaciones que usan estas fuentes de agua (Abedon, 2008; OMS, 2012).

En este sentido, la población que habita en el corregimiento de El Encano, ubicado en el departamento de Nariño, Colombia, puede estar presentando un problema relacionado con la contaminación antropogénica del Lago Guamuez, centro estratégico de diversidad, rico en especies, genes y recursos hídricos, siendo su principal fuente económica las actividades generadas del uso del agua. Esta fuente hídrica se utiliza en mayor medida para la producción de la especie *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris), que por su alta demanda comercial, ha ocasionado un gran impacto ecológico, tanto por la adaptación de jaulas que funcionan como criaderos, como también por la descarga de excretas humanas y de ganado, ocasionando de forma directa el deterioro de la calidad de las aguas, generando un grave problema de contaminación hídrica (Rivas, 2004). El recurso agua en la población, es también direccionado para el consumo animal y adicionalmente, como riego para los alimentos como frutas y hortalizas que se cultivan en esta zona; estas actividades pueden estar ocasionando la transmisión de patógenos en los cultivos y consecuentemente, pueden estar vinculadas con la producción de infecciones en los humanos, ya que la vía fecal-oral es de consideración importante por la presencia de los criaderos que conllevan al asentamiento de restaurante cerca de los lugares de producción. Lo anteriormente mencionado es soportado por los reportes de la secretaria de salud de Pasto (2014) en el corregimiento de El Encano y en forma general en el departamento de Nariño, donde la gran proporción de enfermedades gastrointestinales vinculadas con el recurso hídrico y los alimentos derivados de ellos, de presunto origen infeccioso, son las principales causas de morbilidad en todas las edades.

A pesar que el gobierno Departamental ha incentivado políticas para mejorar la calidad de vida de esta población, aun no es clara la acción del gobierno para minimizar el impacto de las actividades humanas sobre el ecosistema hídrico en la región. Un ejemplo de ello, es el acuerdo de competitividad del sector piscícola de Nariño, el cual se encuentra enmarcado dentro de las políticas del Plan de Desarrollo Nacional, bajo los lineamientos de una política de construcción de región con el empoderamiento de las comunidades que generan su sustento e ingresos de la piscicultura, teniendo en cuenta un desarrollo sostenible con aprovechamiento racional de los recursos naturales abarcados en el impulso de la actividad. Dentro de las iniciativas de impacto social del sector agropecuario elaboradas por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, está priorizada la actividad piscícola, ya que las proyecciones esperadas son: fuente de generación de ingresos, empleo rural alternativo, seguridad alimentaria y crecimiento tanto en mercados Nacionales como Internacionales (Acuerdo de Competitividad de la Cadena Piscícola en el Departamento de Nariño, 2010). No obstante, entidades como el Ministerio de Medio Ambiente y la Corporación Autónoma Regional de Nariño (CORPONARIÑO), que son las

autoridades ambientales del departamento, admiten los graves problemas de contaminación del lago, sin embargo, todavía no se cuenta con planes de contingencia ni de monitoreamiento ambiental, mucho menos de manuales de vigilancia epidemiológica; una de las causas más relevantes es el vacío de conocimiento en la región sobre la inocuidad hídrica y alimentaria.

Adicionalmente hasta la fecha (2014), son muy escasos los estudios orientados en la detección de bioindicadores de contaminación antropogénica, los pocos que se han realizado se han enfocado en la detección de coliformes, sin existir estudios consolidados sobre la detección de bioindicadores como colifagos somáticos, tampoco existen reportes dirigidos a la amplificación de genes involucrados en islas de patogenicidad que otorgan a las poblaciones microbianas, sobrevivencia y dispersión por la adquisición de genes exógenos. Por consiguiente, el estudio de la morfología, la variabilidad y la amplificación de genes asociados a islas de patogenicidad de los colifagos somáticos, es relevante por sus efectos sobre los organismos, los cuales pueden conllevar a enfermedades intestinales, de manera que se hace evidente y prioritaria su evaluación en ambientes como los del Lago Guamuez.

Por lo anterior en este estudio se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la variabilidad genética de los colifagos somáticos aislados de muestras de agua del Lago Guamuez, respecto a la presencia de genes asociados a factores de virulencia?

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Bacteriófagos

Están definidos como virus capaces de infectar y reproducirse en células procariotas o bacterias que se hallan metabólicamente activas. Su genoma está compuesto por moléculas de DNA o RNA, y están rodeadas por una envoltura proteica. Los bacteriófagos son *parásitos* que están íntimamente relacionados con una célula bacteriana para reproducirse (Muniesa, 1998; Díaz, 2006; Abedon, 2008).

**1.1.1 Estructura.** Los fagos están compuestos por una cápside que contiene el material genético y puede ser: DNA de cadena sencilla, DNA de cadena doble, RNA de cadena sencilla o RNA de cadena doble. Este ácido nucleico contiene información específica y tiene el potencial operacional para modificar la maquinaria de la célula infectada utilizándola a su favor para llevar a cabo la producción de los componentes de las nuevas partículas virales. El DNA de algunos fagos se caracteriza por contener bases raras que sustituyen alguna o algunas de las bases normales presentes en el DNA, esto permite distinguir fácilmente entre el ácido nucleico del virus y aquel que corresponde a la bacteria hospedera (Griffiths, *et al.*, 2000 citado por Díaz, 2006).

La cápside puede tener una estructura icosaédrica entre otras estructuras complejas, y a la vez puede estar unida a la cauda o cola, estructura similar a un tallo que puede ser contráctil o no. En algunos fagos como el T4 de *E. coli* (Figura 1), su cola está compuesta por proteínas que forman un núcleo interno terminado en una placa basal con fibras. En la región apical se encuentra el punto de contacto inicial de la bacteria hospedera y el fago. La diversidad y complejidad estructural de los fagos resulta del número y organización de las diferentes proteínas que constituyen la cubierta, así como del tipo y estructura del ácido nucleico (Abedon, 2008).

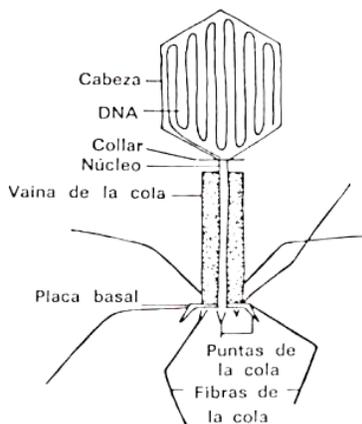
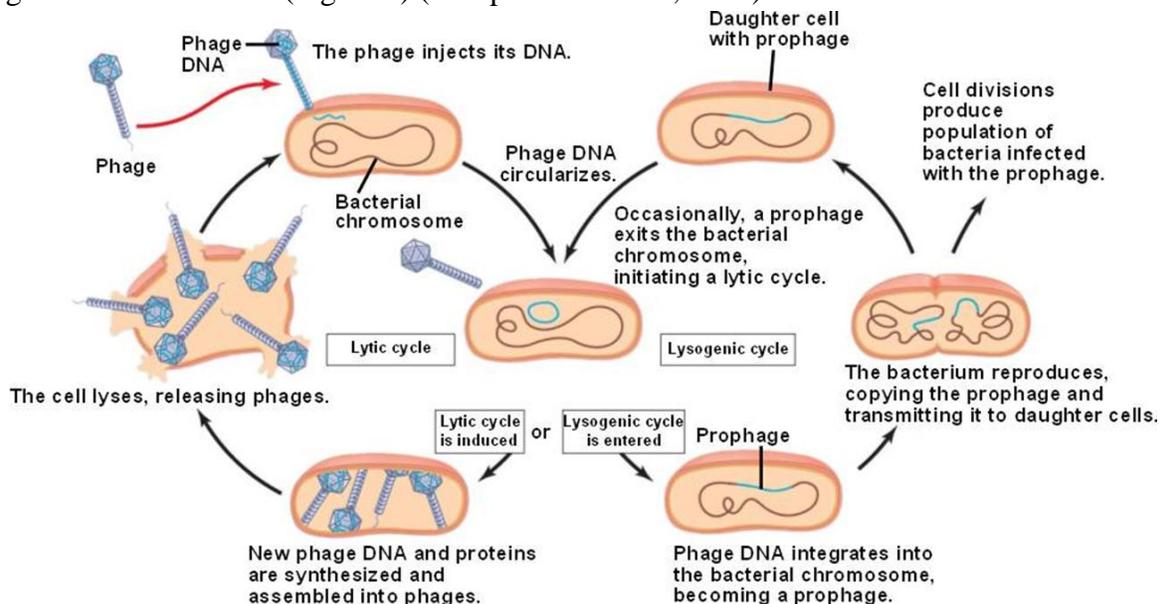


Figura 1. Esquema del fago T4.

**1.1.2 Ciclo de vida.** Los fagos son los virus más conocidos de todos, su investigación condujo al descubrimiento que algunos virus de DNA de cadena doble se pueden reproducir mediante dos mecanismos alternativos: el ciclo lítico y el ciclo lisogénico (Figura 2) (Campbell & Reece, 2007). Por su parte el ciclo lítico culmina con la muerte de la célula, el termino hace referencia a la última fase de la infección, durante la cual, la bacteria se lisa y libera los fagos reproducidos en su interior, cada uno de estos fagos puede infectar una célula sana y unos pocos ciclos líticos sucesivos pueden destruir a la población bacteriana completa en pocas horas (Campbell & Reece, 2007). Los únicos fagos que se reproducen por este ciclo son los fagos virulentos. Otros fagos en lugar de lisar su célula hospedera coexisten con ella de una forma denominada ciclo lisogénico, en este el fago replica su genoma sin destruir la célula, la molécula de DNA del fago se incorpora por recombinación genética (entrecruzamiento) en un sitio específico del cromosoma bacteriano, el DNA viral se conoce como profago, un gen del profago codifica una proteína que evita la transcripción de la mayoría de sus genes para ser silenciados dentro de la bacteria y cada vez que la bacteria infectada se divide, replica el DNA del fago junto con el propio, y traslada las copias a las células hijas. Los fagos que son capaces de utilizar ambos modos de reproducción dentro una de bacteria se llaman fagos temperados, sin embargo, los profagos son capaces de dar origen a fagos activos que lisan la célula hospedera, esto depende de las señales del ambiente, como la radiación o la presencia de sustancias químicas, las que desencadenan el cambio del modo lisogénico al modo lítico (Figura 2) (Campbell & Reece, 2007).



*Figura 2.* Ciclos líticos y lisogénico del fago lambda. Después de entrar en la célula bacteriana y adoptar una forma circular, el DNA del fago lambda puede incidir de inmediato en la producción de un gran número de progenies (ciclo lítico) o integrarse en el cromosoma bacteriano (ciclo lisogénico).

Fuente: Campbell & Reece, (2007).

**1.1.3 Ecología de Bacteriófagos.** La dinámica de la población de bacterias puede verse afectada por la presencia de depredadores como lo son los bacteriófagos. Su abundancia y su impacto sobre las bacterias, hacen que la comprensión de la ecología del fago cada vez sea más relevante para la ecología de los ecosistemas bacterianos. Estos al tener una relación íntima de parasitismo con su hospedero para reproducirse, disminuyen drásticamente la población bacteriana (Ker *et al.*, 2008). La presencia de una especie infectiva en un hospedador está determinada por la interacción de diferentes factores intrínsecos y extrínsecos; el primero se relaciona con la susceptibilidad del hospedero a las infecciones parasitarias, mientras que el segundo se relaciona con la dinámica poblacional, distribución, comportamiento y dieta de los hospederos, así como con las características físicas y bióticas del hábitat (Esch y Fernández, 1993; Wisnivesky, 2003; Cattadori *et al.*, 2006; Robles, 2008).

**1.1.4 Detección y caracterización de bacteriófagos.** Los fagos están divididos en seis grupos de acuerdo al tipo morfológico, tipo de ácido nucleico y tipo de hospedero. Estos fagos pueden ser tanto de DNA (cadena simple o de cadena doble) o de RNA (cadena simple o de cadena doble). Los fagos de DNA de cadena doble pueden ser: fagos con cauda contráctil (A), con cauda no contráctil (B), con cauda corta (C), fagos sin cauda (D3) y fagos pleomórficos protegidos por un envoltura lipídica (G). Los fagos de DNA de cadena simple son diferentes, pueden ser icosaédricos (D1 y D2) o filamentosos (F1 y F2) (Figuras 3 y 4) (Ackermann, 2001; Ackermann, 2006; Burbano- Rosero, 2009).

Los fagos del grupo E son icosaédricos con RNA de cadena simple (E1) o doble (E2). Cerca del 96% de los fagos estudiados poseen cauda y están divididas en tres familias distintas, teniendo en cuenta sus características morfológicas. Aproximadamente el 60% de los fagos con cauda larga y no contráctil pertenecen a la familia *Siphoviridae*, 25% de fagos con cauda contráctil pertenecen a *Myoviridae* y los de cauda corta y no contráctil son *Podoviridae* (Ackermann, 2001; Burbano-Rosero, 2009).

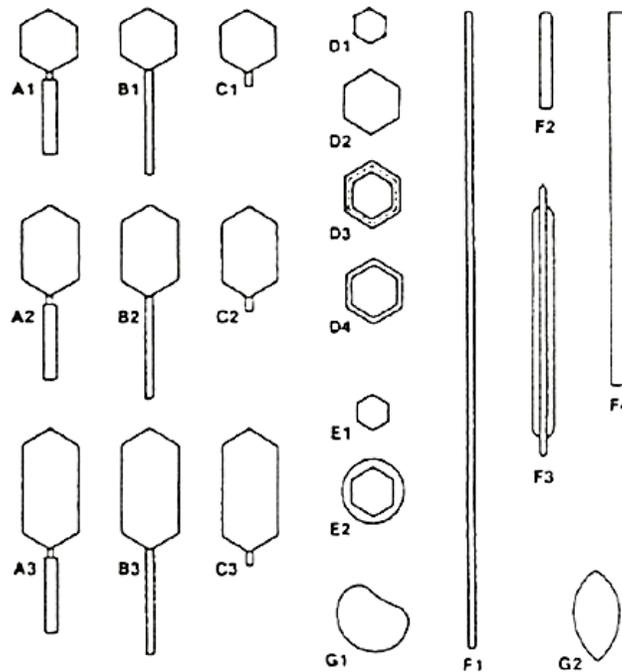


Figura 3. Morfotipos de bacteriófagos

Fuente: Burbano- Rosero (2009).

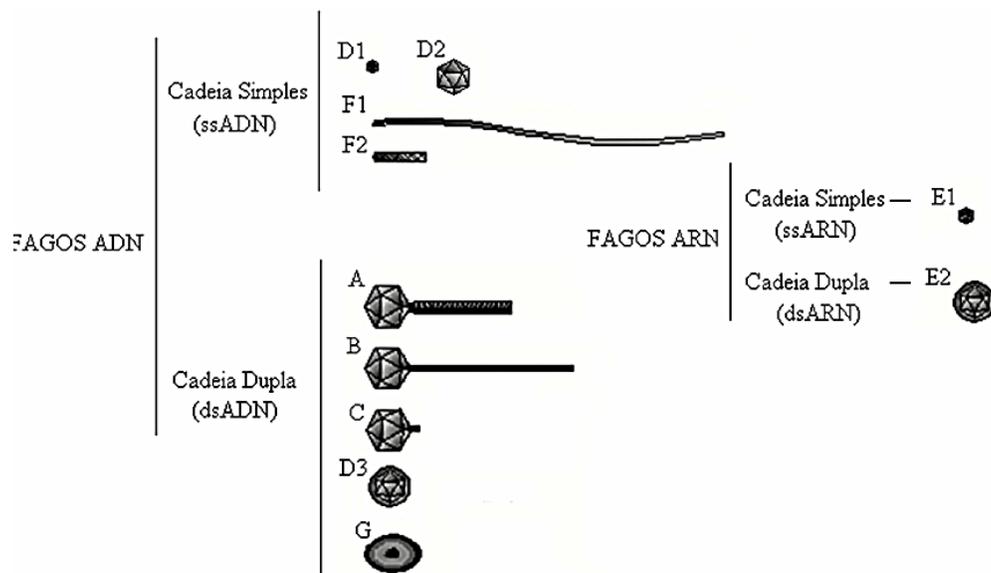


Figura 4. Clasificación de fagos con base en la morfología y tipo de ácido nucleico.

Fuente: Burbano- Rosero (2009).

**1.1.5 Islas de patogenicidad.** Las islas patogénicas (PAI) son segmentos de DNA bacteriano que portan uno o más genes de virulencia, los cuales han sido adquiridos en bloque de una fuente externa mediante transferencia horizontal de genes. El genoma de un patógeno usualmente representa un mosaico entre estas islas recién adquiridas mediante procesos de transducción y un DNA perteneciente a célula hospedera. Las PAI son elementos genéticos móviles (>10Kb) que se integran en el genoma o se mantienen en plásmidos asociados a secuencias de tRNA. Son identificadas por su diferencia en el porcentaje de contenido de G+C en relación a la media del cromosoma y por otras características que sugieren su adquisición a través de elementos genéticos móviles. Genes para una amplia gama de determinantes de virulencia están asociados con PAI, incluyendo los que codifican para ciertos mecanismos que les permiten resistir a los antibióticos y a los diferentes mecanismos de defensa del hospedador, factores de colonización, adquisición de nutrientes, adhesinas, toxinas y otros factores de virulencia son codificados por factores relacionados con la movilidad genética transposasas, integrasas y orígenes de replicación (Fernández *et al.*, 2004).

Una PAI puede portar solo un gen de virulencia, y en ese caso se les refiere como islotes de patogenicidad, por ejemplo; el islote *ifA* de *Salmonella*, que codifica una proteína secretada e involucrada en la multiplicación intracelular. En otros casos, pueden contener varios operones asociados con virulencia, y otras pueden ser muy grandes, por ejemplo, la PAI II de UPEC (*Escherichia coli Uropatógena*) tiene un tamaño cercano a 190 kb (Fernández *et al.*, 2004). El estudio y conocimiento de las PAI provee evidencias importantes de la biología de las bacterias patógenas, los productos de las PAI podrán representar, en un futuro, blancos para la terapia antimicrobiana, vacunas y herramientas diagnósticas (Marcus *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2004).

Los mecanismos moleculares de patogenicidad utilizados por bacterias entéricas involucran una gran cantidad de genes agrupados en regiones IP. Éstas pueden contribuir directamente a la virulencia del patógeno u otorgar nuevas características que le permitan cursar un ciclo infeccioso exitoso. La capacidad de cepas patógenas como *E. coli* puede causar distintos tipos de infecciones extraintestinales y se correlaciona con la expresión de múltiples factores de virulencia incluyendo adhesinas, toxinas, sideróforos, sistemas de secreción, formación de biopelículas y otros factores que contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad (Silva, 2009; Faleiro, 2010).

**1.1.6 Factores de adherencia y colonización.** La habilidad de adherirse a la superficie del epitelio es esencial para la mayoría de los patógenos que interactúan con los hospederos humanos. La adherencia generalmente es mediada por moléculas secretadas a la superficie celular de la bacteria y que se unen a ligandos específicos en la superficie de las células del hospedador o en la matriz extracelular. Han sido identificados un gran número de factores de adherencia, divididos en dos grandes grupos; fimbrias (pili) y adhesinas. Las adhesinas son estructuras complejas en forma de barra, las cuales se proyectan desde la superficie bacteriana y median

el contacto entre la bacteria y la célula hospedera. En las *E. coli* uropatogénicas, los genes que codifican las proteínas del pilus, *prf* (P-related fimbriae), están localizados en una PAI, la cual también codifica otros factores de uropatogenicidad. La pérdida de esta PAI ocurre naturalmente a una frecuencia relativamente alta y resulta en la pérdida de la virulencia. Un sistema de adhesión inusual está codificado por el [*Locus de Enterocyte Effacement*] (LEE), una PAI de 35 kb, que contiene los genes *eae*, *esp*, *tir* y *esc*, presente en las *E. coli* enteropatógenicas y enterohemorrágicas, la cual codifica un sistema TTSS (McDaniel *et al.*, 1995). Este sistema inyecta la proteína *Tir* [*Translocated Intimin Receptor*] en la membrana de la célula epitelial intestinal del hospedador, la cual actúa como receptor de otra proteína codificada en LEE, la intimina (*eae*), resultando en una fuerte adherencia a las células epiteliales. Por otra parte, las cepas de *E. coli* que poseen PAI y que pueden codificar las fimbrias S, que se unen a los receptores de ácido siálico presentes en las células endoteliales del sistema microvascular del cerebro, pueden causar sepsis o meningitis (Lindsay *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2004).

Los factores de virulencia como las toxinas, a menudo son codificados por elementos genéticos tales como plásmidos, transposones y bacteriófagos. Estos elementos se mueven de manera horizontal y vertical por las poblaciones bacterianas confiriendo una ventaja evolutiva para las células hospederas a las que se les transfirió el material exógeno. Es así como la patogenicidad de las bacterias infectadas está relacionada con los patógenos que las infectan, de tal manera que estas bacterias pueden estar asociadas a factores de virulencia (Fernández *et al.*, 2004; Dini, 2011).

Uno de los principales factores de virulencia es la toxina shiga (Stx): dentro de esta familia de toxinas existen 2 grupos principales denominados Stx1 y Stx2, entre sí poseen una identidad promedio del 55 y 57% en las secuencias de las subunidades A y B respectivamente; la toxina Stx2 ha demostrado ser codificada por bacteriófagos lisogénicos que presenta una secuencia con gran variabilidad a diferencia de la Stx1 que es altamente conservada. Entre las variantes conocidas de Stx2 se encuentran Stx2c, Stx2v, Stx2vhb, Stx2e y se ha encontrado que la toxicidad de Stx2 es hasta 1000 veces mayor que la Stx1 (Muniesa, 1998; Donnenberg, 2002; Miko *et al.*, 2013).

La toxina LT es una toxina termolábil muy parecida a la toxina colérica que provoca un cuadro característico de diarrea acuosa, está compuesta por una subunidad catalítica denominada A y cinco subunidades llamadas B cuya función es la de ligarse a receptores celulares del enterocito, igualmente esta toxina tiene la capacidad de inactivar la señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) en el hospedero, proteínas que desempeñan un papel clave en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar diferentes estímulos extracelulares al igual que regulan procesos como mitosis, cambios en la expresión genética y metabolismo (Arias y Huguet, 2002; Salinas *et al.*, 2011).

La toxina ST o toxina termoestable están compuestos por pequeños péptidos de origen plasmídico y eventualmente transposónico, soporta tratamientos a temperaturas de 100°C y contiene residuos de cisteína, cuyas uniones son las responsables de la estabilidad al calor, actúan en la superficie celular de modo que afecta diversos cambios intracelulares de señalización; esta toxina se produce principalmente por *E.coli* (ETEC) atacando a las células del epitelio intestinal causando principalmente diarrea (Huarani, 2005; Arias y Huguet, 2010). Existen dos subtipos que son STa y STb que difieren en estructura y mecanismos de acción, los genes para ambas clases se hallan en plásmidos (Huarani, 2005).

En el caso del gen *terd* por ser poco estudiado su función aun no es completamente conocida, sin embargo, se presume que puede causar la oxidación directa de los tioles celulares y que participan en la resistencia al telurito ( $\text{TEO}_3^{2-}$ ), compuesto altamente tóxico para bacterias Gram negativas, razón por la cual puede ser apreciada como factor de virulencia (Brzuszkiewicz *et al.*, 2001; Ponnusamy *et al.*, 2011; Ru *et al.*, 2011; Sanssouci, 2011).

El *rfb* por su parte ha sido catalogado responsable de las enzimas involucradas en la biosíntesis del antígeno-O de las bacterias hospederas (Fitzgerald *et al.*, 2006). En el caso de Flic es una proteína estructural del filamento flagelar (flagelina), su gen se encuentra codificando para antígenos flagelares responsables de la motilidad bacteriana de órganos y está bajo el control de varias cascadas de regulación (Beutin *et al.*, 2005; Miko *et al.*, 2013).

**1.2 Colifagos.** La denominación de los fagos se relaciona directamente con la célula hospedera específica que es infectada. Así, el nombre de colifagos es dado por su capacidad de infectar a la bacteria *Escherichia coli*. Los colifagos se dividen en dos grupos principales: colifagos somáticos y colifagos de RNA F-específicos. Estos se diferencian por la vía de infección. Los colifagos de RNA F-específicos inician la infección uniéndose a las fimbrias de fertilidad (fimbrias F- o sexuales) de la bacteria hospedera, estas fimbrias son producidas exclusivamente por las bacterias portadoras del plásmido de fertilidad (F); mientras que en el caso de los colifagos somáticos, la infección se inicia por la unión a receptores ubicados permanentemente en la pared celular de los hospederos; suelen replicarse en el aparato digestivo de los animales de sangre caliente, pero también pueden hacerlo en medios acuáticos, es así como los colifagos al igual que su célula hospedera *E. coli* se han convertido en indicadores de contaminación antropogénica del agua (Wok, 2001; Díaz, 2006).

**1.2.1 Relaciones ecológicas entre colifagos somáticos y células hospederas.** La comprensión de cómo las interacciones entre las especies afectan a la estructura y a la dinámica espacio-temporal de las poblaciones y comunidades biológicas es un objetivo fundamental dentro de la ecología de comunidades. Cuando se descubrió que la concentración de bacteriófagos en aguas naturales no contaminadas se encontraban en concentraciones de hasta  $2,5 \times 10^8$  partículas de virus por mililitro, se comprendió la importancia de estudiarlos, ya que estas concentraciones indican que la infección por virus puede ser un factor importante en el control ecológico de

microorganismos planctónicos y que los virus podrían mediar el intercambio genético entre bacterias en ambientes acuáticos naturales (Brezina & Baldini, 2008).

Para determinar el efecto de los bacteriófagos en la mortalidad bacteriana se ha utilizado una variedad de enfoques, incluido el recuento de bacterias visiblemente infectadas, la eliminación de las partículas virales, la decadencia de la infectividad viral y las mediciones de las tasas de producción virales, al igual que la tasa de mortalidad de células afectadas. Suttle (2002) afirma que los “cyanophages” son responsables de la eliminación de aproximadamente el 3% de *Synechococcus marina* sobre una base diaria. Además de la infección lítica, asociaciones lisogénicas fueron demostradas claramente en las cianobacterias filamentosas y unicelulares. Los factores ambientales y el estado fisiológico de las cianobacterias afectan claramente las interacciones “cyanophage”-cianobacterias, pero aun así siguen siendo poco conocidos.

Sin embargo, los resultados que dan a conocer Peduzzi y Schiemer (2004), Filippini y colaboradores (2006, 2008) sugieren que, en promedio, alrededor del 20% de las bacterias heterótrofas marinas están infectadas por virus y entre un 20-40% de la comunidad bacteriana se lisan diariamente por ellos, tanto en sistemas acuáticos marinos como en lagos de aguas dulces llevando así a una disminución de la tasa poblacional de las bacterias que están siendo infectadas por estos virus.

Teniendo en cuenta que muchas comunidades naturales son de gran complejidad, se hace necesario partir de estudios más pequeños donde interactúan unas cuantas poblaciones, estudiando solamente una pequeña parte de las interacciones que hay entre las poblaciones. El examen de comunidades de depredadores y sus presas ha conducido a una comprensión más profunda de las circunstancias en las que las diferentes especies que son las presas se afectan negativamente entre sí a través de un depredador común (Bohannan & Lenski, 2000; Filippini *et al.*, 2006).

Jackson y Jackson en el año 2008, hacen una recopilación de aproximadamente 50 estudios relacionados con el papel de los bacteriófagos en aguas de humedales, encontrando que estos cumplen al menos seis funciones muy importantes en el ambiente: (i) los virus pueden ser responsables de la significativa mortalidad bacteriana (ii) la lisis celular inducida por virus desvía el carbono de la materia orgánica articulada a la materia orgánica disuelta, (iii) la lisis viral libera nutrientes, generalmente en formas orgánicas, que pueden cambiar la disponibilidad de nutrientes para otros organismos; (iv) los virus de algas o cianobacterias pueden llevar a la disminución de las floraciones de fitoplancton o incluso prevenir la formación de las flores; (v) los virus afectan la diversidad y la estructura de las comunidades microbianas y (vi) los fagos pueden mediar el intercambio genético a través de transducción o a través de la liberación de DNA de la célula hospedera durante la lisis que posteriormente podría ser adoptada por otras células mediante transformación.

**1.3 Caracterización de bacteriófagos por RFLP [Restriction Fragment Length Polymorphism]-Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción.** La técnica de RFLP permite diferenciar distintos organismos mediante análisis de patrones de bandas, lo que permite comparar perfiles obtenidos a partir del uso de enzimas de restricción, endonucleasas que cortan los enlaces fosfodiéster de la molécula de DNA en determinadas secuencias nucleotídicas, específicas para cada enzima, denominadas dianas o sitios de restricción. Los sitios de reconocimientos de estas enzimas suelen ser secuencias compuestas por cuatro o seis pares de bases que cortan el DNA en secuencias específicas palindrómicas. Las secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el DNA de diferentes individuos de una población, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción (Rodríguez, 2004; Burbano-Rosero, 2009).

En general, cuanto menor es el tamaño de la secuencia diana, mayor es el número de fragmentos que se generan. En la actualidad se han purificado un gran número de enzimas de restricción diferentes procedentes de numerosas bacterias. Estas enzimas sirven en la naturaleza para proteger a las bacterias de la penetración de DNA extraño, como el de un fago, puesto que son capaces de destruirlo. Las endonucleasas de restricción se nombran con tres o cuatro letras que proceden del nombre de la bacteria en la que se han aislado (por ejemplo, la enzima Eco procede de *Escherichia coli*) y además se les añade un número romano (*Eco RI*, *Eco RII*, *Eco 47III*, *Eco NI*, *Eco 0109I*), puesto que se pueden encontrar varias enzimas de restricción diferentes, que reconocen distintas dianas, en la misma bacteria (Rodríguez, 2004).

**1.4 Caracterización de bacteriófagos por BOX-PCR [BOX-A1R- Based Repetitive Extragenic Palindromic].** BOX PCR es una técnica de amplificación de secuencias repetidas (rep-PCR), cuyo principal objetivo es la rápida obtención de huellas genómicas, se basa en la diversidad de repeticiones en tándem corto (secuencias de elementos de BOX) en el genoma, se ha usado ampliamente para la tipificación molecular de las cepas debido a su buena reproducibilidad y poder de discriminación, adicional a que es un procedimiento sencillo y de bajo costo (Oliva & Bean, 1999; Zhu *et al.*, 2006). Los elementos 5'-3' BOX se compone de tres subunidades (boxA, boxB, and boxC), que son 59, 45 y 50 nucleótidos de longitud, respectivamente (Martin *et al.*, 1992).

## 2. ANTECEDENTES

A nivel mundial, muchos estudios se han realizado con el fin de determinar la contaminación antropogénica en los cuerpos de agua, uno de ellos es el realizado por Brezina & Baldini (2008), quienes en búsqueda de nuevos indicadores de contaminación antropogénica, debido a la aparición de brotes de enfermedades víricas entéricas asociadas al uso de aguas bacteriológicamente aptas para el consumo, encontraron que los colifagos somáticos sobreviven a procesos de cloración y desinfección, tornándose en un indicador prevalente en el ambiente. Por su parte, Reinoso (2008), quien tenía como objetivo principal determinar los principales mecanismos de eliminación y/o inactivación de patógenos indicadores de contaminación, encontró que la presencia de colifagos somáticos es un factor determinante en el control del tamaño poblacional de *E. coli* patogénica.

Abedon (2008) publicó el libro titulado “*Bacteriophage Ecology Population Growth, Evolution, and Impact of Bacterial Viruses*” donde recopila minuciosamente la información generada por una amplia diversidad de investigaciones en fagos, especialmente vinculada con el entendimiento desde todas las perspectivas de la ecología sobre la actividad celular y la comunicación entre la asociación de bacteriófago-célula hospedera, al igual que muestra el crecimiento demográfico, la evolución y el impacto de los virus bacterianos en el ambiente; la capacidad de manipular las historias de vida y la evolución de sus hospederos; esta publicación genera datos para aplicar modelos matemáticos que permitan explicar la ecología de estos bacteriófagos, al igual que las limitaciones y las adaptaciones en su crecimiento poblacional, tanto en medios acuáticos como terrestres.

Sime-Ngado & Colombet (2009) enfocaron su estudio en el rol que cumplen los virus en ecosistemas acuáticos, interacciones y participación en ciclos biogeoquímicos. Este enfoque les permitió determinar el papel crucial de los bacteriófagos para el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos y la complejidad de las interacciones entre las poblaciones microbianas.

Se han utilizado técnicas moleculares como la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) para determinar la presencia de los genes que codifican toxinas y en muchos casos como en el estudio de Ukemeir & Schmidt (2000), encontraron que los genes de *Stx* en bacterias como *E. coli* y *Shigella dysenteriae* son transmitidos por fagos. Dentro de las toxinas más comunes que pueden estar codificando los colifagos somáticos, la toxina shiga ha sido la más estudiada, esta inhibe la síntesis proteica dentro de las células hospederas, lo que genera enfermedades severas como colitis hemorrágica (CH), el síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica trombótica (PPT) (Bielaszewska *et al.*, 2011).

García (2004), realizó la determinación del gen *stx<sub>2</sub>* en muestras ambientales y evaluó su variabilidad encontrando que esta toxina está ampliamente distribuida en las bacterias, *E. coli* estuvo presente en las diferentes aguas residuales analizadas, tanto las de origen urbano como las

procedentes de mataderos bovinos y porcinos, por lo menos en las zonas geográficas analizadas, igualmente se detectaron otros factores de virulencia por lo cual estas bacterias son catalogadas como cepas patógenas.

Burbano y colaboradores (2009) determinaron la abundancia de colifagos somáticos en tres ambientes marinos con diferente polución antropogénica en Brasil. Se estudió la variabilidad genética utilizando los marcadores moleculares RFLP, rep\_PCR y secuenciación. Complementariamente se amplificaron los genes que codifican para las toxinas LT y ST en seis colifagos somáticos de sesenta y dos aislados.

A nivel Departamental, Rivas (2004) en su trabajo denominado “Efecto de un cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en la proliferación de bacterias heterótrofas en el Lago Guamuez, Municipio de Pasto” identificó por pruebas bioquímicas convencionales, las bacterias: *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. y *Enterobacterias*. Los datos confrontados permitieron determinar que este lago presenta una baja contaminación fecal, sin embargo en reportes posteriores, se contrastan estos datos, con el informe preventivo de la Procuraduría General de la Nación (2013) donde se hace evidente la grave preocupación por la alta contaminación que se está generando debido a la descarga de aguas residuales de la población aledaña y por los cultivos de trucha lo que puede estar conllevando a la contaminación sin control de uno de los ecosistemas más diversos del Departamento de Nariño.

En nuestro país, aunque se tiene un conocimiento acerca de las condiciones microbiológicas y fisicoquímicas de lagos, lagunas y ciénagas al igual que de su flora y fauna, aún falta mucha investigación acerca del funcionamiento de estos ecosistemas, el grado de eutrofización en el cual se encuentran, la variabilidad genómica y modelos que garanticen la recuperación y conservación de los mismos (Roldán-Pérez, 2009). Aún los vacíos de información son muy amplios.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la variabilidad genética de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez, respecto a la presencia de genes asociados a islas de patogenicidad y polimorfismos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar microscópicamente colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez.
- Determinar la presencia de genes relacionados con islas de patogenicidad.
- Determinar polimorfismos variables por perfiles genéticos.

## 4. METODOLOGÍA

El presente trabajo se desarrolló en dos etapas, la primera fue la fase de campo en la cual se realizó la recolección de las muestras de agua del Lago Guamuez, en el que inicialmente se registraron datos relacionados con el microclima y los parámetros fisicoquímicos del agua, teniendo en cuenta que dichos parámetros son de vital importancia pues parámetros como: oxígeno disuelto, CO<sub>2</sub>, alcalinidad, nitritos, nitratos, cloruros, fosforo reactivo, pH, temperatura, salinidad, sólidos totales disueltos, conductividad, sulfatos son factores fundamentales y determinantes en el crecimiento de microorganismos como bacterias y virus; además, se realizaron ensayos microbiológicos para determinar las bacterias mesófilas cultivables. Las muestras de agua fueron llevadas bajo refrigeración al laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño donde se ejecutó la segunda etapa correspondiente a la ejecución de metodologías para el aislamiento y caracterización de los colifagos.

**4.1 Área de estudio.** Las muestras de agua se tomaron en tres puntos del Lago Guamuez, ubicado en la parte Sureste del Departamento de Nariño, localizado entre las coordenadas 0° 50' latitud Norte y 77° 05' – 77° 20' longitud Oeste. Tiene una superficie aproximada de 39.000 hectáreas que pertenecen a la región llamada Cuenca Alta del Río Guamuéz. Está ubicado a una altura de 2700 metros sobre el nivel del mar, tiene una extensión de 13 kilómetros de largo por 6 kilómetros de ancho y una profundidad máxima de 75 metros, lo cual permite una capacidad de almacenamiento de 1.554 millones de metros cúbicos de agua, aportados por 26 quebradas que lo convierten en una gran reserva hidrográfica. Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE] en sus alrededores se asientan 10.150 habitantes.

**4.1.1 Diseño muestral.** Se ubicaron tres puntos de muestreo con aparente diferencia en cuanto a la contaminación antropogénica, como se muestra en la Figura 5.

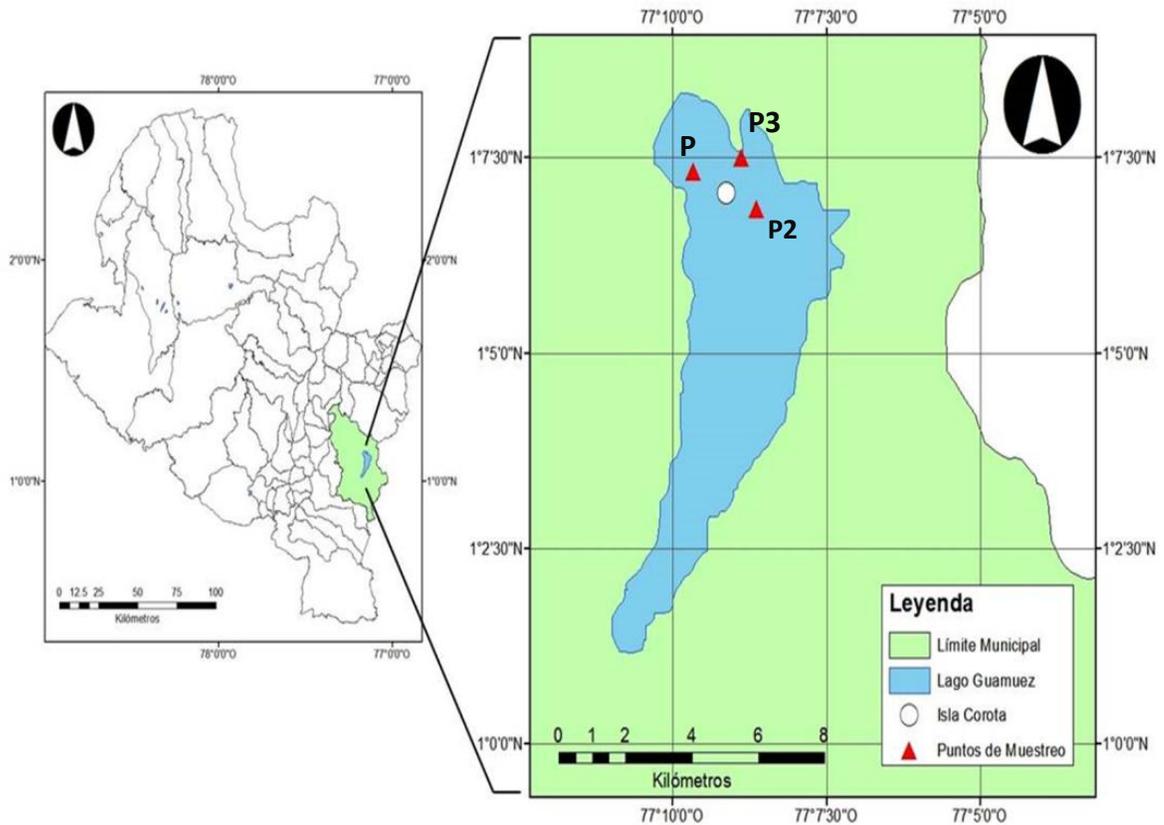


Figura 5. Mapa Lago Guamez indicando los tres puntos de muestreo. Mapa realizado en programa ArcGIS, 10.3. Las coordenadas para cada punto de muestreo fueron: P1: N 01° 08 09.7" W 077° 09 17", P2: N 01° 07 36.2" W 077° 09 25.4" y P3: N 01° 07 42.3" W 077° 09 16".

Fuente: Esta investigación.

#### 4.2 Aislamiento de colifagos somáticos

**4.2.1 Recolección de muestras de agua.** La recolección de las muestras se realizó en frascos estériles, se tomó como muestra un litro de agua a 10 cm de profundidad en tres puntos en cuatro tiempos diferentes a intervalos de tiempo de 6 horas. Los tres puntos fueron seleccionados basando se en los reportes emitidos por la secretaria de medio ambiente en el 2009, siendo el punto 1 el de menor contaminación antropogénica, el punto 2 el que aparentemente tendría mayor influencia, mientras que el punto 3 es un punto intermedio en cuanto a contaminación antropogénica se refiere. Una vez rotuladas, las muestras fueron registradas y llevadas hasta el laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño donde se inició el consiguiente análisis.

**4.2.2 Preparación del medio stock para la cepa hospedera *Escherichia coli* ATCC 13706.** La cepa hospedera *Escherichia coli* (ATCC 13706) se viabilizó en medio de cultivo TSB suplementado con  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,2mM y  $CaCl_2$  5 mM (APHA, 1998), la incubación se realizó entre 12 horas y 18 horas hasta lograr una absorbancia de 0,6. Posteriormente, se tomaron 500  $\mu$ L de la suspensión bacteriana y se trasladaron a un tubo criogénico conteniendo 500  $\mu$ L de glicerol al 60%, el tubo se mezcló por inversión y se repitió este proceso para la construcción de 30 tubos criogénicos, que constituyeron el banco de células primarias de la cepa hospedera. Los tubos fueron almacenados a  $-20^\circ C$  para ser utilizada en los diferentes ensayos que se requirieron durante este estudio.

#### **4.2.3 Procesamiento de muestras de agua para ensayos de detección de colifagos somáticos**

Para Las muestras de agua colectadas en los diferentes puntos del Lago Guamuez, se centrifugaron a 7800 rpm por 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un tamiz de membrana de nitrocelulosa (“Milipore”) 0,22  $\mu$ m y su sobrenadante se utilizó para la detección de colifagos somáticos para ello se trabajó según lo establecido por las normas APHA (1998), de esta manera se inoculo 1 mL de *Escherichia coli* en 10 mL de agar fundido, más 1 mL del sobrenadantes obtenida mediante la filtración; esto se colocó en una caja de Petri estéril y se incubo a  $35^\circ C$  por 24 horas. Como control positivo de infección lítica de colifagos se utilizó el colifago 1.

De cada tipo de muestra se seleccionaron las placas de lisis y se describió las características morfológicas teniendo en cuenta parámetros como forma, tamaño, color, borde y halo de las placas, se les asignó un código teniendo en cuenta el tiempo y punto de muestreo ejemplo: P3T3 (fago aislado en el punto 3 tiempo 3). Cada placa de lisis fue transferida a un tubo de ensayo con 5 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) suplementado con  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,2mM y  $CaCl_2$  5 mM y 1 mL de medio de cultivo con bacteria hospedera *E.coli* ATCC 13706 previamente activada por 2 horas en caldo TSB y agitación continua a  $35^\circ C$ . Cada tubo se incubó a  $37^\circ C$  por 3 horas, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un tamiz de membrana de nitrocelulosa (“Milipore”) 0,22  $\mu$ m y de diámetro 25

mm, la suspensión de fagos fue titulada, conservada a 4°C y protegida de la luz para su posterior caracterización.

**4.3 Titulación de colifagos somáticos aislados.** Para determinación del título fágico, a partir de las suspensiones de fagos, se realizaron diluciones seriadas en solución salina 0,85%. En un tubo con 5,5 mL de TSA suplementado con MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,2mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM, se adicionó 1,0 mL de cultivo de la célula hospedera, 1,0 mL de dilución en solución salina 0,85% estéril y 80 µL de Trifenil tetrazolio, la mezcla fue llevada a una caja de petri estéril, se homogenizó, se esperó solidificar y se incubó a 35°C por 6 a 24 horas, hasta observar placas de lisis.

**4.4 Verificación de infectividad por lisis de colifagos somáticos sobre la bacteria hospedera *Escherichia coli* ATCC 13706.** Para verificar que efectivamente los colifagos somáticos estuviesen lisando las células bacterianas de *E.coli*, en un tubo con 7 mL de TSA suplementado con MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1,2mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM, se adicionó 1,0 mL de cultivo de célula hospedera y se colocó sobre una caja Petri estéril, una vez solidificado el medio se adicionó sobre la superficie 10 µl de suspensión fágica en 5 puntos diferentes y distantes en la caja Petri, se dejó en incubación a 35°C por 12 horas y posteriormente, se verificó la presencia o ausencia de placas de lisis.

#### **4.5. Caracterización de colifagos somáticos**

**4.5.1 Caracterización morfológica y microscópica electrónica de transmisión.** Con el fin de caracterizar microscópicamente los colifagos somáticos aislados a partir de muestras del Lago Guamuez se tomó 1mL de la suspensión fágica con un título superior a 10<sup>8</sup> UFP/mL, cada sobrenadante de cada aislado fue dispensado en tubos eppendorf cubiertos con papel aluminio, fueron empacados, rotulados y enviados al Instituto Adolfo Lutz (Brasil), para su procesamiento microscópico.

La morfología de los fagos se observó mediante la técnica de coloración negativa (Brenner y Horne, 1959), la adhesión de las partículas víricas se realizó en grades de cobre de 300 “malla” recubiertos con formvar y carbón; la grade se colocó en contacto con 50 µL de muestra resuspendida en fosfotungstato de potasio al 2%, pH 6,4 por 10 minutos y el exceso fue retirado con papel filtro. Después de secadas la grades (dos grades por fago) fueron analizadas en la Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, donde fueron examinadas en un microscopio electrónico JEOL EM1011 operado a 60V. Las muestras fueron fotografiadas en un aumento de 150.000X utilizando cámara digital acoplada al sistema de fotodocumentación. Las medidas de los fagos se hicieron mediante las fotografías impresas en papel de alta resolución con la ayuda de un calibrador.

## 4.5.2 Caracterización molecular de colifagos somáticos

**4.5.2.1 Extracción de ácido nucleico.** En este estudio se trabajó con el protocolo **Miniprep para extracción de ácidos nucleicos de fagos (colifagos). Modificación de la técnica de Lockett (1990)**, al que se le realizaron algunas modificaciones ya que bajo las condiciones iniciales planteadas en este protocolo no se logró obtener DNA en la contracción esperada, por tanto la extracción de DNA se realizó partiendo de suspensiones de fagos con títulos aproximados a  $10^8$  UFP/mL; posteriormente a 7 mL de la suspensión de fagos se le adicionó 5  $\mu$ L de RNAsa (20 mg/mL) y 5  $\mu$ L de DNAsa (1 u/ $\mu$ L), se homogenizó la suspensión e incubó a 37 °C por 60 minutos en baño maría. Consecutivamente, se adicionó 20  $\mu$ L de una solución filtrada de ZnCl<sub>2</sub> 2 M; la solución fue homogenizada e incubada a 37°C por 15 minutos. Después de esta etapa la solución fue centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos a 20 °C.

Se descartó la fase acuosa y se resuspendió el *pellet* en 500  $\mu$ L de tampón TES (0,1 M de Tris-HCl pH=8,0, 0,1 M de EDTA y 0,3% de SDS). Se dejó en incubación por 15 minutos a 65 °C y se adicionaron 60  $\mu$ L de acetato de potasio 3 M pH 4. Se homogenizó la mezcla con vórtex y se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó la solución por 5 minutos a 8000 rpm, el sobrenadante fue transferido a un tubo *ependorf* nuevo y estéril, al que se le adicionó lentamente igual volumen de alcohol isopropílico para la precipitación del ácido nucleico; el precipitado fue lavado con 200  $\mu$ L de alcohol etílico y se dejó secar por 15 minutos a 47°C. A continuación, se resuspendió el ácido nucleico en 30  $\mu$ L de agua milliQ y se almacenó a 4°C protegido de la luz. La concentración y calidad del ácido nucleico fueron determinadas mediante electroforesis y espectrofotometría por la relación de absorbancia 260/280 (Sambrook *et al.*, 1989).

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X y como marcador de tamaño molecular se utilizó  $\lambda$  *Hind* III (Promega). La corrida electroforética fue realizada en una cámara de electroforesis (ENDURO™ Gel XL Electrophoresis System) por 2 horas a 70V. Luego el gel se tiñó con bromuro de etidio, se visualizó y registró en un fotodocumentador (Benchtop 3UV transilluminator).

**4.5.2.2 Caracterización del tipo de material genético de fago DNA/RNA.** El tipo de material genético de los colifagos se identificó a través de incubación con DNAsaI o RNAsa A (Promega). Para ello, se colocaron en dos tubos *ependorf* muestras de ácido nucleico conteniendo 200 ng en cada uno. Un tubo se trató con 1U de RNAsa y otro con una 1U de DNAsa. Posteriormente, las muestras se incubaron por un periodo de 30 minutos a 37°C. La enzima fue inactivada por calor a 65°C. Las muestras fueron observadas en un gel de agarosa al 1%, utilizando como marcador de tamaño molecular  $\lambda$  *Hind*III (Promega).

**4.5.2.3 Caracterización de DNA de colifagos utilizando enzimas de restricción.** Las muestras de ácido nucleico de cada uno de los fagos fueron ajustadas a 200 ng/ $\mu$ L y sometidas a digestión a 37°C por las enzimas de restricción: *EcoRI*, *DraI*, *HindIII*, *HinfI*. Para ello se trabajó con un volumen final de 20  $\mu$ L, de los cuales 16,3  $\mu$ L eran de agua desionizada estéril, 2  $\mu$ L de buffer 10X, 0,2  $\mu$ L de BSA (10  $\mu$ g/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) y 0,5  $\mu$ L de enzima de la respectiva enzima de restricción 10U/ $\mu$ L. Con el fin estandarizar esta técnica se realizaron diferentes ensayos en donde se varió el tiempo de incubación. Inicialmente la enzima *EcoRI* se incubó por 3 horas y dos horas para el resto de enzimas con una inactivación a 65°C por 5 minutos (Do Val, 1997; Burbano-Rosero, 2009).

Otro procedimiento realizado fue incubar a una temperatura de 37°C por 2 horas sin una inactivación final teniendo en cuenta las recomendaciones establecidas en protocolo de la marca Promega. Por último se realizó un multicorte (se reemplazó el buffer 10X por el Buffer Multicore 10X) utilizando en conjunto las enzimas *EcoRI* con *HinfI* y *EcoRI* con *DraI*, se dejó en incubación a 37°C por 2 horas. Para todos los procedimientos ensayados se utilizó como control positivo, el DNA de la bacteria hospedera *Escherichia coli* ATCC 13706. El producto obtenido fue inmediatamente observado en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio 0,5 ng/ $\mu$ L, la corrida se realizó a 70 V por 1 hora, buffer TAE y se utilizó como marcador de tamaño molecular  $\lambda$  *HindIII* (Promega)

**4.5.2.4 Caracterización molecular de colifagos somáticos por la técnica de BOX-PCR [BOX-A1R- Based Repetitive Extragenic Palindromic BOX -A1R].** El DNA de cada aislado se sometió a la técnica de BOX-PCR utilizando el primer BOX-A1 (5 'CTA CGG CAA GGC GAC GCT G 3') (Versalovic *et al.*, 1991), técnica que fue estandarizada en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño.

La reacción de BOX fue realizada en un volumen final de 50  $\mu$ L, siendo 10  $\mu$ L de Buffer colorless (Go Taq™ Reaction Buffer – Promega), 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L de solución mix de dNTPs a 2,5 mM (Promega), 2  $\mu$ L del iniciador BOX A1 a 20  $\mu$ M (IDT - Integrated DNA Technologies), 0,25  $\mu$ L de la enzima GoTaq® flexi DNA Polimerase (Promega), 32,75  $\mu$ L de agua milliq-Q y 2  $\mu$ L de DNA ajustado a 100 ng/ $\mu$ L. Para todos los procedimientos ensayados se utilizó como control positivo el DNA de la bacteria hospedera *Escherichia coli* ATCC 13706 y control negativo agua miliq-grado molecular.

Después de la amplificación, 15  $\mu$ L de la reacción de PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) 1,0% (p/v) con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/mL), en tampón TAE 1X a 70 V por 90 minutos. En cada gel, el DNA digerido del fago Lambda *HindIII* (Promega) fue utilizado como marcador de tamaño molecular. El gel fue fotografiado en el sistema de fotodocumentación UVP Digidoc-It™ Imaging System.

**4.5.2.5 Amplificación de genes asociados a islas de patogenicidad en colifagos somáticos.** Se amplificaron los genes *stx<sub>2</sub>*, *terD*, *rfb<sub>0104</sub>*, *fliC<sub>H4</sub>*, *stx<sub>2</sub>* que están asociados a islas de patogenicidad en bacterias. Las condiciones de PCR con las que se trabajó fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94 °C, 30 segundos), annealing (55 °C, 60 segundos), una extensión a 72°C por 60 segundos y la extensión final fue de 72 °C por 5 minutos para los genes *rfb<sub>010</sub>*, *fliC<sub>H4</sub>*, *Stx<sub>2</sub>* y *terD*; para los genes *lt* y *st* se trabajó bajo las condiciones propuestas por Burbano-Rosero (2009): desnaturalización inicial 95°C (5 minutos), 40 ciclos de desnaturalización (95 °C, 40 segundos), annealing (58°C, 60segundos), extensión (72 °C, 2 minutos), y extensión final (72°C, 7 minutos) (Tabla 1). Para la amplificación de todos los genes se utilizó como control negativo agua miliq-grado molecular, para la amplificación de los genes *lt* y *st*, se usó como control positivo el DNA del fago 1. Para los otros genes desafortunadamente, a pesar de su solicitud en laboratorios de referencia, fue difícil su consecución por la gran cantidad de permisos para su transporte a nivel de aduanas nacionales, al tratarse de este de material biológico.

**Tabla 1. Secuencias de *Primers* para amplificación de genes asociados a factores de virulencia en colifagos somáticos**

“Primer”	Secuencia (5´-3´)	Ciclos de amplificación	Producto (pb)
0104rfb0-f	TGAACTGATTTTTAGGATGG		
0104rfb0-r	AGAACCTCACTCAAATTATG		<i>rfb<sub>0101</sub></i> (351)
fliCH4-a	GGCGAAACTGACGGCTGCTG	94°C, 5 min/ 30 ciclos de	
fliCH4-b	GCACCAACAGTTACCGCCGC	desnaturalización(94°C,	<i>fliC<sub>H4</sub></i> (201)
LP43	ATCCTATTCCC GGGAGTTTACG	30 s), annealing (55°C, 60	
LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC	s),extensión (72°C, 60 s),	<i>Stx<sub>2</sub></i> (584)
TerD1	AGTAAAGCAGCTCCGTCAAT	y extensión final (72°C, 5	
TerD2	CCGAACAGCATGGCAGTCT	min	<i>terD</i> (434)
LT	GGCGACAGATTATACCGTGC		<i>lt</i> (450)
-F		95°C-5min/40 ciclos de	
LT-R	CGGTCTCTATATTCCCTGTT	desnaturalización (95°C,	
ST-F	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	40s), “annealing” (58°C,	<i>st</i> (190)
ST-R	CACCCGGTACARGCAGGATT	60s), extensión (72°C-	
		2min), y extensión final	
		(72°C, 7min)	

Fuente: Burbano-Rosero, 2009 y Bielaszewska *et al.*, 2011.

**4.5.2.6 Secuenciación de los productos de la amplificación de los genes *st* y *lt*.** La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  (8  $\mu\text{L}$  de agua “miliq”, 4  $\mu\text{L}$  de tampón 5x, 2  $\mu\text{L}$  de *primer* en una concentración de 1,6  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  de muestra a 20 ng/ $\mu\text{L}$ ). Las reacciones fueron realizadas en un termociclador (MULTIGENE) en tubos “eppendorf” de 0,2 mL.

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,5 ug/mL), el gel se corrió en “buffer” TAE 1X por 1 horas a 70 V utilizando como marcadores de tamaño molecular *low DNA mass ladder* (Promega) y 100 pb (Promega). Los fragmentos de DNA se visualizaron en un fotodocumentador “*Benchtop 3UV transilluminator*” y la imagen capturada fue guardada en formato.tiff para su posterior análisis. Los amplificados se enviaron a la empresa “Macrogen” (Corea), donde el proceso de secuenciación usó el método de Sanger y colaboradores (1977), utilizando termocicladores “BigDye”, las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador Engine Tetrad 2 (BIO-RAD), los productos se purificaron por precipitación etanólica y se inyectaron para electroforesis en un secuenciador automatizado ABI3730XL.

**4.5.2.7 Edición y análisis de secuencias.** Las secuencias de los genes asociados a la virulencia de los colifagos somáticos caracterizados, fueron editadas en el programa *Chromas Lite 2.1.1*. Se alinearon con el programa *Bioedit* (Thompson *et al.*, 1994) y se compararon con las base de datos del NCBI [*National Center for Biotechnology Informacion*]

**4.5.2.8 Construcción de dendrograma a partir de los fragmentos generados por BOX-PCR.** El análisis del agrupamiento se realizó con el coeficiente de similaridad simple, Dice y Jaccard siguiendo el límite de tolerancia del 1% y usando el programa “NTSYS” versión 2.11 F, serial UH3071IX. Después de ser generados los tres, se eligió el que más se aproximaba con las muestras, lugares de muestreo y cruce de información relevante con las características de los colifagos somáticos aislados.

**4.6 Análisis estadístico.** Se utilizó el método no paramétrico de kruskal-wallis para determinar si existen diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Caracterización físico-química de muestras de agua del Lago Guamuez

En este estudio se analizó un total de 12 muestras de agua, de tal manera que para cada uno de los tres puntos de muestreo se tomaron 4 muestras de agua en diferentes tiempos; de esta manera y teniendo en cuenta lo fundamental que pueden resultar los parámetros físico-químicos para entender la dinámica de crecimiento como también la expresión lisogénica o lítica en relación con las características ambientales donde el virus se encuentre, se analizaron los resultados proporcionados por el Laboratorio de Aguas de la Universidad de Nariño, acreditado ante la Superintendencia de Industria y Comercio. Los datos permitieron establecer que no existieron diferencias significativas entre los valores para cada uno de los parámetros estudiados como era lo esperado, sin embargo estos datos servirán como base para nuevos estudios que se realicen en esta zona (Anexo 1 y 2).

En el anexo 1 y 2 se detallan los parámetros físico-químicos se mantiene sin variaciones significativas, por ejemplo la fluctuación de la temperatura siempre se encontró entre 17.1 y 17.9°C, pH entre 8 y 8.3, sólidos totales en 44mg/L, es decir en general todos los datos se mantienen con pequeñas variaciones que según las pruebas estadísticas aplicadas no son significativas, por lo que las bacterias y virus en los tres puntos presentan similares condiciones para su crecimiento, según Sundberg y colaboradores (2004) hacen énfasis en que parámetros como pH y temperatura van de la mano y son esenciales que permanezcan en un rango óptimo para el crecimiento de microorganismos como las bacterias mesófilas y los bacteriófagos.

En cuanto a la conductividad que en promedio es de 43,4 mS/cm, es un valor que está dentro del rango de normal conductividad para afluentes según lo reportado por Roldan y Ramírez (2008), de esta manera los datos indican la presencia de sólidos disueltos en estado iónico como los macronutrientes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Los nitritos y nitratos se encontraron en los rangos normales para lagos oligotróficos al igual que el análisis del Oxígeno disuelto que se reportan entre 6.0 y 8.0 mg/L, correspondiente a un porcentaje de saturación del 93% que indica que el agua está subsaturada contribuyendo al que las comunidades acuáticas se mantengan en este medio.

En relación a los valores del ion fósforo se encontró un valor muy superior con respecto al rango considerado como normal para aguas naturales (0.02 mg/L), para los tres puntos de estudio se encontró altos valores que oscilan entre 3.2 y 5.8 mg/L lo que indica un alto grado de contaminación resultado del uso de fertilizantes fosforados y detergentes, aunque también se puede producir por estiércol y heces. Resultados que contrastan con lo reportado por García *et al* 2001, que según su estudio mencionan que desde el 2001 y 8 años atrás los valores más altos de fósforo reportados eran de 0.11 mg/L esto hace pensar que el aumento en la instalación de jaulas flotantes durante los últimos años al igual que la alta demanda de fertilizantes para los cultivos

que se tienen en la zona hayan causado estos graves problemas de contaminación, lo cual hace que esta agua no sea recomendada para el consumo humano sin previo tratamiento de desinfección, en conformidad con los criterios de calidad estipulados por el Decreto Colombiano 1575 de 2007, por el cual se establece el sistema para la protección y control de la calidad del agua para el consumo humano.

## **5.2 Aislamiento de colifagos somáticos**

**5.2.1 Detección de colifagos.** En este estudio se logró aislar un total siete colifagos somáticos, para los diferentes puntos y tiempos de muestreo (Tabla 2). Estos datos se contrastan con los recuentos realizados para bacterias mesófilas en los mismos puntos y tiempos de muestreo ya que en el punto 2 se encuentra el mayor número de bacterias mesófilas, mientras que en este mismo punto solo se logró aislar un colifago; en cuanto al punto 1 presentó la media más baja  $3,8 \times 10^5$  UFC/mL, en comparación con el punto 3 que fue intermedio  $3,4 \times 10^6$  UFC/mL en estos dos últimos puntos a pesar de presentar el recuento más bajo de bacterias mesófilas fue en donde mayor número de colifagos somáticos se encontró. En el caso del punto 1 donde inicialmente se pensaba que podría tener menor incidencia de contaminación antropogénica por estar cerca a zonas poco pobladas resultó que la contaminación que se está generando también presenta un alto valor tanto de bacterias como de colifagos.

En Colombia, al igual como sucede en otros países de América Latina, la ausencia de un sistema de manejo eficiente de excretas y otros residuos domésticos han conllevado a la contaminación de los cuerpos de agua generando graves problemas de salubridad (González *et al.*, 2003). El hecho de que éstos colifagos somáticos se encuentren presentes en la zona de estudio implica que la contaminación microbiológica puede generar un riesgo para la salud humana, pues al ser utilizada esta agua como riego en los diferentes cultivos, tanto de frutas como de hortalizas es a través del consumo de las mismas, que se puede generar infecciones gastrointestinales. De igual manera, el bajo número de colifagos somáticos puede presentarse debido a la especificidad de los fagos, que son incapaces de replicarse en el entorno sin su célula hospedera, sin embargo, al generarse las condiciones óptimas de crecimiento estos colifagos pueden proliferarse con facilidad (Sundram *et al.*, 2002), convirtiéndose en vehículos de intercambio genético entre diferentes bacterias, en ambientes acuáticos naturales, así como participantes en la transmisión de genes que pueden otorgar resistencia a ciertas características beneficiosas a los hospederos (Abedon, 2008).

**Tabla 2. Recuentos de bacterias mesófilas y número de colifagos somáticos aislados de las muestras de agua del Lago Guamuez**

Muestra	Recuento de bacterias mesófilas UFC/mL			Número de colifagos somáticos aislados		
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 1	Punto 2	Punto 3
Tiempo 0	1,0E+05	1,8E+09	1,3E+03	1	-	1
Tiempo 1	1,0E+05	2,0E+07	1,4E+07	1	-	-
Tiempo 2	3,2E+05	1,4E+09	1,0E+06	1	1	-
Tiempo 3	1,0E+06	1,0E+07	1,8E+06	-	-	1
Tiempo 4	4,0E+05	8,0E+04	2,6E+04	-	-	1
Media	3,84E+05	6,46E+08	3,37E+06			

Fuente: Esta investigación.

Aunque es claro que los virus transmitidos por vía hídrica, representan una amenaza para la salud pública, en la mayoría de las normativas su detección no ha sido considerada como hídrica. Por lo general, se analiza únicamente la presencia de indicadores bacterianos, cuya desventaja es que no reflejan el comportamiento de patógenos virales, ni de otros parásitos como protozoarios (Borrego *et al.* 1987, Vivier 2004).

Parte de las razones que han llevado a excluir a los virus en el análisis de aguas, es que estos presentan una baja concentración aún en grandes volúmenes de agua, lo cual los hace difíciles de detectar en muestras ambientales (Reynolds, 2001). Además, aunque los métodos para la detección de virus en aguas han mejorado, ellos suelen ser muy laboriosos, como es el caso del cultivo celular (Campos-Pinilla. *et al.*, 2008).

No obstante, debido al riesgo para la salud que implica la presencia de virus entéricos en las aguas, así como por el incremento en los brotes de origen hídrico asociados a virus, es importante contar con metodologías de detección viral, rápidas y económicas, principalmente en países en desarrollo. Dentro de las opciones, existen metodologías basadas en el uso de indicadores virales, como los colifagos, cuya presencia se correlaciona con la existencia de virus entéricos patógenos de humanos (OMS, 2012).

En términos generales se afirma que la presencia de estos colifagos somáticos en el Lago Guamuez es un indicio de la contaminación antropogénica que se está generando sin control y atención por parte de las entidades gubernamentales en este lago, lo cual puede ser una de las causas de los altos problemas de salubridad en la zona evaluada, ya que los colifagos somáticos pueden ser vehículos de intercambio genético entre diferentes bacterias, en ambientes acuáticos

naturales, así como pueden participar en la transmisión de genes que pueden otorgar resistencia o ciertas características beneficiosas a los hospederos (Abedon, 2008).

### 5.3 Caracterización de colifagos somáticos

**5.3.1 Caracterización morfológica y microscópica de colifagos somáticos.** En este estudio se analizaron 8 colifagos somáticos incluyendo el colifago 1 que fue utilizado como control positivo. Todos los colifagos aislados presentaron diferente morfología en cuanto a las placas de lisis, su tamaño oscila entre 0.8 mm y 6 mm de diámetro, la presencia o ausencia de halo, la forma de los bordes al igual que el código que se les asignó dependiendo del punto y tiempo en el cual fueron aislados, se describen en la Tabla 3, la morfología se observa en la Figura 6.

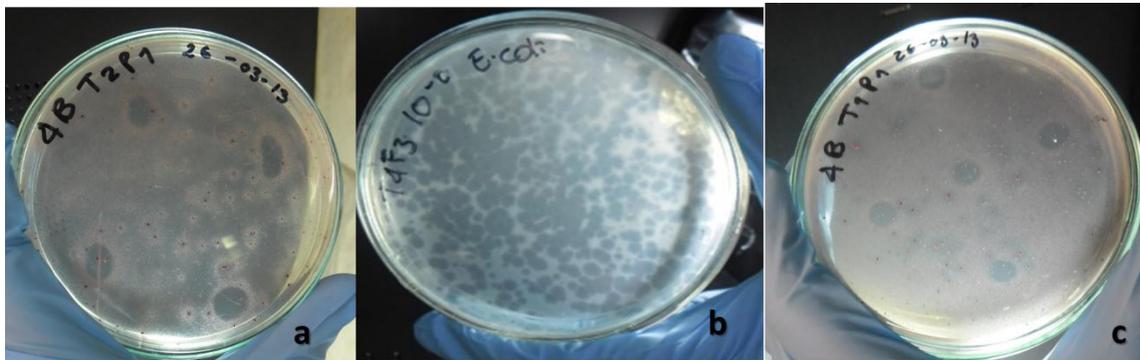


Figura 6. Colifagos somáticos. A. Recuento de colifagos en agar TSA modificado (APHA, 1998); B. Verificación del título para extracción de DNA; C. Verificación de Infectividad de colifagos en *Escherichia coli* ATCC13706.

Fuente: Esta investigación.

**Tabla 3. Características morfológicas macroscópicas de colifagos somáticos aislados en el Lago Guamuez y Colifago control.**

<b>Código de registro en el laboratorio de Biotecnología Microbiana</b>	<b>Punto de recolección</b>	<b>Tiempo de Tiempo de recolección</b>	<b>Diámetro mm de la placa de lisis</b>	<b>Borde</b>
<b>Fago 1 control</b>	Santos Brasil		2	Rugoso
<b>Fago 2</b>	3	0	1.0	Liso
<b>Fago 3</b>	1	0	3.0	Liso
<b>Fago 4</b>	3	3	2.0	Liso
<b>Fago 5</b>	2	1	6.0	Liso
<b>Fago 6</b>	3	4	0.8	Liso
<b>Fago 7</b>	1	2	1.0	Liso
<b>Fago 8</b>	1	1	4.5	Liso

Fuente: Esta investigación.

El crecimiento de los fagos en medios semisólidos puede considerarse como una aproximación de la capacidad de éstos de esparcirse en medios naturales estructurados, tales como biopelículas, mucosas, etc, donde las bacterias se encuentran inmersas en la matriz, en un orden determinado o al azar, con una capacidad de movimiento limitada (Abedon & Culler, 2007, Abedon, 2008). Esta capacidad de propagación se ve reflejada en el tamaño de las placas de lisis, ya que un gran tamaño de placa puede deberse a una o varias de estas características: una buena capacidad de difusión del fago en medio semisólido, buena capacidad de adhesión a la bacteria hospedera, un gran tamaño de explosión (liberación de un gran número de partículas de fago por cada bacteria infectada), o un tiempo de latencia corto (rápida liberación de la progenie) (Abedon, 2008, Dini, 2011).

Un aspecto también analizado fue la aparición de halos alrededor de las placas de lisis. Estos halos son zonas claras alrededor de las placas cuya aparición se atribuye a la difusión de depolimerasas que rompen la cápsula de las bacterias disminuyendo la opacidad del césped bacteriano (Bessler *et al.*, 1975, Kwiatkowski *et al.*, 1982, Tomlinson & Taylor, 1985, Hughes *et al.*, 1998). La formación de halos es una característica deseable en fagos elegidos como agentes terapéuticos, ya que en patógenos como STEC y EHEC, la cápsula está descrita como un factor de virulencia (Russo, 2002) y se ha reportado que incrementa la adhesión de la bacteria a determinadas superficies (Hassan & Frank, 2004, Sharma *et al.*, 2005, Dini, 2011).

El agrupamiento de los fagos en familias al igual que los tipos se realizó teniendo en cuenta las fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica y las claves taxonómicas de Ackermann, 2006 (Tabla 4, Figura 7). Para algunos colifagos (3, 5, 6 y 7) fue necesario realizar

una modificación en el proceso de adherencia en el material fágico a la grade de carbón, en razón de ello se utilizó el reactivo *asian blue* por treinta minutos de impregnación para lograr la observación de partículas fágicas de forma nitida que permitan su clasificación taxonómica. Los fagos aislados pertenecieron al orden caudovirales dentro de las familias *Siphoviridae* (57.14%), *Myoviridae* (28.57%) y *Microviridae* (14.29%). Los miembros de estas familias han sido ya reportados y vinculados a ambientes acuáticos y a polución fecal. En un estudio realizado por Doval en el año 1997, en cuerpos de agua dulce, se aisló y analizó 49 colifagos, esta investigación reveló la presencia de las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae* en las muestras de agua de ríos, lagos y nacientes, y las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae* en muestras de material fecal.

El presente estudio, al igual que el realizado por Ackermann en el año 1996 soportan la frecuencia de aislamiento de colifagos con cauda, confirmando que el 96% de los virus bacterianos existentes en la literatura poseen cauda e que apenas el 4% son cúbicos, filamentosos o pleomórficos. Ackermann, señala que los fagos con cauda están desigualmente distribuidos en el ambiente entre las familias: *Myoviridae* (24.5%), *Siphoviridae* (61.7%) y *Podoviridae* (13.9%) y que apenas 15% de los fagos con cauda poseen cabeza elongada.

Las dimensiones de los colifagos reportadas en este estudio, corresponden a aquellas de los fagos para enterobacterias reportadas en la literatura (Ackermann, 1976; Ackermann & Nguyen, 1983; Ackermann, 2006; Burbano-Rosero, 2009).

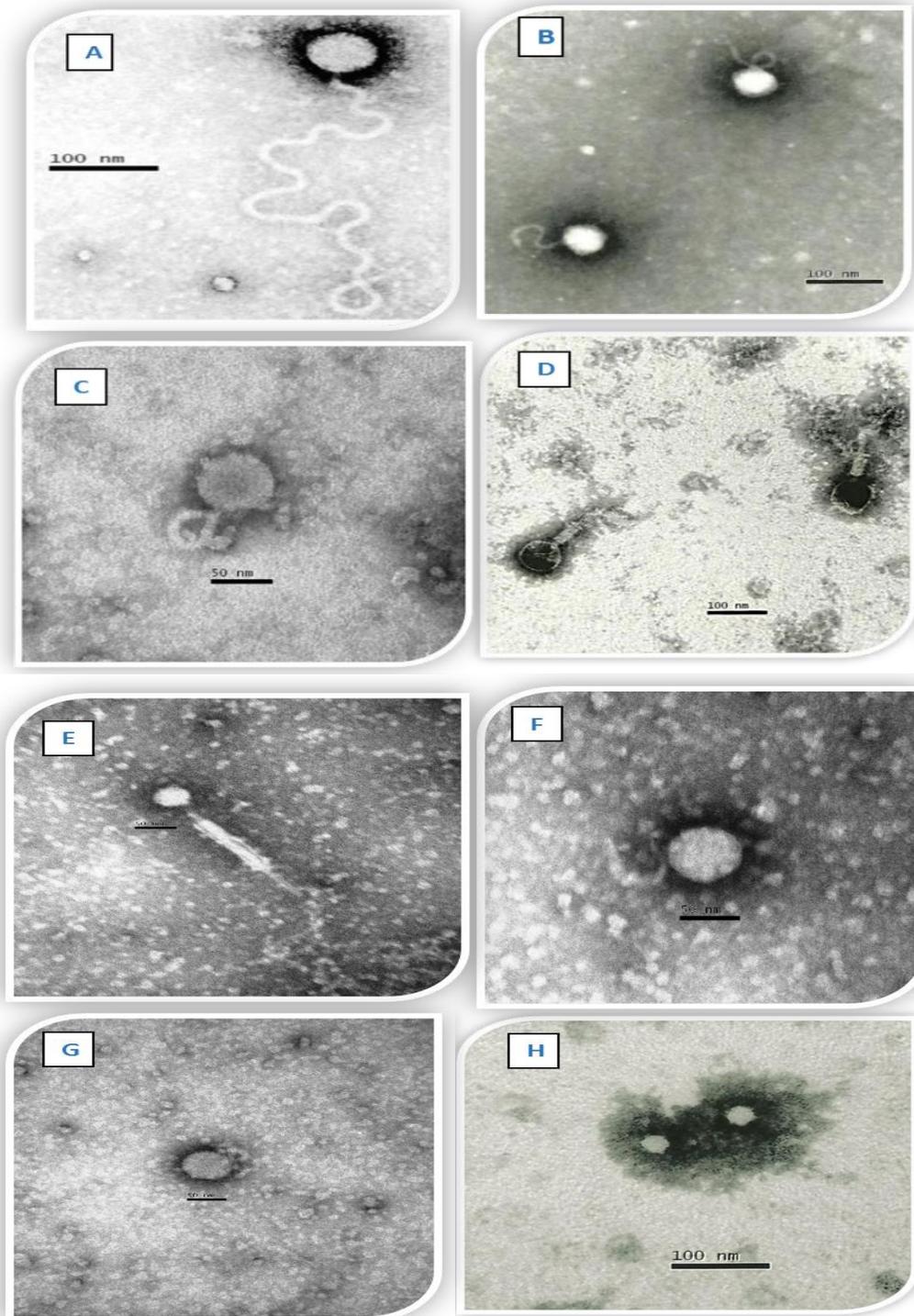


Figura 7. Microfotografía electrónica de transmisión (MET) de colifagos usando tinción negativa. A. Colifago somático 1 control, Familia *Siphoviridae*, (tipo T1). B. Colifagos somático 2, Familia *Siphoviridae* (tipo T1). C. Colifago somático 3, Familia *Microviridae* tipo XΦ174 (F3). D. Colifago somático 4, Familia *Myoviridae* (tipo Yer A1). E. Colifago somático 5, Familia *Myoviridae* con cauda contráctil. F. Colifago somático 6, Familia *Siphoviridae* (tipo T1). G. Colifago somático 7, Familia *Siphoviridae* (tipo T1). H. Colifago somático 8, Familia *Microviridae* tipo XΦ174 (F3).

Fuente: Esta investigación.

**Tabla 4. Familia, tipo y media aritmética del tamaño de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez. LCB x ACB: Largo de la cabeza Vs Ancho de cabeza. LC x AC: Longitud de la cauda Vs Anchura de cauda**

Código de asignación	Familia	Punto de aislamiento	Tiempo de aislamiento	Tipo	LCB x ACB (nm)	LC x AC (nm)
Colifago control 1	<i>Siphoviridae</i>	Santos, Brasil		T1	70 x 68	995
Colifago 2	<i>Siphoviridae</i>	P3	T0	T1	55x 64	20x 1
Colifago 3	<i>Microviridae</i>	P1	T0	XΦ174 (F3)	66,6 x64	133 x 9
Colifago 4	<i>Myoviridae</i>	P3	T3	Yer A1	77 x 62	13 x 2
Colifago 5	<i>Myoviridae</i>	P2	T1	Cauda contráctil	45 x 43.3	241.6 x 9 33.3
Colifago 6	<i>Siphoviridae</i>	P3	T4	T1	63 x63	109 x 9
Colifago 7	<i>Siphoviridae</i>	P1	T2	T1	67 x 67	51 x 7
Colifago 8	<i>Microviridae</i>	P1	T1	XΦ174 (F3)	55 x 64	-

Fuente: Esta investigación.

Para la detección de colifagos se han desarrollado una serie de métodos como la inducción de liberación de β-galactosidasa (Stanek & Falkinham 2001), bioluminiscencia (Guzmán et al. 2009) y fluorescencia (Salter *et al.* 2010), entre otros. Sin embargo, los protocolos de referencia siguen siendo por su efectividad, los métodos de capa doble de agar y capa simple de agar, que son más económicos. Los métodos de observación macroscópica de colifagos como el recuento en placa, ya sea por capa doble o simple han sido estandarizados para el análisis de colifagos somáticos, normas: 9224 C y 9224 E (APHA 2005), 1602 (EPA 2001), y el método ISO 10705–2 (ISO 1999), los cuales han sido aplicados en muchos laboratorios con algunas variaciones. Estas se basan en la determinación de la concentración viral, mediante el recuento de unidades formadoras que placas lo que nos permite dilucidar la presencia de colifagos somáticos en un medio determinado.

De igual manera Ackerman (2012) afirma que la contribución principal de la microscopía electrónica para la investigación de bacteriófagos, es la técnica de tinción negativa ya que más de 5.500 virus bacterianos hasta esa fecha se habían podido caracterizar por microscopía electrónica, por lo que los bacteriófagos, al menos sobre el papel, es el grupo viral más grande en existencia.

Igualmente este autor junto a Nguyen (1983) afirman que la identificación de bacteriófagos por microscopia electrónica es una técnica simple y rápida, además mediante las microfotografías electrónicas obtenidas se puede detallar la estructura de las partículas virales tales como los picos y las fibras de la cola de colifagos como los de la familia *Myoviridae*, convirtiéndose así en una técnica eficiente en cuanto a la caracterización de colifagos somáticos.

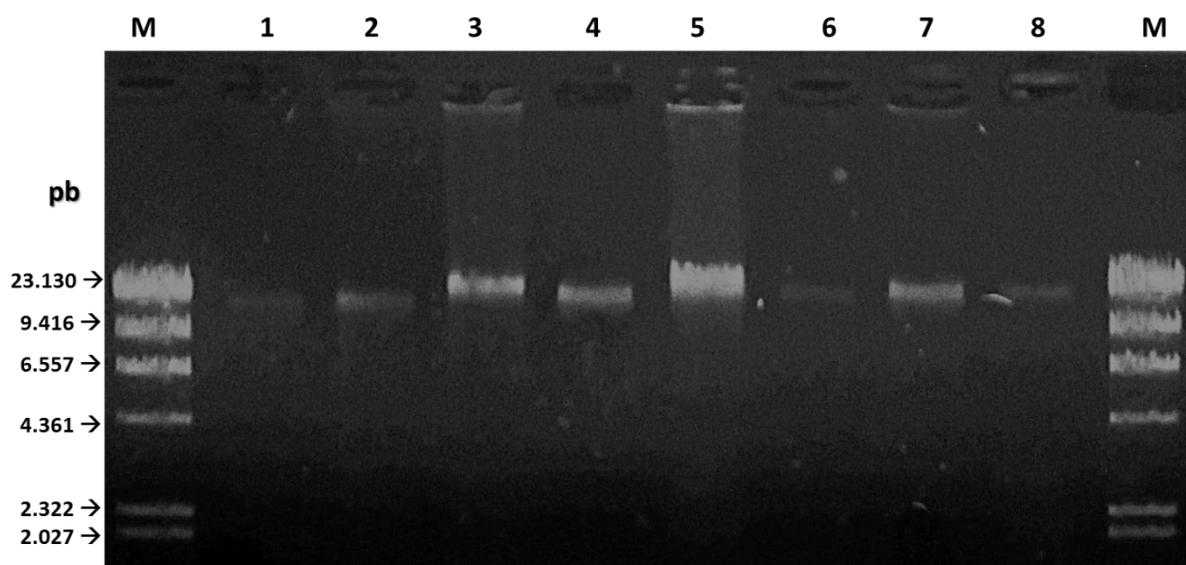
Mediante la microscopia electrónica de transmisión se ha podido observar que los colifagos presentan una cápside o una envoltura proteica que contiene el material genético. La cápside puede contener y estar unida a la cola. Estos se encuentran clasificados dentro de las siguientes familias: *Myoviridae* (DNA doble cadena, cola larga y contráctil, cápside de 100 nm), *Siphoviridae* (ADN doble cadena, cola larga no contráctil, cápside de 50 nm), *Podoviridae* (DNA doble cadena, cola corta no contráctil, cápside de 50 nm) y *Microviridae* (ADN cadena sencilla, no presenta cola, cápside de 30 nm). Estos tipos de colifagos han sido reportados en varios estudios de cuerpos de agua como familias relacionadas con contaminación antropogénica, sin embargo, los más abundantes son *Myoviridae* y *Siphoviridae* (Ackermann 1983; Muniesa *et al.* 2002, Okafor, 2011) esto confirma los resultados obtenidos en este estudio donde se identifican tres de las cuatro familias de colifagos reportados por Ackermann (1983) y Muniesa *et al.* (2002) como indicadores potenciales de contaminación fecal.

Los colifagos reportados en este estudio comparten muchas características en común, como lo es la composición de su ácido nucleico, afinidad de bacteria hospedera y modo de replicación, lo cual los puede hacer comportarse de manera similar en cuanto a su persistencia ambiental, su comportamiento ante las tensiones ambientales, variación estacional y grado de resistencia a la cloración. Resultados similares fueron encontrados por (Cole, 2003; Brezina & Baldini, 2008; Okoh *et al.* 2010).

Existen un innumerable número de trabajos que estudian la distribución de fagos en el medio ambiente utilizando la microscopia electrónica de transmisión, sin embargo esta técnica tiene sus limitaciones, no proporciona información clave con respecto a la infectividad de fagos, su variabilidad y sus células hospederas, datos que son de suma importancia en el momento de verificar la infectividad del colifago sobre su hospedero, asimismo es importante utilizar metodologías complementarias que permitan una mejor caracterización de los virus como bioindicadores de contaminación antropogénica y variabilidad genómica (Ackermann, 1974; Ackermann, 1976; Ackermann, 1983; Ackermann, 1992; Ackermann & Gerhman, 1992; Ackermann *et al.*, 1994a; Ackermann *et al.*, 1994b; Ackermann, 1996; Ackermann & Dubow, 1987; Ackermann *et al.*, 1997; Ackermann *et al.*, 1998; Ackermann, 1999; Ackermann, 2001; Abessa *et al.*, 2005; Ackermann, 2006; Abedon, 2008; Brezina & Baldini, 2008; Burbano-Rosero, 2009; Okoh *et al.* 2010; Ackermann, 2012).

## 5.4 Caracterización molecular de colifagos somáticos

**6.4.1 Extracción de DNA de colifagos somáticos.** Las modificaciones generadas en el protocolo Miniprep para extracción de ácidos nucleicos de colifagos permitió que se obtuviera como resultado un DNA puro y en altas concentraciones.



*Figura 8.* Extracción de DNA de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez. **Pozo M:** Marcador molecular  $\lambda$  *Hind* III; **Pozo 1:** Colifago 1 control, **Pozo 2:** Colifago 2, **Pozo 3:** Colifago 3, **Pozo 4:** Colifago 4, **Pozo 5:** Colifago 5, **Pozo 6:** Colifago 6, **Pozo 7:** Colifago 7, **Pozo 8:** Colifago 8, **Pozo M:** Marcador  $\lambda$  *Hind* III. Electroforesis realizada con gel de agarosa al 1%.en buffer TAE 1X, corrida por 1 hora a 70V.

**6.4.2 Caracterización del tipo de material genético de fago DNA/RNA.** La caracterización del material genético de los colifagos somáticos (DNA/RNA) corroboró la información obtenida con la microscopia electrónica, ya que las familias encontradas en este estudio, tienen como material genético DNA, de tal manera que al someter el DNA con la enzima RNAsa, el material genético no se degradó (Figura 9), caso contrario fue el observado cuando se trató con DNAsa, donde ninguna banda fue visible cuando se corrieron las muestras en electroforesis, comprobando que el material fue degradado por la enzima.

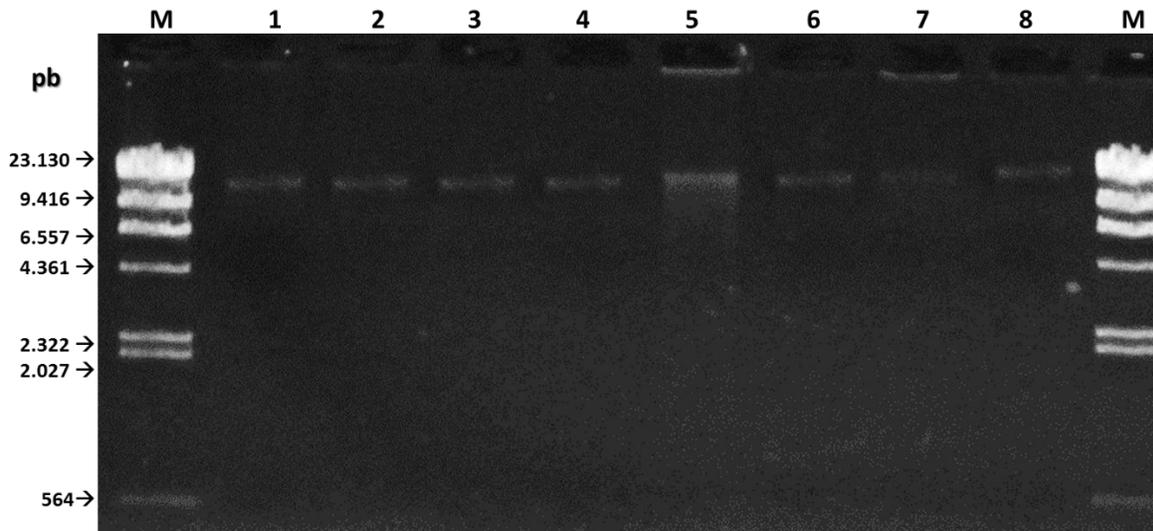


Figura 9. Caracterización del tipo de material genético de fago DNA/RNA de colifagos somáticos aislados a partir de muestras de agua del Lago Guamuez. **Pozo M.** Marcador molecular  $\lambda$  *Hind* III; **Pozo 1:** Colifago 1 control, **Pozo 2:** Colifago 2, **Pozo 3:** Colifago 3, **Pozo 4:** Colifago 4, **Pozo 5:** Colifago 5, **Pozo 6:** Colifago 6, **Pozo 7:** Colifago 7, **Pozo 8:** Colifago 8, **Pozo M:** Marcador  $\lambda$  *Hind* III. Electroforesis realizada con gel de agarosa al 1%. en buffer TAE 1X, corrida por 1 hora a 70V.

Fuente: Esta investigación.

#### 5.4.2 Caracterización molecular por BOX-PCR [BOX-A1R- *Based Repetitive Extragenic Palindromic* BOX -A1R].

Tanto los siete aislados de colifagos somáticos como el fago 1 Control, amplificaron secuencias correspondientes al elemento BOX, la técnica repetida dos veces permitió observar los mismos padrones polimórficos observados inicialmente en los aislados que amplificaron (Figura 10). Los productos obtenidos en cuanto a su tamaño fluctúan entre 153 pb a 1037 pb. Se observó fragmentos comunes de 740 pb y 538 pb en él 62.5% al igual que un fragmento de 1037 pb en el 37.5 % de los aislados de colifagos somáticos de diferente familia taxonómica. Es evidente que los colifagos 4,6,7y 8 comparten el mismo perfil genético, mientras que los colifagos 2, 3 y 5 muestran cada uno de ellos un perfil diferente.

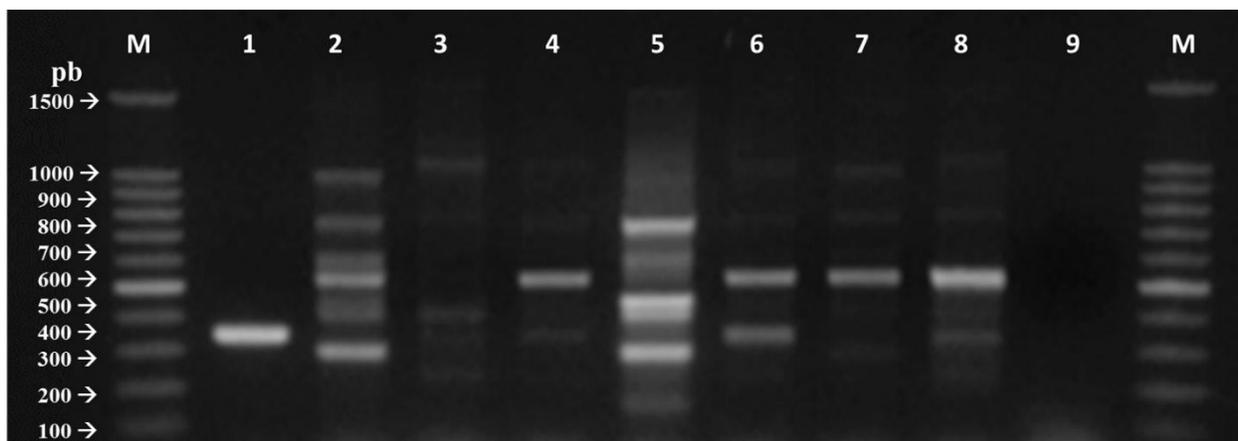


Figura 10. Perfil molecular obtenido con BOX-PCR de los aislados de Colifagos somáticos. **Pozo M:** Marcador molecular 100pb; **Pozo 1:** Colifago 1 control, **Pozo 2:** Colifago 2, **Pozo 3:** Colifago 3, **Pozo 4:** Colifago 4, **Pozo 5:** Colifago 5, **Pozo 6:** Colifago 6, **Pozo 7:** Colifago 7, **Pozo 8:** Colifago 8, **Pozo 9:** Coltrol negativo con agua. **Pozo M:** Marcador 100pb. Electroforesis corrida en buffer TAE 1X, gel de agarosa al 1%, tiempo de corrida: 1,5 horas a 70V.

Fuente: Esta investigación.

El dendrograma seleccionado para el análisis de datos, fue el generado con el uso del coeficiente de DICE- (Figura 11), en esta figura se observa en forma global la similitud genética que comparten las muestras analizadas (10%), se generan un cluster con 35 % de similitud, agrupando los colifagos 4 (*Myoviridae*), 6 (*Siphoviridae*), 7 (*Siphoviridae*), 8 (*Microviridae*) y el fago 1 control también de la familia *Siphoviridae*. De la misma manera en este dendrograma podemos detallar que el colifago 1 que fue utilizado como control en este estudio tiene un 30% de similitud con respecto a los colifagos de la familia *Microviridae*, *Myoviridae* y con los colifagos 6 y 7.

Los colifagos 2 y 3, pertenecientes a la familia *Siphoviridae* se encuentran agrupados bajo un cluster con el 45% de similitud genética, los dos son de puntos diferentes, punto 3 y punto 1, respectivamente. Es evidente verificar mediante el dendrograma que el colifago 5 (*Myoviridae*), permanece aislado de las agrupaciones generadas en los subclusters, datos que son compatibles con los perfiles genómicos obtenidos por BOX-PCR, como también en la caracterización microscópica a nivel de cauda y cabeza y la caracterización basada en la morfología de la placa de lisis; todos los datos corroboran sus características diferenciales con respecto a los otros colifagos somáticos.

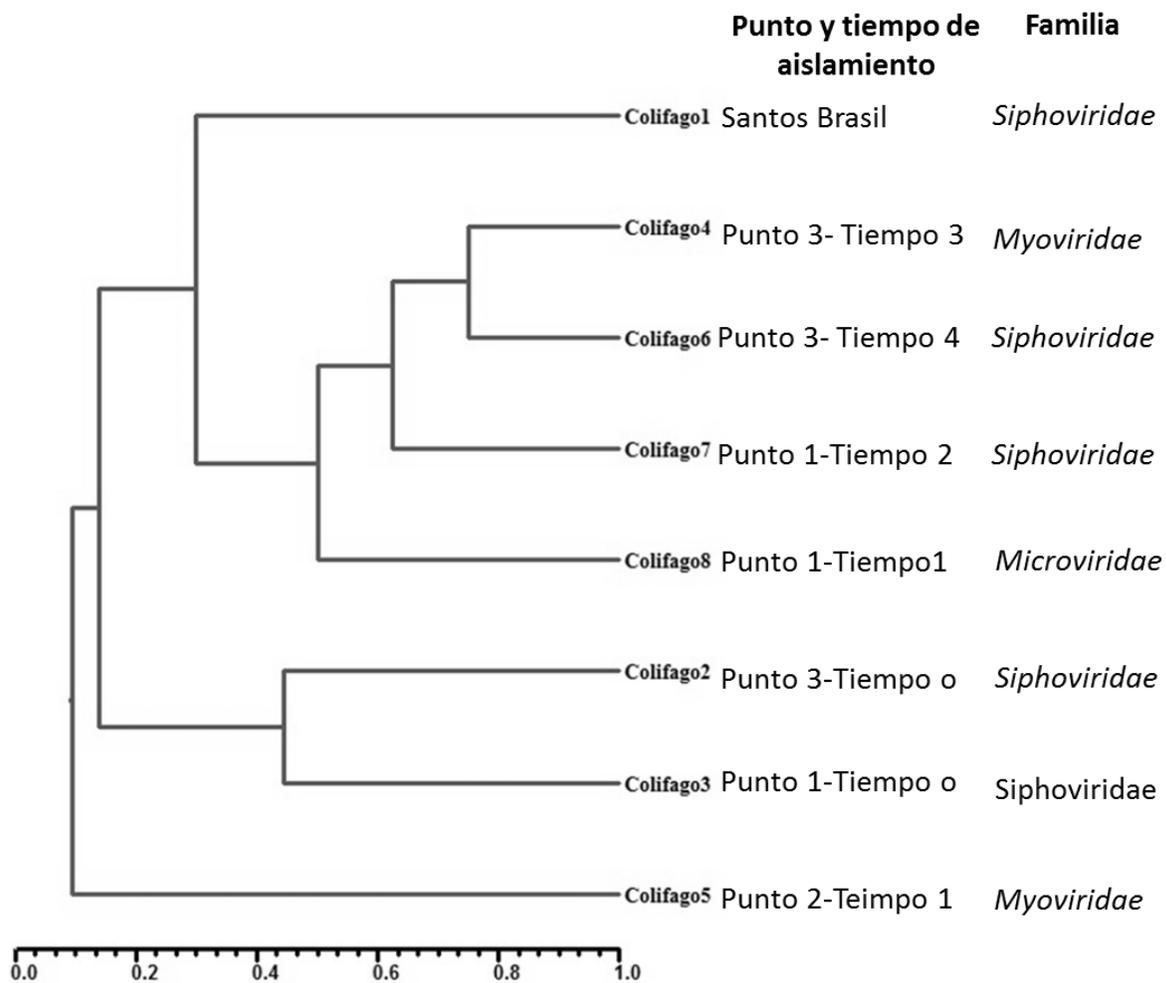


Figura 11. Dendrograma de muestras de colifagos somáticos provenientes del Lago Guamuez. La relación entre los aislamientos se estimó por medio de bandas de DNA polimórficas y monomórficos puntuables. Los perfiles genéticos fueron analizados utilizando el programa NTSYSpc versión 2.11f. La matriz de similaridad genética entre los aislados fue construida utilizando el coeficiente de DICE y los agrupamientos fueron realizados con el algoritmo de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*).

Fuente: Esta investigación.

Box-PCR ha sido utilizada como herramienta importante para determinar variación genética entre un extensivo rango de especies bacterianos y colifagos somaticos, a pesar que esta técnica no tienen información de la funcionalidad, y son repeticiones altamente conservadas de elementos de DNA (Belkum y Hermans, 2001).

Esta técnica fue utilizada con el fin de establecer una relación genética entre los colifagos somáticos, ya que ha demostrado en algunos estudios ambientales, una alta capacidad discriminatoria, reproducibilidad, facilidad de ejecución y rentabilidad en el genotipado (Burbano-Rosero, 2009; Dini *et al.*, 2010; Dini, 2011)

Para este estudio se encontró que el 100% de las muestras amplificaron para BOX-PCR, la diversidad de las huellas dactilares de los 8 colifagos somáticos no son muy complejos, el genotipo de cada uno de ellos se pudo distinguir de acuerdo a la distribución de las bandas obtenidas de acuerdo a sus diferentes tamaños, de igual manera mediante esta técnica fue posible detallar que a pesar de que existen colifagos somáticos que pertenecen a la misma familia *Siphoviridae* estos no presentan una similitud mayor al 15 %. De esta manera los resultados para esta PCR demuestran que los colifagos somáticos no presentan una alta similitud genética entre ellos.

Según Shakrin y colaboradores (2014), al utilizar la técnica de BOX-PCR se logra obtener una rápida discriminación molecular de cepas por lo que ha sido altamente utilizado para obtener la variación geográfica del organismo que es lo que se está observando en este estudio ya que las agrupaciones generadas en el dendrograma nos permite determinar que los colifagos aislados en los puntos 1 y 2 se están relacionando más cercanamente mientras que el colifagos 5, el único que se logró aislar del punto 2 se presenta de manera aislada del resto de colifagos. Tales eventos pueden haber tenido lugar con el tiempo para generar la diversidad genética entre los aislados y probablemente el grado de polución antropogénica, incluyendo las diferentes actividades económicas realizadas por la población aledaña al lago de estudio, las cuales pueden estar afectando la abundancia y riqueza de las familias de los organismos, incluyendo los colifagos.

**5.4.3 Caracterización molecular de colifagos somáticos utilizando enzimas de restricción por RFLP [*Restriction Fragment Length Polymorphism*].** Las enzimas usadas en el presente estudio: *EcoRI*, *Hind III*, *DraI* y *HinfI*, no fueron eficientes en el corte y generación de fragmentos diferenciables en tamaño, a pesar de haberse ensayado diversas modificaciones al protocolo (Figura 12).



*Figura 12.* Gel de agarosa donde se identifica la ausencia de cortes con enzimas de restricción para el DNA de los diferentes colifagos somáticos y *Escherichia coli* ATCC13706. **Pozo M:** Marcador molecular 1Kb, **Pozo 1:** Colifago somático 1 control, **Pozo 2:** Colifago somático 2, **Pozo 3:** Colifago somático 3, **Pozo 4:** Colifago somático 4, **Pozo 5:** Colifago somático 5, **Pozo 6:** Colifago somático 6, **Pozo 7:** Colifago somático 7, **Pozo 8:** Colifago somático 8. **Pozo 9:** *Escherichia coli* ATCC 13706, **Pozo M:** Marcador molecular  $\lambda$  *Hind* III. Electroforesis corrida en buffer TAE 1X, gel de agarosa al 1%, tiempo de corrida: 1 horas a 70V.

Fuente: Esta investigación.

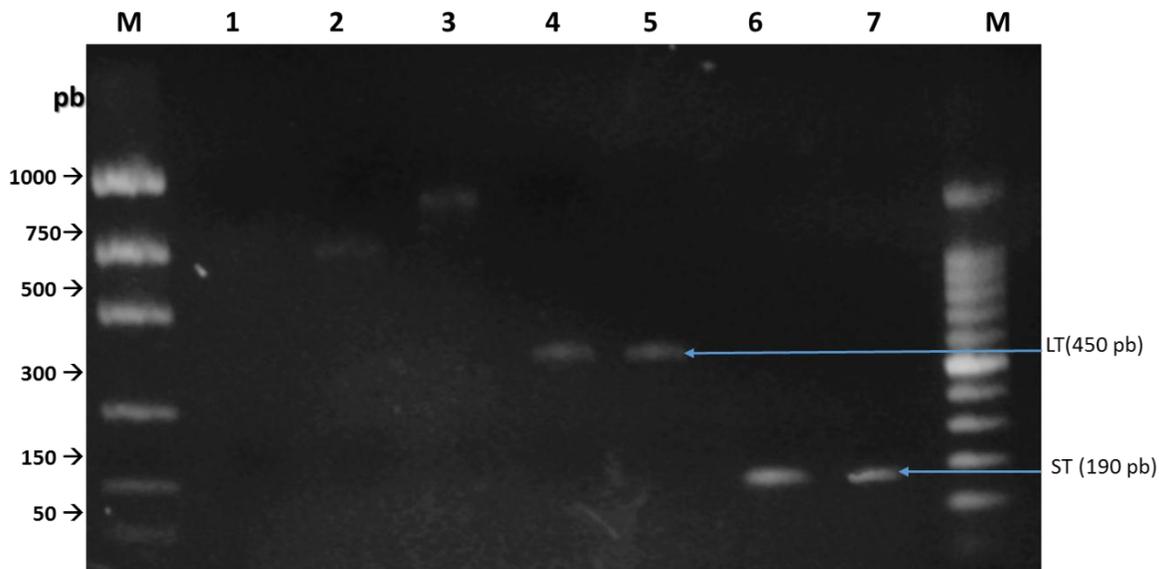
La ausencia de corte por las enzimas de restricción en el DNA de los colifagos somáticos testeados, probablemente se debió a las estrategias que desarrollan los fagos para evadir las defensas desarrolladas por sus bacterias hospederas. Según Pepin y su grupo de trabajo en el 2008, al igual que Meyer y colaboradores en el 2012, explican que se han observado mutaciones puntuales que pueden ser transmitidas por transferencia horizontal de genes lo que consigue contrarrestar los sistemas de defensa bacteriana como el sistema de restricción-modificación (M-R), que es usado por las bacterias para protegerse de DNA exógeno de tal manera que con este sistema eliminan las secuencias ajenas al genoma de las mismas. Si el fago encuentra una célula con defensas de restricción-modificación, éste puede resistirse a estos sistemas con mutaciones que impiden el reconocimiento por endonucleasas de restricción y así escapar de la escisión (Rifat *et al.*, 2008).

En el caso de los fagos lisogénicos que evolucionan con sus bacterias hospedadoras también asumen patrones similares de uso de nucleótidos como la de sus anfitriones y así evitan el uso de las secuencias afines de endonucleasas de restricción de acogida (Abeles & Pride, 2014).

Otro de los motivos por lo cual se genera este fenómeno es que si el DNA quizá no tenga la secuencia que es reconocida por la enzima accesible y por ello está no puede cortar el material genético, pues es bien sabido que entre las diferentes secuencias del DNA de un fago se pueden encontrar mutaciones puntuales, es decir, el cambio de un nucleótido por otro; esta mutación puede no traer ninguna consecuencia biológica, pero sí puede detectarse al aplicar alguna técnica de laboratorio, como el corte del DNA con enzimas de restricción ya que una mutación puede provocar que desaparezca (o se genere) un sitio de restricción en comparación con otro fago que no tiene esa mutación.

#### **5.4.5 Amplificación por PCR de los genes *lt*, *st*, *rfb0101*, *fliCH4*, *Stx2*, *terD* asociados a factores de virulencia**

De los 8 colifagos sometidos a reacciones de PCR para la amplificación de los genes que codifican para *rfb0101*, *fliCH4*, *Stx2*, *terD* ninguno de ellos generó amplicones. Sin embargo, para el caso del gen que codifica para la toxina termoestable (ST) el 100% de los colifagos presentaron la amplificación del gen. De la misma manera, para la toxina termolábil (LT) se obtuvo que un 25 % de los colifagos 6 y 8 presentaron el gen que codifica para la toxina (Figura 13), la cual es estructuralmente semejante a la toxina de *Vibrio cholerae* y es la más frecuente entre cepas patógenas para el hombre y el cerdo, razón por la cual ha sido estudiada para fines clínicos (Gonzales *et al.* 2009)



*Figura 13.* PCR para la detección de LT/ST en colifagos somáticos: **En pozo M:** Marcador low DNA mass ladder (Promega); **Pozo 1:** Colifago control, **Pozo 2:** Colifago 2, **Pozo 3:** Colifago 3, **Pozo 4:** Colifago 6, **Pozo 5:** Colifago 8, **Pozo 6:** Colifago 7, **Pozo 7:** Colifago 8, **Pozo M:** Marcador de tamaño molecular 100 pb (Promega). Electroforesis corrida en buffer TAE 1X, gel de agarosa al 1,5%, tiempo de corrida: 1 horas a 70V.

Fuente: Esta investigación.

El hecho de que en este estudio se encontrara colifago que contiene los genes que codifican las toxinas ST y LT es un signo de un riesgo de aparición y evolución de nuevas cepas patógenas en bacterias. Actualmente se cree que la aparición de varios tipos de patógenos *E.coli* es un proceso evolutivo a partir de cepas comensales. Aunque se encuentra *E. coli* se produce en el medio ambiente y en los intestinos de los animales, la transferencia de genes entre cepas han permitido para la transición del comensal a los tipos de patógenos (Finlay y Falkow, 1997, Burbano-Rosero, 2009).

En un estudio realizado por Cecilia Dini en el año 2011, observó la amplificación de los genes *stx* y *cI* revelando que todos los fagos positivos para *stx1* y/o *cI* fueron fagos de no-O157 pertenecientes a la familia *Myoviridae*, y los positivos para *stx2* fueron fagos de O157 (uno perteneciente a la familia *Myoviridae* y dos a la *Podoviridae*) todos aislados con el mismo hospedero. Se había reportado en trabajos anteriores la presencia de los genes *stx1* y *stx2* en fagos de ambas familias (Willshaw *et al.*, 1987, Muniesa *et al.*, 2000, Allison *et al.*, 2003, Muniesa *et al.*, 2003a, Muniesa *et al.*, 2004a, Muniesa *et al.*, 2004b, Garcia-Aljaro *et al.*, 2006).

Probablemente el aspecto más incierto de los virus es su papel en la transferencia la genética y la adaptación al medio ambiente. Mientras que en el concepto tradicional, transducción generalmente opera dentro de un rango estrecho en el huésped. Un estudio realizado por Chiura

(1997) indica que algunos virus bacterianos marinos son capaces de no específica de la transferencia horizontal de genes. Otra consideración es que los residuos ADN bacteriano se puede encontrar fácilmente en el agua, como un producto de lisis viral, y se puede adquirir por otros organismos a través del proceso de transformación (Fuhrman, 1999).

Los principales factores asociados con la virulencia en *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) a producen diarrea son la enterotoxina y las adhesinas fimbriales. La ETEC contiene plásmidos que codifican los genes de la toxina termolábil (LT) y estable al calor (ST) es causando diarrea en las zonas donde las condiciones sanitarias son deficientes, con su alta incidencia en los niños. La detección de estas toxinas en ambientes acuáticos es importante en relación con brotes. El uso de bioensayos clásicos permite identificar microorganismos fenotipo patógeno, pero sólo el análisis de ADN revela el potencial genético para la virulencia (Martins et al., 1992).

**5.4.5 Secuenciación de los productos de la amplificación de los genes *st* y *lt*.** Los fragmentos que fueron amplificados para LT permitieron detallar que existe homología genética entre las toxinas de colifagos publicadas en el GenBank y las obtenidas en este estudio. Como se detalla en la Tabla 5 las secuencias presentan una similaridad genética hasta del 100% con genes codificadores de toxinas en fagos y en *E.coli*.

**Tabla 5. Similaridad de colifagos somáticos que tiene genes homólogos a las toxinas LT de acuerdo con la secuenciación.**

Aislado	Match	Numero de acceso	Score máximo	Cobertura	Valore	Identidad
<b>Colifago 6</b>	<i>Escherichia coli genome assembly FHI97</i>	LM9971 82.1	484	94%	3,00E -133	95%
	<i>rex gene of phage lambda</i>	V00639. 1	590	78%	7,00E -165	98%
	<i>Escherichia coli genome assembly FHI63</i>	LM9964 58.1	850	100%	0.0	100%
<b>Colifago 8</b>	<i>Enterobacteria phage Sfi</i>	JX50973 4.1	811	95%	3,00E -178	100%

Fuente: Esta investigación.

Para el caso de los genes amplificados codificantes de la toxina termoestable, en el proceso de secuenciación, no se generaron secuencias de calidad para ser analizadas, a pesar de haber enviado a secuenciar usando los dos tipos de primer. Este hecho pudo deberse en parte, a que el producto fue de un tamaño pequeño (190 pb), que al ser procesado pudo perder cierta cantidad de bases, ya sea en el proceso de traqueado, como también el de corte de secuencias para introducirla depurada en las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information*, impidiendo que se genere un grado de comparación eficiente con las secuencias reportadas y almacenadas en las bases de datos genómicas.

Los bacteriófagos que codifican para factores de virulencia pueden convertir su hospedero bacteriano, en un proceso conocido como conversión lisogénica, a partir de una cepa no patógena a una cepa virulenta o una cepa con el aumento de la virulencia. Por lo anterior, el hecho que en este estudio se haya encontrado colifagos somáticos que contienen los genes que codifican las toxinas ST y LT es un indicio de riesgo de aparición de nuevas cepas patogénicas que estarían contaminando el Lago Guamuez, pues se ha demostrado que por medio de estos colifagos somáticos puede ser transmitido el material genético a bacterias, ya que remanentes de DNA bacteriano se pueden encontrar fácilmente en el agua y de esta manera ser transmitidos por transferencia horizontal de genes.

Existen grandes discrepancias entre y dentro de las diferentes especies bacterianas en su capacidad de causar la infección. Tales patógenos facultativos incluyen *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, entre otras. Una fuerza impulsora importante en la aparición y evolución de cepas patógenas es la transferencia horizontal de genes y la adquisición de factores de virulencia. Varios elementos genéticos móviles (secuencias de inserción, plásmidos, bacteriófagos y las islas de patogenicidad) han sido implicados en la transferencia horizontal de genes de virulencia donde los fagos son las principales fuentes de la transferencia horizontal entre diferentes cepas bacterianas, especies e incluso géneros (Canchaya *et al.*, 2003; Abeles & Pride, 2014). Así los fagos son poderosos agentes de cambio genético de las bacterias, enriqueciendo la diversidad genética en las poblaciones microbianas y estimulantes en la adaptación entre las bacterias (Abeles & Pride, 2014).

Los resultados indicativos de este estudio, generan datos que pretender llenar vacíos de información, es la primera vez que se logra aislar y caracterizar colifagos somáticos del Lago Guamuez portadores de genes asociados a factores de virulencia. o anterior puede ser la explicación al porque se presentan graves cuadros de infección intestinal y cuadros de diarrea crónica en el corregimiento del Encano, debido a que estos virus infectan bacterias específicas uniéndose a moléculas receptoras de superficie y entrando en la célula. En un periodo corto de

tiempo (en algunos casos en unos minutos), las polimerasas bacterianas empiezan a traducir ARN vírico en proteína. Estas proteínas pueden estar implicadas en la lisis celular estimulando de esta manera mutaciones y cambios genéticos, facilitando la sobrevivencia de estos organismos en el ambiente (Arias y Huguet, 2002; Salinas *et al.*, 2011).

Recientemente se ha estudiado un sistema generalizado que utilizan las bacterias para la protección contra las moléculas de DNA extraño potencialmente peligrosos, este sistema es denominado CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) junto con genes cas (CRISPR-asociado), los cuales utilizan pequeños RNAs para la detección específica de la secuencia y la neutralización de invadir genomas. Estos genes han sido reportados en genomas de bacteriófagos que infectan a *P. aeuroginosa*. La mutación del gen anti-CRISPR de un fago la hacía capaz de infectar bacterias con un sistema funcional de CRISPR/cas, lo que representa nuevas vías para la elucidación de los mecanismos funcionales CRISPR/Cas y ofrece una nueva visión de la evolución conjunta de los fagos y bacterias (Bondy-Denomy *et al.*, 2013; Abeles & Pride, 2014).

Cuando se hacen estudios moleculares de este tipo de fagos, es recomendable usar por lo menos dos marcadores moleculares, debido a que alguno de ellos no suele funcionar como lo es esperado, probablemente ocasionado por su gran dinámica en la transferencia genética, hecho que permite generar mutaciones, aductos, metilaciones, etc, que cambian su información y comportamiento genético, imposibilitando en algunos casos la generación de datos con un marcador molecular en específico. En un trabajo realizado por Dini (2011) usó los marcadores RFLP y RAPD, este último resultó ser una técnica reproducible y muy sencilla de diferenciación entre fagos específicos de determinada bacteria hospedera (Perez *et al.*, 1998, Barrangou *et al.*, 2002, Shivu *et al.*, 2007), y representó una ventaja al momento de trabajar con un número grande de aislados en tiempo de análisis y preparación de las muestras respecto a la obtención de perfiles genómicos utilizando enzimas de restricción, marcador que requirió altas cantidades de DNA muy puro, no obstante fue limitado al no poderse utilizar en fagos cuyo DNA está metilado, característica de frecuencia en aislados ambientales.

## CONCLUSIONES

- Los colifagos somáticos aislados pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Microviridae*, familias reportadas en estudios relacionados con contaminación antropogénica en cuerpos de agua.
- En el Lago Guamuez existen colifagos somáticos que contienen genes codificantes de las toxinas LT y ST, generando un estado de alerta por el riesgo microbiológico a que la población aledaña al Lago, puede estar expuesta.
- El marcador molecular BOX-PCR fue más eficiente que las enzimas de restricción *EcoRI*, *Hind III*, *DraI* y *HinfI* para determinar variabilidad genética entre los colifagos somáticos aislados. No obstante ningún marcador fue discriminatorio para familia tipo de fago.

## RECOMENDACIONES

Realizar estudios que permitan conocer la dinámica espacial y temporal de colifagos somáticos en el Lago Guamuez.

Realizar un plan de vigilancia y monitoreamiento epidemiológico en conjunto con las entidades gubernamentales, con la finalidad de crear medidas de contingencia que permitan disminuir los graves problemas de contaminación que se están generando actualmente en el Lago Guamuez.

Realizar estudios utilizando marcadores diferentes a los utilizados en este estudio ya que ninguno de los marcadores trabajados fue discriminatorios para tipo y familia.

Dar a conocer a la comunidad de los graves problemas de salubridad a los cuales se pueden estar enfrentando, al utilizar el agua del lago Guamuez como fuente de riego para sus cultivos y de hidratación para sus animales sin seguir un plan de saneamiento y monitoreamiento ambiental.

## LITERATURA CITADA

- Abedon, S. (2008). *Bacteriophage ecology population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*. USA: University Cambridge press.
- Abedon, S. & Culler, R. (2007). Bacteriophage evolution given spatial constraint. *J Theor Biol*, 248, 111-119.
- Abessa, D., Carr, R., Bauer, R., Sousa, E., Hortelani, M. & Sarkis, J. (2005). Influence of a brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Mar. Poll. Bull.*, 50, 875-885.
- Abeles, S. & Pride, D. (2014). Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. In E. Martens, J. Sonnenburg & D. Relman (Eds), *Insights into molecular mechanisms of microbiota* (pp, 3892-3906).
- Ackermann, H. (Ed). (2012). *Bacteriophage Electron Microscopy*. Canada: Advances in Virus Research.
- Ackermann, H. (2006). The Bacteriophages. In: Calendar, R. & Abedon, S. (Ed.), *Classification of bacteriophages*. (pp. 8–16).Oxford: Oxford University Press.
- Ackermann, H. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000: brief review. *Arch. Virol.*, 146, 843–857.
- Ackermann H. (1999). Tailed bacteriophages: the order Caudovirales. *Adv. Virus Res.*, 51, 135-201.
- Ackermann, H., Berthiaume, L. & Tremblay, M. (1998). *Virus Life in Diagrams*. Boca Rato, FL: CRC Press.
- Ackermann, H. (1997). Progress in Microbial Ecology (Proceedings of the Seventh International Symposium on Microbial Ecology). In: Martins, M., Sato. M., Tiedje, J., Hagler, L., Obereiner, J., Sanchez , P. (Ed.), *Bacteriophage ecology* (pp. 335–339). São Paulo: Brazilian Society for Microbiology/International Committee on Microbial Ecology.
- Ackermann, H. (1996). Frequency of morphological phage descriptions in 1995. *Arch. Virol.*, 141, 209-218.

- Ackermann, H., Azizbekyan, R., Emadi Konjin H., Lecadet, M., Seldin, L. & YU, M. (1994a). New *Bacillus* bacteriophage species. *Arch. Virol.*, *135*, 333-344.
- Ackermann, H., Brochu, G. & Emadi Konjin, H. (1994b). Classification of Acinetobacter phages. *Arch. Virol.*, *135*, 345-354.
- Ackermann, H. (1992). Frequency of morphological phage descriptions. *Arch. Virol.*, *124*, 201-209.
- Ackermann, H. & Gershman (1992). Morphology of phages of a general *Salmonella* typing set. *Res.Virol.*, *143*, 303-310.
- Ackermann, H. & Dubow, M. (1987). *Viruses of prokaryotes. General properties of bacteriophages*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Ackermann, H. W & Nguyen, T. M. (1983). Sewage coliphages studied by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol*, *45*, 1049-1059.
- Ackermann, H. (1976). La classification des phages caudés des entérobactéries. *Pathol. Biol.*, *24*, 359-370.
- Ackermann, H. & Eisenstark, A. (1974). The present stage of phage taxonomy. *Intervirology*, *3*, 201-219.
- Allison, H., Sergeant, M., James, C., Saunders, J., Smith, D., Sharp, R., Marks, T. & McCarthy, A. (2003). Immunity profiles of wild-type and recombinant shiga-like toxin encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect Immun*, *71*, 3409-3418.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. (1998) Microbiological examination. In: Microbiological Examination of Water and Wastewater. 20th ed. Washington, D.C.: APHA, AWWA, WEF
- Arias, I & Huguet, J. (2002). Detección molecular de toxinas termoestable y termolabil de *Echerichia coli* mediante hibridación. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, *19*, 193-196.
- Barrangou, R., Yoon, S., Breidt, J., Fleming, H. & Klaenhammer, T. (2002). Characterization of six *Leuconostoc fallax* bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Appl Environ Microbiol*, *68*, 5452-5458.
- Belkum, A. & Hermans, P. (2001). Box PCR Fingerprinting for Molecular Typing of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods in Molecular Medicine*, *48*, 159-168.

- Bessler, W., Fehmel, F., Freund-Molbert, E., Knufermann, H. & Stirm, S. (1975). *Escherichia coli* capsule bacteriophages. IV. Free capsule depolymerase 29. *J Virol*, 15, 976-984.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G. & Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany. *The Lancet Infectious Diseases*, 11, 671-676.
- Brezina, M. & Baldini, D. (2008). Detection of somatic coliphages as indicators of faecal contamination in estuarine waters. *Revista Argentina de Microbiología*, 40, 72-74.
- Brzuszkiewicz E., Thurmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G. & Daniel, R., (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol*, 193, 883–891.
- Bohannan, B. & Lenski, R. (2000). The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community. *The university of Chicago. Chicago Journals*, 156, 329-340.
- Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell K. & Davidson, A. (2013). Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 493, 429-432.
- Borrego, J., Cornax, R., Moriñigo, M., Martínez-Manzanares, E. & Romero, P. (1990). Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Wat. Res*, 24, 111-116.
- Burbano, E (2009). *Frecuencia e diversidade de colifagos somáticos isolados de amostras de água do mar, plancton e bivalves da Baixada Santista, canal de Sao Sebastiao e Ubatuba*. Universidade de Sao Paulo. Brasil.
- Bubano-Rosero, E., Ueda-Ito, M., Kisielius, J., Nagasse-Sugahara, T., Almeida, B., Souza-Sales, C., Markman, G., Albertini, L. & Rivera, I. (2011). Diversity of somati coliphages in coastal regions with different levels of antropogenic activity in Sao Paulo State. Brasil. *Applied and enviromental microbiology* (print), 77, 4208-4216.
- Cadillo, H & León, J. (2001). Uso de colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal en playas de “la costa verde”, Lima – Perú. *Revista peruana de Biología*, 8, 1727-9933.

Campbell, A. & Reece, R. (2007). *Biología. Médica Panamericana*.

Canchaya, C., Fournous, S., Chibani, M., Dillmann, L. & Brussow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol*, 6, 417–424.

Cattadori, I., Haukisalmi, V., Henttonen, H. & Hudson, P. (2006). Transmission ecology and the structure of parasite communities in small mammals. *Micromammals and Macroparasites*. 647, 349-369.

Díaz, J. (2006). *Susceptibilidad de los hospederos bacterianos a la infección de colifagos, provenientes de aguas residuales*. Pontifica Universidad Javeriana. México D.F.

Departamento administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2013). Encontrado en: <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/proyecciones-de-poblacion>.

Dini, C. & De Urraza, P. (2010). Isolation and selection of coliphages as potential biocontrol agents of enterohemorrhagic and Shiga toxin-producing E. coli (EHEC and STEC) in cattle. *J Appl Microbiol*, 109, 873-887.

Dini, C. (2011). *Aislamiento y caracterización molecular de bacteriofagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.

Donnenberg, M. (2002). *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Amsterdam, Lóndres. Academic Press.

Do val, R. Estudo da biodiversidade de colifagos somáticos isolados de ambientes aquáticos e de fezes humanas e animais. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

Esch, G. & Fernández, J. (Ed.). (1993). *A functional Biology of parasitism. Ecology and evolutionary implications*. USA: University California.

Faleiro, P. (2010). *Formación de biopelículas por “Escherichia coli” y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas*. Universidad complutense de Madrid.

- Fernández, S., Alonso, G. & Toro, E. (2004). Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 35, 20-31.
- Filippin, M., Buesing, N., Bettarel, Y., Sime-Ngando, T. & Gessner, O. (2006). Infection paradox: high abundance but low impact of freshwater benthic viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4893-4898.
- Filippini, M., Buesing, N. & Gessner, M. (2008). Temporal dynamics of freshwater bacterio and viroplankton along a littoral-pelagic gradient. *Freshwater Biology*, 53, 1114-1125.
- Fitzgerald, C., Gheesling, L., Collins, M. & Campos, P. (2006). Análisis de secuencias de los rfb Loci, que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de la *Salmonella enterica* O17 y O18 antígenos: El serogrupo específica de identificación por PCR. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7949 - 7953.
- Glynn, H. & Gary, H. (1999). Ingeniería ambiental. México: Prentice.
- García, A. (2004). *Detección del gen stx2 en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad. Departamento de microbiología. Universidad de Barcelona, España.*
- Garcia, C., Muniesa, M., Jofre, J. & Blanch, A. R. (2006), Newly identified bacteriophages carrying the stx2g Shiga toxin gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. *Microbiol Lett*, 258, 127-135.
- Hassan, A. & Frank, J. (2004). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. *Food Microbiol*, 96, 103-109.
- Huarani, R. (2005). *Escherichia coli enterotoxigenica (ETEC) características patogénicas y epidemiológicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz Bolivia.*
- Hughes, K, Sutherland, I, Clark, J. & Jones, M. (1998). Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases-novel tools for study of bacterial biofilms. *J Appl. Microbiol*, 85, 583-590.
- Kwiatkowski, B., Boschek B., Thiele, H. & Stirm, S. (1982). Endo-N-acetylneuraminidase associated with bacteriophage particles. *J Virol*, 43, 697-704.
- Jackson, E & Jackson, C. (2008). Viruses in wetland ecosystems. *Freshwater Biology*, 53, 1214-1227.

- Jakubowska, M., Jurczak, A., Richert, M., Łoś, M., Narajczyk, M. & Wróbel B. (2012). Diversity of tailed phages in Baltic Sea sediment: large number of siphoviruses with extremely long tails. *Research in Microbiology*, *163*, 292-296.
- Lindsay, J., Ruzin, A. & Ross, H. (1998). The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol* *29*, 527-543.
- Lockett, T. (1990). A bacteriophage  $\lambda$  DNA purification procedure suitable for the análisis of DNA from either large or multiple small lysates. *Anal. Biochem* *185*, 230-234.
- Marcus, S., Brumell, J., Pfeifer, C. & Finlay, B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.*, *2*, 145-56.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D, Boulnois, A. & Claverys, G. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nuc. Acids Res.*, *20*, 3479 – 3483.
- Miko, A., Delannoy, S., Fach, P., Strockbine, N., Lindstedt, B., Mariani, P., Reetz, J. & Beutin, L. (2013). Genotypes and virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 strains from different origins and sources. *International Journal of Medical Microbiology*, *303*, 410-421.
- Muniesa, T. (1998). *Bacteriofagos portadores del gen de la Srx2 en aguas*. Universidad de Barcelona. España.
- Muniesa, M., Recktenwald, J., Bielaszewska, M., Karch, H. & Schmidt H. (2000). Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun*, *68*, 4850-4855.
- Muniesa, M., De Simon, M., Prats, G., Ferrer, D., Panella, H. & Jofre, J. (2003). Shiga toxin 2converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun*, *71*, 4554-4562.
- Muniesa, M., Serra, R. & Jofre, J. (2004). Free Shiga toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the stx genes appeared conserved. *Environ Microbiol*, *6*, 716-725.
- Olive, D. & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*, 1661-1669.

- Organización Mundial de la Salud. (2012). Evaluación de métodos para el tratamiento doméstico del agua: metas sanitarias y especificaciones de eficiencia microbiológica. Encontrado en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/79186>.
- Organización Mundial de Gastroenterología. (2012). Diarrea aguda en adultos y niños una perspectiva mundial. *Guías prácticas de la Organización mundial de Gastroenterología*. Encontrada en: [http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012\\_Acute%20Diarrhea\\_SP.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012_Acute%20Diarrhea_SP.pdf).
- Pal, C., Macia, D., Oliver, A., Schachar, I. & Buckling, A. (2007). Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 450, 1079-1081.
- Peduzzi, P. & Schiemer, F. (2004). Bacteria and viruses in the water column of tropical freshwater reservoirs. *Environmental Microbiology*, 6, 707-715.
- Pérez, T., Albornoz, J. & Domínguez, A. (1998). An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol Ecol*, 7, 1347-1357.
- Ponnusamy, D., Hartson, S., & Clinkenbeard, K. (2011). Intracellular *Yersinia pestis* expresses general stress response and tellurite resistance proteins in mouse macrophages. *Veterinary Microbiology*, 150, 146–151.
- Robles, M. (2008). *Nematodes oxyuridae, trichuridae y capillariidae en roedores akodontini (Cricetidae: sigmodontinae) de la cuenca del Plata, Argentina: su importancia en la interpretación de las relaciones parásito-hospedador-ambiente*. Universidad de la Plata, Argentina.
- Rodríguez, M. (2004). *Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (elisa), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en foie gras*. Madrid, España: Universidad complutense de Madrid.
- Rohwer, F. & Veja, R. (2009). Viruses manipulate the marine environmental. *Nature*, 459, 207-212.
- Roldan, G. & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de limnología tropical*. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Editorial Universidad de Antioquia. Segunda edición.
- Roldán, G. (2009). Desarrollo de la limnología en Colombia: cuatro décadas de avances progresivos. *Actualidades Biológicas*, 31, 227-237.

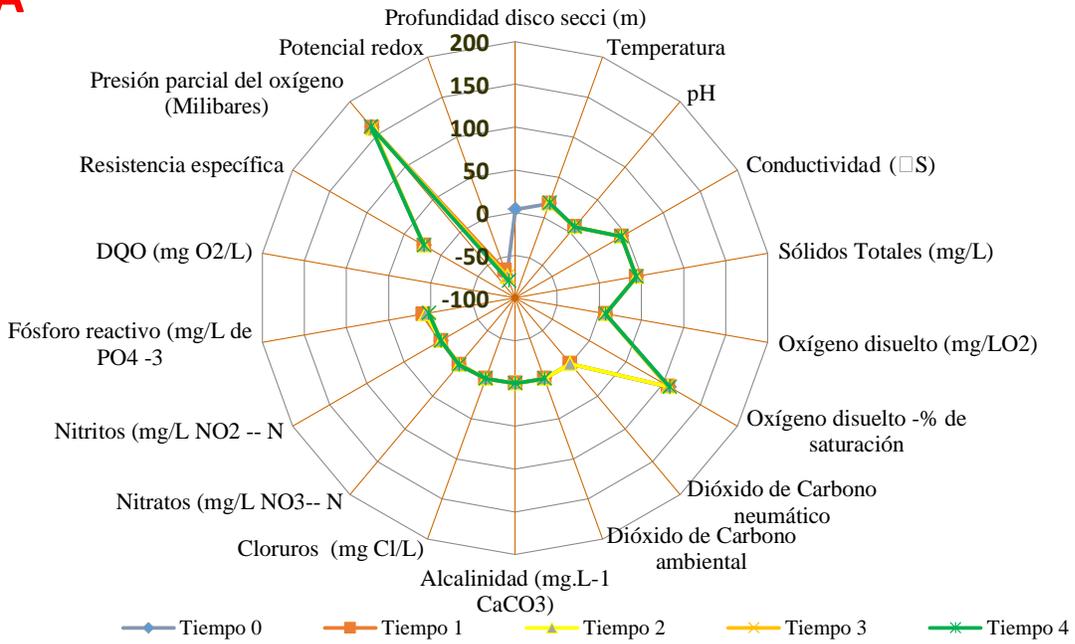
- Ru, Y., Lou, Y., Seven, A., Rizo, J., & Chen, C. (2011). NMR Structure and Calcium-Binding Properties of the Tellurite Resistance Protein TerD from *Klebsiella pneumonia*. *Journal of Molecular Biology*, 405, 1188-1201.
- Russo, T. (2002). Capsule and Lipopolysaccharide. In: *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Amsterdam, Boston: Academic Press.
- Secretaria de Agricultura y Medio Ambiente Gobernación de Nariño. (2010). Acuerdo de Competitividad de la cadena Piscícola en el departamento de Nariño. Recuperado en: [http://narino.gov.co/dependencias/files/Banco\\_de\\_Proyectos/Acuerdos/ACUERDODECO MPETIVIDADPISCICOLANARINO2009.pdf](http://narino.gov.co/dependencias/files/Banco_de_Proyectos/Acuerdos/ACUERDODECO MPETIVIDADPISCICOLANARINO2009.pdf).
- Schwartzbrod, L. (1995). *Effect of human viruses on public health associated with the use of wastewater and sludge in agriculture and aquaculture*. Geneva: World Health Organization.
- Salinas, A., Giménez, J., Serrano, L, Nam, S. & Sánchez, R. (2011). Papel de las proteínas quinasas activadas por Mitógenos (MAPK) en el carcinoma de células renales esporádico. *Actas Urológicas Españolas*, 36, 99-103.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanssouci, É, Lerat, S., Gilles, G., Shareck, F. & Beaulieu, C. (2001). tdd8: a TerD domain-encoding gene involved in *Streptomyces coelicolor* differentiation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 385-98.
- Secretaria de Salud, Pasto. (2012). Plan territorial de salud 2012-2015, Pasto, Colombia. Recuperado en: [http://www.pasto.gov.co/phocadownload/documentos2012/salud/plan\\_territorial\\_de\\_salud\\_2012-2015.pdf](http://www.pasto.gov.co/phocadownload/documentos2012/salud/plan_territorial_de_salud_2012-2015.pdf).
- Sharma, M., Ryu, J. & Beuchat, L. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J Appl Microbiol*, 99, 449-459.
- Shivu, M., Rajeeva, B., Girisha, S., Karunasagar, I. & Krohne, G. (2007). Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. *Environ Microbiol*, 9, 322-331.

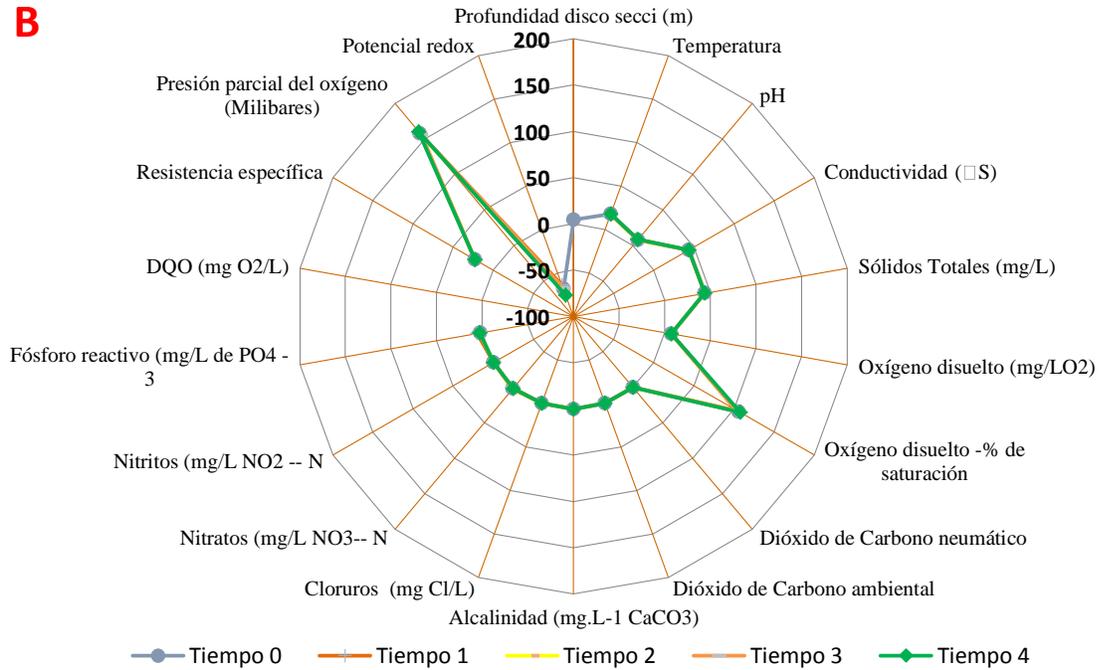
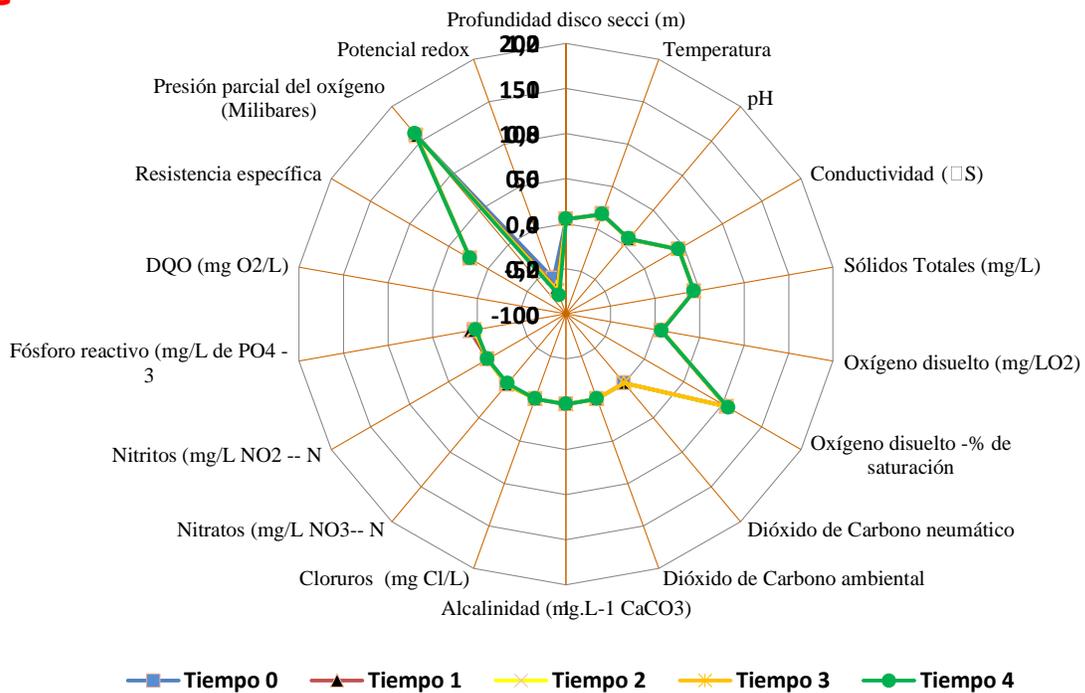
- Silva, C. (2009). *Identificación de genes codificados en islas genómicas que contribuyen a la virulencia de Salmonella enterica serovar Enteritidis*. Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- Sime, T. & Colombet, J. (2009). *Virus et prophages dans les écosystèmes aquatiques. Laboratoire Microorganismes: genome et environnement, France. Univermixte de recherche 6023 du centre national de la recherche scientifique. Rev. Micorbiol, 55, 95-109.*
- Sinton, L., Finlay, R & Lynch, P. (1999). Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage-Polluted Seawater. *Appl. Environ. Microb, 65, 3605-3613.*
- Sundberg, C., Smars, S & Jonsson, H. (2004). Low pH as an inhibiting factor in the transition from mesophilic to thermophilic phase in composting. *Bioresource Thechnology, 95, 145-150.*
- Tomlinson, S. & Taylor, P. (1985). Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide. *J Virol, 55, 374-378.*
- Versalovic, J., Koeth, T. & Lupski, J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res., 19, 6823-6831.*
- Willshaw, G., Smith, H., Scotland, S., Field, A. & Rowe, B. (1987). Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Vero cytotoxins: comparison of cloned sequences determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. *J Gen Microbiol, 133, 1309-1317.*
- Wisnivesky, C. (2003). *Ecología y epidemiología de las infecciones parasitarias*. Costa Rica: Ed. Lur.
- Wok, G. (2001). Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Department of Medical Virology, University of Pretoria, PO Box 2034, Pretoria 0001, South Africa. *Water SA, 27, 251-267.*
- Zhu, F., Zheng, Y., Zhao, X., Xing, Q. & Li, G. (2006). Study on application of rep-PCR fingerprint in rapid identification of beer-spoilager. *Chinese Journal of Biotechnology, 22, 1013-1020.*

## ANEXOS

Anexo A. Parámetros físico-químicos determinados en muestras de agua del Lago Guamuez teniendo en cuenta cada punto de muestreo. **A** punto 1, **B**, punto 2, **C**. punto 3.

**A**



**B****C**

**Anexo B. Tabla de parámetros físico-químicos del Lago Guamuez**

Parámetro	Punto 1					Punto 2					Punto 3				
	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4
<b>Profundidad disco secci (m)</b>	3,85					4,23					4,95				
<b>Temperatura</b>	17,7	17,6	17,2	17,4	17,9	17,6	17,2	17,2	17,2	17,7	17,7	17,1	17,2	17,2	17,6
<b>Ph</b>	8,128	8,246	8,265	8,257	8,365	8,01	8,049	8,151	8,173	8,306	8,151	8,3	8,225	8,265	8,351
<b>Conductividad (mS/cm)</b>	43,5	43,6	43,7	43,5	43,7	43,5	43,7	43,6	43,6	43,7	43,6	43,7	43,7	43,6	43,6
<b>Sólidos Totales (mg/L)</b>	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
<b>Oxígeno disuelto (mg/LO2)</b>	7,18	7,19	7,33	7,26	7,41	7,28	7,05	7,21	7,17	7,34	6,79	7,13	7,23	7,25	7,33
<b>Oxígeno disuelto -% de saturación</b>	107,9	106,7	106,8	105,9	108,7	106	103,5	104,6	104,5	107,7	105,5	104,6	105,9	105,12	107,7
<b>Dióxido de Carbono neumático</b>	146 ± 2	225 ± 2	192 ± 2			163 ± 2	236 ± 2	170 ± 2	190 ± 2	163 ± 2	153 ± 2	215 ± 2	182 ± 2	271 ± 2	
<b>Dióxido de Carbono ambiental</b>	156 ± 2	204 ± 2	174 ± 2	164 ± 2	162 ± 2	160 ± 2	195 ± 2	182 ± 2	170 ± 2	165 ± 2	160 ± 2	195 ± 2	172 ± 2	164 ± 2	160 ± 2
<b>Alcalinidad (mg.L-1 CaCO3)</b>	5 mL H2SO4	1,2 mL H2 SO4	1 mL H2SO4	1 mL H2SO4	1,1 mL H2SO4	1,8 H2 SO4	0,8 mL H2SO4	1 mL H2SO4	1 mL H2SO4	1,0 mL H2SO4	1,2 mL H2SO4	1 mL H2SO4	1 mL H2SO4	0,5 mL H2SO4	0,9 mL H2SO4
<b>Cloruros (mg Cl/L)</b>	0,2 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3	0,2 mL AgNO3	0,3 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3	0,2 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3	0,8 AgNO3	0,2 mL AgNO3	0,2 mL AgNO3	0,1 mL AgNO3
<b>Nitratos (mg/L NO<sub>3</sub>—N)</b>	1,8	1,9	2,1	0,7	1,7	1,9	2	1,9	1	1,6	2,2	1,9	1,9	1,9	0,6

Parámetro	Punto 1					Punto 2					Punto 3				
	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4
Nitritos (mg/L NO <sub>2</sub> – N)	0,016	0,025	0,05	0,023	0,015	0,014	0,014	0,002	0,004	0,006	0,013	0,017	0,009	0,005	0,002
Fósforo reactivo (mg/L de PO <sub>4</sub> -3)	9,22	9,42	6,38	1,71	2,47	2,36	5,66	2,68	3,14	2,55	3,36	7,99	3,57	2,42	1,53
Resistencia específica	23	22,9	22,9	23	22,9	23	22,9	22,9	23	22,9	22,9	22,9	22,9	22,9	22,9
Presión parcial del oxígeno (Milibares)	160,4	160	157,2	158,9	161,5	158,1	155,5	156,1	156,7	160,2	158,4	157,2	158,5	157,6	160,4
Potencial redox	-72,7	-65,4	-73,2	-73,5	-78,9	-68,4	-64,2	-68,2	-67,8	-75,4	-58,2	-69,8	-71,8	-73,2	-78,2
Tiempo de la recolección	02:45 p.m.	09:00 p.m.	03:20 a.m.	09:00 a.m.	03:25 p.m.	03:25 p.m.	09:05 p.m.	3:40 am.	9:20 am.	3 pm.	03:00 p.m.	09:18 p.m.	3:35 am.	9:10 am.	03:10 p.m.

