

SUSCEPTIBILIDAD DE LOS HOSPEDEROS BACTERIANOS A LA
INFECCION DE COLIFAGOS, PROVENIENTES DE AGUAS RESIDUALES

Presentado por
JULIET MARCELA DIAZ MASMELA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
Depto. de Genética y Biol. Molecular CINVESTAV-IPN
México DF. 2006

SUSCEPTIBILIDAD DE LOS HOSPEDEROS BACTERIANOS A LA
INFECCION DE COLIFAGOS, PROVENIENTES DE AGUAS RESIDUALES

JULIETH MARCELA DIAZ MASMELA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

Microbiólogo Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Depto. de Genética y Biol. Molecular CINVESTAV-IPN

México DF. 2006

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

ANEXO 2

FORMATO DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
Diaz Másmela	Julieth Marcela

DIRECTOR (ES)

Apellidos	Nombres
Kameyama Kawabe	Luís Yoshio

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: Microbiólogo Industrial

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Susceptibilidad de los hospederos bacterianos a la infección por colifagos, provenientes de aguas residuales

FACULTAD: Ciencias

PROGRAMA: Carrera __X__ Especialización _____ Maestría _____ Doctorado _____

NOMBRE DEL PROGRAMA: Microbiología Industrial

CIUDAD: MÉXICO AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: 2006

NÚMERO DE PÁGINAS: 64

TIPO DE ILUSTRACIONES:

- Ilustraciones
- Mapas
- Retratos
- Tablas
- gráficos y diagramas
- Planos
- Láminas
- Fotografías

MATERIAL ANEXO (Vídeo, audio, multimedia o producción electrónica): Ninguno

Duración del audiovisual: _____ Minutos.

Número de casetes de vídeo: _____ Formato: VHS ___ Beta Max ___ $\frac{3}{4}$ ___ Beta
Cam _____

Mini DV _____ DV Cam _____ DVC Pro _____ Vídeo 8 _____ Hi 8 _____

Otro. Cual? _____

Sistema: Americano NTSC _____ Europeo PAL _____ SECAM _____

Número de casetes de audio: _____

Número de archivos dentro del CD (En caso de incluirse un CD-ROM diferente al
trabajo de grado:

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES.

Aguas residuales, bacterias susceptibles, bacteriófagos, colifagos, *Escherichia coli*

RESUMEN DEL CONTENIDO:

En el ambiente de las aguas residuales, muy pocos organismos están libres del ataque de parásitos microbianos. La mayoría son parásitos intracelulares obligados como los bacteriófagos, que pueden causar lisis bacteriana o pueden estar en una forma más estable, como profagos. Sin embargo, las bacterias también han adquirido varios mecanismos de resistencia a condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo la infección por fagos. En este estudio se quiso indagar la susceptibilidad de 48 hospederos bacterianos de la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*), a la infección por 38 colifagos provenientes de aguas negras. La cepa de *E. coli* K-12 W3110 fue utilizada como control positivo a la infección de todos los colifagos. El 13% de todas las bacterias analizadas fueron resistentes a los 38 fagos, mientras que aquellas bacterias que fueron susceptibles a la mayoría de los colifagos, mostrando un comportamiento similar al de la bacteria control W3110, representan solo un 8%. Un 79% corresponde a las bacterias que fueron susceptibles o moderadamente susceptibles a la infección de 1 a 9 fagos. Estos resultados sugieren que el número de cepas de *E. coli* capaces de soportar el desarrollo de los colifagos es bajo y las bacterias resistentes llegan a ser dominantes.

A mis padres, Adolfo y Graciela

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) México, bajo la tutoría del Doctor Luis Yoshio Kameyama Kawabe, a quien deseo expresar mi sincero agradecimiento por toda la paciencia y ayuda brindada, y quien conjuntamente con la Doctora Rosa María Bermúdez tuvieron la gentileza de hacerme partícipe del grupo de investigación que ellos dirigen.

Expresar a la vez mi gratitud, a todos mis compañeros del laboratorio, con quienes me ha unido una muy especial amistad, y que aunque nos separen muchos kilómetros de distancia siempre estarán en mi memoria; gracias a Arnulfo quien me brindó su apoyo y sobretodo su amistad, al Doctor Francisco Martínez que a parte de enseñarme algunos temas de Biología Molecular, también fue y será un gran amigo que me brindó su apoyo y me dio muchos consejos que me ayudaron a seguir adelante, a Carlos Vásquez, Omar y Edith quienes también han estado conmigo compartiendo buenos momentos.

Mi agradecimiento muy especial, al Maestro Guillermo Aquino y su familia por su amor y comprensión y porque estuvieron a mi lado apoyándome y ayudándome en todo lo que fuera necesario, para que mi estancia en México fuera la mejor.

Hago una mención muy especial a DIOS quien me dio la fuerza, la inteligencia y el entendimiento y a mis padres quienes a través de la distancia siempre confiaron en mi y en mis capacidades, me han enseñado tanto y de quienes tengo la deuda infinita de salir adelante en la vida demostrándoles que sus esfuerzos no fueron en vano.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	17
1.INTRODUCCIÓN	18
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1 Bacteriófagos	20
2.1.1 Estructura	20
2.1.2 Ciclo de vida	22
2.1.3 Lisis	24
2.2 Colifagos	24
2.3 Bacterias hospederas resistentes	26
2.4 Ecosistemas de bacterias y bacteriófagos	27
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	29
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1 Diseño de la investigación	32
5.2 Microorganismos	32
5.3 Medios de cultivo	32
5.4 Métodos	32
5.4.1 Obtención de bacterias de <i>E. coli</i> silvestre	32

5.4.2 Pruebas bioquímicas	33
1. Fermentación de glucosa y lactosa, producción de H ₂ S y gas	33
2. Producción de Indol y movilidad	34
3. Citrato	34
4. Malonato	34
5. Hidrólisis de urea	35
6. Descarboxilación de aminoácidos (LOA)	35
7. Fermentación de hidratos de carbono (inositol y sorbitol)	35
8. Rojo de Metilo y Voges Proskauer	36
5.4.3 Determinación de bacterias <i>E. coli</i> no lisógenas	36
5.4.4 Obtención de fagos de su fuente natural	37
5.4.5 Expansión y conservación de fagos	37
5.4.6 Titulación de los lisados	38
5.4.7 Determinación de la presencia o ausencia de UFP en diversas <i>E. coli</i>	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Caracterización de bacterias <i>E. coli</i>	39
6.2 Bacterias de <i>E. coli</i> no lisógenas	44
6.3 Fagos aislados	46
6.4 Análisis de la susceptibilidad bacteriana a la infección por fagos	48
7. CONCLUSIONES	62
8. PERSPECTIVAS	62
9. BIBLIOGRAFIA	63
10. ANEXO Medios utilizados en las bioquímicas para el aislamiento de la <i>E. coli</i> y medios para cultivos bacterianos, detección y dilución de bacteriófagos	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas fermentadoras de lactosa en medio Mc Conkey	40
Tabla 2a. Pruebas bioquímicas	41
Tabla 2b. Caracterización bioquímica de <i>E. coli</i>	43
Tabla 3. Cepas de <i>E. coli</i> portadoras de fagos y cepas portadoras de colicinas	45
Tabla 4. Unidades formadoras de placas en las bacterias analizadas	47
Tabla 5a. Ensayo de susceptibilidad de las bacterias a la infección por fagos	48
Tabla 5b. Resumen del ensayo de susceptibilidad	58
Tabla 6. Susceptibilidad de las bacterias a la infección fágica	59

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del fago T4	16
Figura 2. Estructura fago Lambda	16
Figura 3. Estadios en al unión de los fagos a la superficie exterior	18
Figura 4. Morfología de bacteriófagos aislados de muestras naturales	20
Figura 5. <i>E. coli</i> fermentadora de lactosa en medio Mc Conkey	35
Figura 6. Infectividad de los fagos en relación al rango de hospedero	55

RESUMEN

Muestras de aguas residuales de diferentes lugares de México (del D. F., del estado de Morelos y de Guerrero), fueron analizadas para el aislamiento de colifagos y de algunas bacterias de la especie *Escherichia coli*. Algunas de las *E. coli* fueron obtenidas del cepario particular del Dr. Kameyama del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV. Las bacterias aisladas fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas y su estado lisogenico fue determinado utilizando el sobrenadante de un cultivo crecido toda la noche, el cual fue goteado en un tapiz de *E. coli* W3110 y LE392. A partir de este ensayo se observó tanto para las lisógenas o las productoras de colicinas, la presencia de placas o halos líticos. El goteo de diferentes diluciones sobre el tapiz bacteriano, produjo halos líticos y a mayores diluciones se observó placas aisladas, cosa que para las productoras de colicinas no. Para éste estudio se descartaron las lisógenas y también las cepas capaces de producir bacteriocinas. Para el aislamiento de los fagos silvestres se utilizaron 9 diferentes cepas *E. coli* no lisógenas ni productoras de colicinas. A estas se les gotearon diferentes diluciones del sobrenadante de las aguas residuales previamente tratadas para observar la presencia de placas. Posteriormente cada una de estas fue purificada y expandida para tener un concentrado de fagos. En total se analizaron 48 cepas de *Escherichia coli* y 38 fagos nativos, a partir de los cuales se realizó el ensayo de exclusión, utilizando como control positivo la *E. coli* K-12, la cepa W3110, la cual fue susceptible a la infección por cada uno de los 38 fagos. Los resultados muestran que las bacterias aisladas son muy resistentes a la infección de los colifagos obtenidos de las aguas residuales. El 13% de las bacterias mostraron resistencia a todos los fagos, el 50% de las bacterias fueron susceptibles de 1 a 3 fagos, el 29% de 4 a 8 fagos, y el 8% de las bacterias fue susceptible a más de 9 fagos. Podemos decir adicionalmente que el 84% de las bacterias fueron resistentes a más de un fago. Estos porcentajes indican que en un ambiente de aguas residuales la presencia de bacterias multi-resistentes es muy significativa, y por consiguiente la eficiencia de la replicación de los colifagos es muy baja.

1. INTRODUCCIÓN

A diario las diferentes actividades humanas, agrícolas e industriales, generan una gran cantidad de residuos líquidos. Estos son canalizados hacia las plantas de tratamiento de agua, las cuales tienen como objetivo reducir en gran parte la materia orgánica e inorgánica, además de sustancias tóxicas que llegan a ser nocivas para el ambiente. También existe una gran cantidad de bacterias heterótrofas, así como otros microorganismos que son capaces de tomar estos desechos como nutrientes y convertirlos en moléculas menos complejas y menos tóxicas para el ambiente, generando así un sistema de auto-purificación.

Por otro lado, se encuentran algunas poblaciones bacterianas entéricas y de otros patógenos que son reducidas o eliminadas del ambiente, debido a la presencia de una serie de interacciones negativas que se encargan de disminuir la tasa de crecimiento de las densidades celulares cuando estas son altas. Las más conocidas son: la competencia, la depredación y el parasitismo, que son llevados a cabo por las poblaciones autóctonas.

En el ambiente de las aguas residuales, muy pocos organismos están libres del ataque de parásitos microbianos. La mayoría son parásitos intracelulares obligados como los bacteriófagos, que pueden causar lisis bacteriana o pueden estar como profagos, en una forma más estable. Sin embargo las bacterias también han adquirido varios mecanismos de resistencia a condiciones adversas del medio ambiente incluyendo la infección por fagos. Es por esto que probablemente durante el tratamiento de las aguas residuales se lleguen a formar sedimentos que contienen bacterias ya sean patógenas o no; quizá por que muchas de las bacterias que se encuentran en las aguas residuales han resultado ser muy resistentes a los bacteriófagos, de manera que la actividad de estos en este tipo de ambiente resulte muy insignificante.

Debido a esto muchas bacterias que pueden ser patógenas pueden llegar a las aguas utilizadas para el riego de los cultivos, llegando así a contaminarlos; sin embargo al

conocer los fagos que son capaces de infectar a algunas de estas bacterias se podría pensar en agregar un cocktail de fagos en algunos de las etapas del tratamiento de aguas donde se generan los sedimentos para eliminarlas y así disminuir en gran parte la contaminación con este tipo de bacterias patógenas.

El objetivo del presente trabajo es conocer mas sobre las interacciones fago-hospedero en las aguas residuales, determinando la susceptibilidad de hospederos bacterianos a la infección de colifagos aislados a partir de muestras de aguas residuales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Bacteriófagos

Se definen como virus capaces de infectar y reproducirse en células procariontes o bacterias que se encuentran metabólicamente activas. Su genoma esta compuesto por moléculas de ADN o ARN, y están rodeadas por una envoltura proteica. Los bacteriófagos utilizan generalmente la maquinaria celular para sintetizar su material genético y las proteínas de la envoltura. Pueden encontrarse en casi todos los lugares, pero se presentarán preferencialmente donde estén sus huéspedes obligatorios.

2.1.1 Estructura

Los fagos están compuestos por una cápside que contiene el material genético, y puede ser: ADN de cadena sencilla, ADN de cadena doble, ARN de cadena sencilla o ARN 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 ADN de algunos fagos se caracteriza por contener bases raras que substituyen alguna o algunas de las bases normales presentes en el ADN, esto permite distinguir fácilmente entre el ácido nucleico del virus y aquel que corresponde a la bacteria hospedera (Griffiths, et al, 2000).

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*, esta cola esta 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 huésped y el fago (Jenkins, 1986) Ver Figura 1. Otros bacteriófagos usados normalmente en la investigación genética son, el fago F2, que es un virus pequeño que no presenta cola y

su ADN es de cadena sencilla, el fago M13 que es filamentosos y sin cabeza y el bacteriófago λ , el cual presenta una cola larga y delgada pero no tiene fibras de la cola. Ver figura 2.

La diversidad y la complejidad estructural de los fagos resulta del número y organización de las diferentes proteínas que constituye la cubierta, así como del tipo y estructura del cromosoma (Jenkins, 1986).

Al unirse los fagos a la bacteria hospedera, el cromosoma pasa a través de la cola hueca y entra en la bacteria, donde esta será capaz de replicarse, formar sus proteínas específicas y así finalmente llevar a cabo la formación de las partículas virales, o su descendencia.

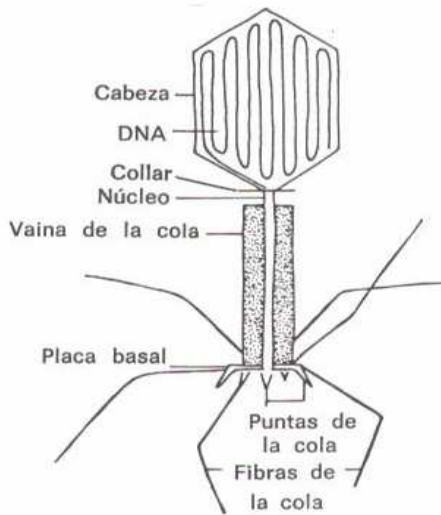


Figura 1. Esquema del fago T4 (Jenkins, 1986).

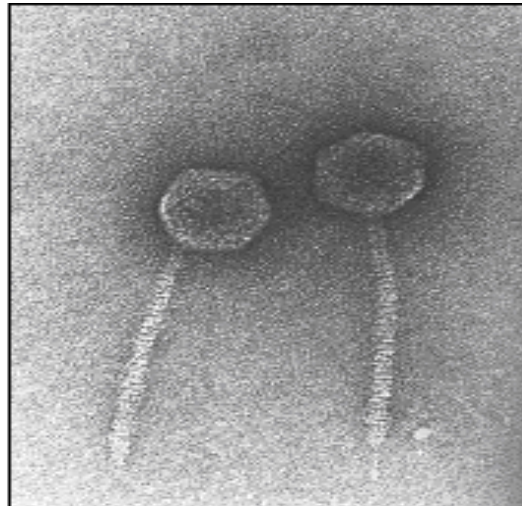


Figura 2. Estructura bacteriófago λ (Jenkins, 1986)

2.1.2 Ciclo de vida

Los fagos pueden ser clasificados según el ciclo de vida que lleven; es decir los fagos que infecten y además lisen a las células hospederas son fagos que son siempre virulentos y llevan a cabo el ciclo lítico produciendo descendencia. En adición a lo anterior, o sea los fagos que además del ciclo lítico son capaces de integrar su genoma al cromosoma bacteriano y a la vez replicarse en forma pasiva junto con él, se conocen como temperados o lisogénicos. Estos fagos no siempre permanecen asociados al cromosoma bacteriano sino que pueden escindirse y llevar a cabo un ciclo lítico dependiendo de ciertas condiciones del ambiente. La bacteria hospedera que posee el cromosoma del fago integrado a su cromosoma (profago), tiene ventajas con respecto a otras, ya que este profago le confiere inmunidad o resistencia a la infección por otros fagos, además de otras características adicionales, fenómeno que en conjunto se le ha denominado conversión lisogénica.

Para que cualquiera de los dos ciclos de vida pueda ser llevado a cabo es necesario que ocurra primeramente la unión del fago a la bacteria huésped. En este proceso primero se presenta un reconocimiento entre el fago y la bacteria, que es el proceso de adsorción, y se realiza sobre áreas específicas (receptores), que tiene que reconocer el fago antes de su infección. En algunas bacterias como en la *E. coli*, las estructuras que pueden llegar a reconocer son lipopolisacáridos y proteínas de membrana celular (Calendar, 1988). Luego de que se da la unión del fago a la bacteria huésped, y el material genético del fago es introducido a través de la membrana. Ver figura 3.

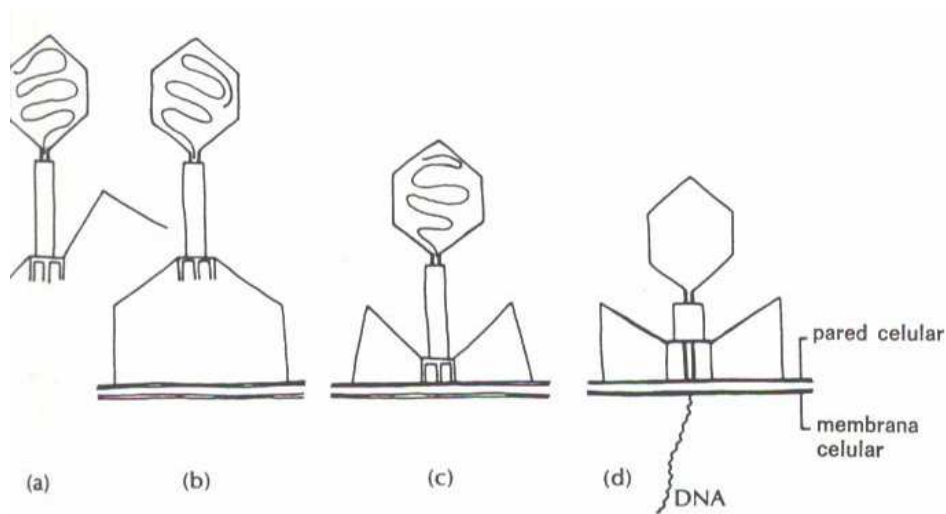


Figura 3. Estadios en la unión de los fagos a la superficie exterior (Jenkins, 1986).

Posteriormente el fago dirige la síntesis de enzimas, en el caso específico del fago T4, detiene la síntesis del ADN bacteriano y este es procesado, para luego dirigir la de su propio material genético y crea varios cientos de copias de si mismo y de las proteínas que lo componen, aprovechando toda la maquinaria de la célula hospedera. Una vez completada la síntesis, las moléculas de ADN son empaquetadas en las precapsides y, llevando a cabo finalmente la culminación del ciclo de vida. Induce la lisis celular, y de esta forma, los nuevos virus son liberados al medio, donde pueden volver a iniciar un nuevo ciclo de infección.

Por otro lado, en el ciclo lisogénico, como en el caso del fago λ , el material genético del fago se integra al cromosoma de la bacteria huésped, replicándose junto con el de este por varias generaciones, haciendo que la bacteria original herede el profago, a las subsecuentes progenies bacterianas.

2.1.3 Lisis

Para que ocurra la replicación del material genético, como en el caso del fago T4, este al infectar a la célula, su ADN debe de tener bases modificadas (glicosilación y/o metilación), para evitar así la auto-degradación por nucleasas, además de que el fago T4 sintetiza una serie de proteínas denominadas proteínas tempranas, las cuales bloquean la entrada de la membrana citoplasmática por donde ingresó el genoma viral. Nucleasas del fago degradan el ADN bacteriano, lo que proporciona una fuente de precursores, evita la síntesis de ARN y proteínas bacterianas, y utiliza los ribosomas para la síntesis de proteínas del fago. La lisis de *E. coli* por fagos lambdoides ha sido muy bien estudiada, comenzando con Jacob y Fuerst en 1958 quienes demostraron que los lisados lambdoides contenían una proteína denominada endolisina que era capaz de degradar el peptidoglicano de la pared celular.

2.2 Colifagos

La denominación de los fagos se relaciona directamente con el huésped específico bacteriano al que infectan. Así, en el caso de los colifagos, se habla de fagos capaces de infectar a las cepas de *E. coli*.

Los colifagos somáticos, cubren un extenso rango de fagos, y se caracterizan por que son capaces de infectar al huésped a través de la superficie celular. Han sido propuestos como indicadores de la calidad del agua, junto con los colifagos F específicos (infectan a la *E. coli* y otras enterobacterias, a través del pili codificado por el plásmido F) y los bacteriófagos de bacteroides (infectan bacteroides a través de la pared celular) (Llivina et al. 2002). Estos conforman el grupo de los tres bacteriófagos que infectan bacterias entéricas y se encuentran abundantemente en las aguas residuales, a donde llegan, después de haber pasado a través del tracto gastrointestinal de animales (Kasman, 2005). Sus poblaciones son mucho más grandes que las de enterovirus y son muy resistentes a los procesos de desinfección.

Los colifagos presentan una cápside o una envoltura proteíca que contiene el material genético. La cápside puede contener y estar unida a la cola y a las fibras de la cola. Estos se encuentran clasificados dentro de las siguientes familias: *Myoviridae* (ADN doble cadena, cola larga y contráctil, cápside de 100 nm), *Siphoviridae* (ADN doble cadena, cola larga no contráctil, cápside de 50 nm), *Podoviridae* (ADN doble cadena, cola corta no contráctil, cápside de 50 nm) y *Microviridae* (ADN cadena sencilla, no presenta cola, cápside de 30 nm). Todos estos tipos están en aguas residuales, sin embargo, los más abundantes son *Myoviridae* y *Siphoviridae* (Ackermann 1983; Muniesa et al. 2002) Ver figura 4.

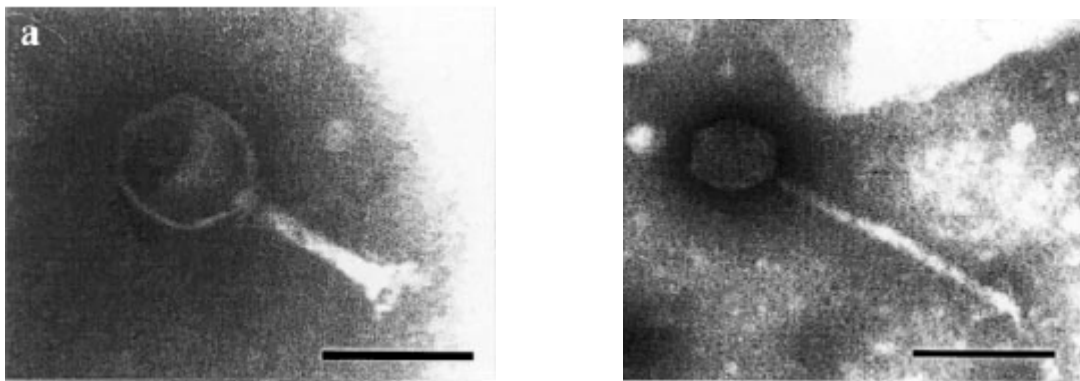


Figura 4. Morfología de bacteriófagos aislados de muestras naturales. (a) *Myoviridae* (fago MY2); (b) *Siphoviridae* (fago SR51) (Duran, 2001).

En aguas residuales, los colifagos somáticos son detectados en cantidades muy altas, principalmente como resultado de la contaminación fecal. Sin embargo, por su escasa replicación, en el ambiente, es considerada como una desventaja en el uso como indicador de la calidad del agua (Muniesa et al. 2002). No obstante, los colifagos aunque están presentes en cantidades muy bajas en las heces humanas y de animales, están en números elevados en las aguas residuales. Frecuentemente estarán en aguas que contienen *E. coli* y por tanto serán indicadores de contaminación fecal, además por ser mas resistentes a los factores ambientales, y a la cloración, en comparación a

las bacterias coliformes y otras. Su presencia en plantas potabilizadoras indican fallas en algún paso del tratamiento, y en especial en la cloración (Atlas y Bartha, 2002). Por otro lado, los colifagos también pueden llegar a tener un potencial de impacto en la salud, debido a que pueden alterar la flora gastrointestinal, o la flora comensal *in situ* (Kasman, 2005).

2.3 Bacterias hospederas resistentes

Las bacterias para evitar ser infectadas y eliminadas, poseen sistemas eficientes de defensa. Hoy en día, las bacterias y sus virus se ubican como los organismos y las entidades más ancestrales, además de que son los más abundantes en la Tierra, es por esto que las interacciones bacterias–bacteriófagos son las más ricas que pueden existir entre dos diferentes organismos, en el ambiente. Esto indica que deben de existir un alto número de mecanismos de exclusión o inmunidad. Dichos mecanismos se encargan de impedir de una u otra forma que los fagos infecten y se desarrollen en una bacteria. Lo mas común es cuando una bacteria que es lisogena, adquiere inmunidad por medio de el profago, el cual no va a permitir que otros fagos idénticos a él la infecten (Uc-Mass et al, 2004).

Entre los mecanismos de exclusión mas conocidos están los que alteran los receptores de los fagos. En un trabajo previo, entre otros, se reportó un mecanismo de inhibición a nivel de los receptores específicos para la unión del fago a la bacteria. Algunos fagos como T1, T5, N15, Φ 80, HK022 y recientemente el fago mEp167, requieren para infectar el receptor FhuA de la bacteria, el cual es utilizado también como receptor para el complejo hierro–ferricromo. Sin embargo, la bacteria al poseer un profago mEp167, el cual posee un gen que codifica para una proteína denominada Cor, que se encarga de modificar la función del receptor, impidiendo así la entrada del ADN fágico (Uc-Mass et al, 2004).

En adición a esta barrera de exclusión, existen otros diferentes factores que influyen en el desarrollo de estos en el ambiente. Algunos reportes y observaciones indican que las bacterias hospederas susceptibles no están presentes en densidades suficientemente altas para permitir que se de una infección persistente por parte de los fagos. Cuando la concentración de fagos en estos ambientes es baja, se requiere de densidades muy altas de células hospederas para que ocurra un significativo número de infecciones. Cuando una comunidad de bacterias se encuentra en su punto “máximo” teniendo un sin número de diferentes especies de bacterias, tales que acaparan todas las fuentes de energía y de carbono, resulta difícil o imposible que una nueva bacteria llegue a establecerse. Un bacteriófago podría enfrentar un obstáculo similar, aunque no en términos de necesidades metabólicas, si no mas bien que la mayoría de los fagos lisógenos pudieran inhibir la superinfección de su hospedero por fagos de tipos similares (Kasman, 2005).

2.4 Ecosistemas de bacterias y bacteriófagos

La cantidad de bacterias y de bacteriófagos en un ecosistema natural es un punto importante que se debe tener en cuenta para estudiar las interacciones ecológicas que existen entre ellos, ya que estas interacciones dependen de la densidad de las poblaciones que la conforman.

Anderson (1957), afirma que la concentración de fagos y bacterias hospederas en un cultivo de laboratorio, debe exceder para ambos de 10^6 /ml antes de que los fagos puedan ejercer un efecto selectivo. Sin embargo, al realizar un estudio con cinco cepas de *Salmonella*, encuentra que las concentraciones de fagos en aguas residuales y heces nunca excedió de 10^6 y 2×10^2 / ml, respectivamente. Debido a esto, concluye que para éste y otros sistemas, la presencia de fagos probablemente no es significativa para afectar a sus hospederos bacterianos. Sin embargo, no se sabe si los datos derivados de cultivos de laboratorio representan las condiciones adecuadas de un sistema natural abierto como lo es en el que se presentan los sistemas fagos-

hospederos y tampoco se sabe si es valido usar cepas bacterianas extrañas para enumerar los fagos en un sistema natural.

Por otro lado Lenski y Levin, (1985), plantean que un aspecto importante de la coevolución de parásitos y sus hospederos es en la que se presenta una lucha de gen a gen entre las defensas de los hospederos y la contradefensa de los parásitos. Ellos, analizaron las mutaciones, en un modelo donde las interacciones entre bacterias y fagos virulentos pueden ser consistentes con este escenario. El modelo asume un hábitat abierto en donde los fagos virulentos y las bacterias sensibles pueden coexistir. El equilibrio de las densidades de bacterias y fagos es inversamente proporcional a la eficiencia con que los fagos se adsorben irreversiblemente a sus hospederos y la tasa absoluta en que aparecen las mutaciones es proporcional a la densidad de la población, y su tasa de incremento y tasa de mutaciones.

Ellos asumieron la hipótesis de que la persistencia de fagos tipo silvestre indica la presencia de una población minoritaria de bacterias sensibles, las cuales persisten porque existe una restricción selectiva, produciendo una desventaja competitiva para las bacterias resistentes, bajo condiciones de recursos limitados. Plantean que existe una asimetría en la coevolución de bacterias y fagos, debido a que ocurren mutaciones que confieren resistencia, ya sea porque se originan, se pierden o se modifican funciones de genes, y en mutaciones del rango de hospedero se generan alteraciones en la función de un gen (Hattmant, 1963). Estas restricciones muestran como se pueden generar las luchas interminables entre bacterias y fagos virulentos.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Los fagos son tan abundantes como las bacterias en ecosistemas, y están presentes en el rumen de bovinos, aguas naturales, suelo, heces, aguas residuales, etc. (Donald y Paynter, 1980). Se sabe que los fagos son los parásitos intracelulares de las bacterias. Sin embargo, su efecto en las poblaciones bacterianas no es bien conocido y mucho menos, en sistemas dinámicos como son los lodos activados y las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Pocos estudios han sido enfocados sobre la actividad de los fagos en los ambientes antes mencionados y la mayoría de las aportaciones son teóricas o estudios a nivel de laboratorio, donde se utilizan cepas bien caracterizadas, así como sus respectivos fagos. Por consiguiente, son muy pocos los estudios sobre el análisis de la relación fago-hospedero, en ecosistemas con cepas y fagos aislados directamente de su ambiente natural.

Las interacciones de parasitismo que se da entre los fagos y los hospederos bacterianos pueden llegar a ser muy eficientes en las plantas de tratamiento de aguas, ya que abundan diferentes especies de bacterias patógenas y no patógenas, debido a que son transmitidas de las aguas residuales a sedimentos que se generan en los procesos del tratamiento. Los microorganismos patógenos pueden ser transmitidos por vía fecal-oral, debido a que los sedimentos pueden ser utilizados para aplicarse al suelo, suministrando nutrientes importantes y mejorando las propiedades del suelo, para producir mejores cultivos. Sin embargo, el sedimento puede contener bacterias patógenas que puede contaminar de alguna forma los cultivos y consecuentemente producir infecciones a los humanos. Lo mismo puede suceder con las aguas contaminadas que salen de la planta de tratamiento y que son usadas para el riego de cultivos. Por ello, el conocer que tan efectiva podría resultar la actividad de los fagos en estos ambientes, sería de gran importancia, ya que los fagos podrían ayudar a

solucionar gran parte de ésta problemática, eliminando gran parte de las bacterias patógenas, entre ellas las de *E. coli*, antes de ser diseminadas a los sedimentos, ríos y otras aguas naturales. El estudio se podría extrapolar para otras bacterias patógenas como *Klebsiella* o *Shigella* entre otras, y de esta manera hacer más efectivo el tratamiento de aguas residuales.

En el presente trabajo se desea conocer que tan susceptibles resultan ser las bacterias de estos ecosistemas a la infección por fagos nativos. Para esto se utilizaron diferentes cepas de *E. coli*, aisladas de diferentes regiones geográficas y de diferentes orígenes como: heces de animales domésticos, silvestres y de muestras de aguas residuales. Así mismo los fagos fueron obtenidos a partir de aguas residuales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la susceptibilidad de bacterias hospederas *Escherichia coli* a la infección por colifagos aislados de aguas residuales de diferentes lugares de México.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar bacterias *Escherichia coli* a partir de muestras de aguas residuales
- Realizar bioquímicas, para confirmar que las bacterias aisladas de muestras fecales de animales y de aguas residuales, corresponden a *Escherichia coli*.
- Determinar que las bacterias *Escherichia coli* no sean lisógenas.
- Aislar y purificar diferentes tipos de fagos a partir de muestras de aguas residuales
- Expandir y conservar los fagos aislados en cepas W3110
- Titular los fagos obtenidos.
- Determinar (la presencia o ausencia) las UFP (unidades formadoras de placa), en las diferentes bacterias *Escherichia coli* a partir de los diferentes tipos de fagos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de la investigación: Experimental

5.2 Microorganismos

La cepa que se utilizó como prototipo o control fue la W3110 derivada de la *E. coli* K12, también se utilizaron cepas con diferentes serotipo O (proporcionadas amablemente por el Dr. Cravioto), las de la serie V.S. (Proporcionadas por la Dra. Valeria Sousa, y aisladas de muestras fecales de animales silvestres). Estas cepas forman parte del cepario del Dr. Kameyama del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV. La serie E.C y M, fueron aisladas de muestras de aguas residuales, seleccionadas con el medio McConkey-lactosa, las cuales se les realizaron diferentes pruebas bioquímicas para confirmar que fueran *E. coli*.

5.3 Medios de cultivo

Se utilizó el medio McConkey mas lactosa, para el aislamiento de las bacterias *E. coli*, el medio LB (Luria Bertani), para los cultivos de las bacterias *E. coli*, y el medio TB (Tryptona “broth” medio), para la dilución de fagos. (Ver Anexo 2).

5.4 Métodos

5.4.1 Obtención de bacterias de *E. coli* silvestre

Algunas de las bacterias, fueron aisladas a partir de muestras de aguas negras, de diferentes canales y riachuelos de la ciudad de México y otras ciudades de diferentes estados de este país. Las otras bacterias fueron tomadas directamente del cepario del laboratorio.

Se tomó 1 ml de muestras de aguas negras, se centrifugó a 9000 x g durante 10 min, y se colectó el botón o pastillas y a partir de este se realizó una siembra en medio McConkey más lactosa para obtener colonias aisladas. A partir de una colonia aislada se sembró en medio LB sólido para guardar en los “Stabs”, cada una de las bacterias. Los “Stab”-agar se realizaron utilizando el medio caldo nutritivo–agar, el cual después fue inoculado con las colonias aisladas y conservado a temperatura ambiente hasta su posterior uso. Por otro lado, el sobrenadante del agua residual fue recolectado para el posterior aislamiento de los fagos. A las bacterias obtenidas del cepario, también se les estrió en medio Mc Conkey y se les realizó su correspondiente stock. Para la purificación de la bacterias aisladas de las aguas residuales, se tomaron diferentes colonias presuntivas de *E. coli* y se les realizaron dos resiembras en medio Mc Conkey-lactosa.

5.4.2 Pruebas bioquímicas:

Se realizaron diferentes pruebas bioquímicas a cada una de las bacterias presuntivas; aisladas a partir de las aguas residuales, las bacterias de la serie VS, de los Serotipos O y de la serie E.C. Para confirmar la presencia de *E. coli*.

Las bioquímicas se realizaron en el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría y fueron las siguientes:

(Ver formulación de los medios en el anexo)

1. Fermentación de glucosa y lactosa, producción de H₂S y gas

Esta prueba se realizó en el medio Kligler (KIA) para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfhídrico (H₂S). Este medio

presenta en una posición inclinada (pico de flauta). Para su inoculación se toma de un cultivo puro con un asa una colonia única, se inocula en forma de “cola de pescado” realizando una picadura hasta la capa profunda y finalmente se incuba a 35°C durante 18 a 24 hrs.

2. Producción de Indol y movilidad

Esta prueba se realizó en medio SIM (sulfuro, Indol, movilidad) para determinar la capacidad de un organismo de producir Indol a partir del triptófano contenido en el medio, de movilidad y producción de H₂S. Para su inoculación se tomó de un cultivo puro una colonia única, y se realizó una punción al centro del medio, con una aguja de inoculación, hasta una profundidad de aproximadamente 1.2 cm. Finalmente se incubó a 35°C de 18 a 24 hrs.

3. Citrato

Esta prueba se realizó utilizando el medio Citrato de Simmons para determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad. Para su inoculación se tomó una colonia aislada de un cultivo puro y luego ésta se inoculó en forma de “cola de pescado” sobre el medio en “pico de flauta”. Por último se incubó a 35°C de 18 a 24 hrs.

4. Malonato

Para esta prueba se utilizó el caldo malonato que es útil para determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente alcalinidad. A partir de una colonia aislada se realizó un inóculo poco denso y luego se incubó a 35°C de 24 a 48 hrs.

5. Hidrólisis de urea

Esta prueba se realizó usando el agar urea de Christensen para determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. Este Medio fue inoculado a partir de una única colonia obtenida de un cultivo puro, posteriormente ésta fue inoculada en “cola de pescado” en toda la superficie del “pico de flauta”. En esta inoculación se cuidó no hacer punción de la capa profunda, porque esta sirve como control del color. La incubación se llevó a 35°C de 6 a 24 hrs.

6. Descarboxilación de aminoácidos (LOA)

La mezcla de aminoácidos usada fue: Lisina, Ornitina y Arginina. Para esta prueba se utilizó base de descarboxilasa de MØller para medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad. La inoculación se realizó tomando una colonia aislada de un cultivo puro, luego se hizo un inculo liviano. Con cada mezcla de aminoácidos se inoculó un tubo control sin aminoácido y se cubrieron todos los tubos incluyendo el del control con 2 o 3 ml de parafina. Esto para que el microorganismo consuma el oxígeno del medio y así se controle el pH. Los tubos se incubaron a 35°C de 24 hrs, a 4 días.

7. Fermentación de hidratos de carbono (inositol y sorbitol)

Para esta prueba se utilizó caldo básico rojo de fenol para determinar la capacidad de un organismo de degradar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido. Para su inoculación se pasó el asa sobre el crecimiento de un cultivo y posteriormente, ésta se introdujo en cada uno de los tubos de hidrato de carbono, luego cada tubo fue agitado suavemente e incubado 35°C de 18 a 24 hrs.

8. Rojo de Metilo (RM) y Voges Proskauer (VP)

Para esta prueba se utilizó el caldo RM/VP para comprobar: a) la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema, b) funciona como prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación del pH) y c) determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol, a partir de la fermentación de la glucosa. Para su inoculación se tomó una colonia de un cultivo puro y se introdujo al tubo con un asa, e incubó a 35°C por 48 hrs. Después se agregó el indicador de pH rojo de metilo. El caldo RM/VP se empleó también para la reacción de VP, que se determina después de 24 a 48 hrs de incubación. Esta prueba se realiza cuando el RM da negativo.

5.4.3 Determinación de bacterias *E. coli* no lisógenas

La determinación de bacterias no lisógenas fue realizada utilizando los “stocks” de cada una de las bacterias. A partir de estos, se tomó una alícuota, la cual fue sembrada en medio LB sólido para obtener colonias aisladas. Posteriormente, a partir de estas colonias se realizó un cultivo líquido de toda la noche en 5 ml de medio LB. De las *E. coli* crecidas durante toda la noche, se tomó 1ml de cultivo, se centrifugó a 9000 x g durante 10 min y se colectó el sobrenadante en un tubo limpio. Las bacterias remanentes del sobrenadante se eliminaron adicionando una o dos gotas de cloroformo, y agitando fuertemente, posteriormente se centrifugó a 9000 x g por 10 min y se colectó nuevamente el sobrenadante. A partir de éste, se realizaron diferentes diluciones 1/100, las cuales fueron goteadas en los tapices bacterianos de las cepas de W3110 Y LE392. Para observar la presencia de placas se incubaron las cajas a 37°C por 24 hrs.

5.4.4 Obtención de fagos de su fuente natural

A partir de las muestras de aguas negras, se centrifugó 1 ml a 9000 x g durante 10 min, se recolectó el sobrenadante y se eliminaron las bacterias remanentes adicionando 1 o 2 gotas de cloroformo. Por otro lado se realizó un tapiz celular, colocando 250 µl del sobrenadante obtenido (este volumen puede variar según la carga de fagos que contenga la muestra de agua) y 300 µl de un cultivo bacteriano crecido hasta saturación (se deja reposar durante 10 min, para que ocurra la adsorción del fago a la bacteria), se le agregaron 3 ml de medio TB suave líquido mantenido a 45°C y todo el contenido fue mezclado con un vortex para después vaciarlo a una caja petri con TB agar. Este tapiz también fue realizado utilizando la bacteria control W3110. Las cajas con los tapices fueron incubadas a 37°C por 24 hrs.

A partir de las placas observadas, de cada tapiz bacteriano se tomaron por lo menos 3 diferentes tipos de placas, y se propagó cada una por separado en cajas petri bajo las mismas condiciones (tapiz celular y medio TB sólido). Las cajas se incubaron a 37°C por 24 hrs.

5.4.5 Expansión y conservación de fagos

A partir de las placas, se realizaron los lisados bacterianos correspondientes, por medio del procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989). En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se colocaron 300 µl de un cultivo a saturación de la cepa *E. coli*. A este cultivo se le adicionó una placa del fago previamente propagada y de 2 a 3 gotas de sulfato de magnesio, para favorecer la adsorción. El matraz fue incubado por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 10 ml de medio líquido LB, se incubó nuevamente a 37°C en agitación constante hasta la generación de la lisis bacteriana. Una vez lisadas las bacterias, se agregaron 500 µl de cloroformo y el matraz se dejó 15 min más en agitación a 37°C. Posteriormente se centrifugó el cultivo lisado a 3000 x g y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo limpio y

estéril para obtener los “stocks” de fagos, los cuales se conservaron en refrigeración a 4°C.

5.4.6 Titulación de los lisados de los fagos obtenidos

Se gotean diferentes diluciones de los concentrados (stocks) de los fagos deseados sobre tapices de *E. coli*. Los tapices celulares se realizaron colocando 300 µl de un cultivo de una cepa bacteriana, crecida hasta saturación, en un tubo de ensayo. Se le agregaron 3 ml de medio TB suave (mantenido a 45°C). Agitando la mezcla y vaciándola a una caja petri con TB. Una vez que el medio hubo solidificado, se gotearon las diluciones de los fagos (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) en un caja petri con un tapiz de la bacteria W3110, luego las cajas fueron incubadas a 37°C por 24 hrs. Finalmente se contaron las UFP/ml (unidades formadoras de placa).

5.4.7 Determinación de la presencia o ausencia de UFP en diversas bacterias *E. coli*

Este ensayo se realizó a partir de 300 µl de cultivo de las diferentes cepas de *E. coli* crecidas toda la noche, a los cuales se les adicionó 3 ml de medio TB suave. Esta mezcla fue vertida en cajas con medio TB sólido y una vez solidificado el medio, se gotearon sobre éstas cajas, las distintas diluciones con fagos (desde 1×10^0 hasta 1×10^{-8}) incubándolas a 37°C por 24 hrs y posteriormente se determinó la presencia o ausencia de placas líticas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de bacterias *E. coli*

La *Escherichia coli* es una bacteria que pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, son anaeróbicas facultativas y se encuentra generalmente en el intestino de humanos y animales, y por ende en las aguas residuales. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa presentes en algunos medios de cultivo (Breed, 1957).

Un organismo puede utilizar diversos sustratos presentes en el medio. Diferentes sustratos metabolizados pueden ser utilizados para la diferenciación de especies bacterianas, (Mac, 1993). El medio McConkey-lactosa, es uno de los medios utilizados para el aislamiento de la especie *E. coli*. Este es un medio selectivo debido a su alta concentración de sales biliares y a la presencia del cristal violeta, de manera que sirve como inhibidor de la flora acompañante (cocos y bacilos Gram positivos) y favorecen el crecimiento de las enterobacterias. Las bacterias de esta especie tienen la facultad de fermentar el hidrato de carbono (lactosa) presente en el medio, con la producción de ácido, mediante la actividad de la enzima β -galactosidasa generando dos monosacáridos: glucosa y galactosa, los cuales son metabolizados y entran al ciclo de Krebs para dar finalmente CO_2 , H_2O y energía. Debido a que se generan productos que acidifican el medio, el indicador de pH del medio (rojo neutro) hace que las colonias que fermentaron la lactosa se vean de un color rojo y las que no de un color amarillo. Ver figura 5.

A partir de las muestras de aguas residuales y las obtenidas por el cepario, se logró tener un total de 81 cepas bacterianas, que fueron crecidas en el medio Mc Conkey-lactosa, para de esta manera observar cuales de ellas eran posibles *E. coli*. Ver tabla 1



Figura 5. *E. coli* fermentadora de lactosa en medio Mc Conkey-lactosa

Tabla 1. Cepas fermentadoras de lactosa en medio Mc Conkey

Origen	Código	Fuente	n
Cepas ambientales aisladas de diferentes regiones de México	M1B1	Aguas negras	1
	M1B3	“	1
	M3B1	“	1
	M3B3	“	1
	M4B1	“	1
	M5B1	“	1
	M6B3	“	1
	M7B2	“	1
Cepas ambientales proporcionadas por el cepario de genética del CINVESTAV	E.C.	Aguas negras	23
Cepas ambientales proporcionadas por la Dra. Valeria Sousa (contenidas ahora en el cepario de genética del CINVESTAV)	V.S.	Heces fecales de animales	19
Cepas serotipo O, proporcionadas por el Dr. Cravioto (contenidas ahora en el cepario de genética del CINVESTAV)	O	Regional	20

M = Muestra de agua residual, B = Bacterias aisladas; E.C. = *E. coli*

Se obtuvieron en total 70 presuntivas cepas de *E. coli*. El aislamiento de las bacterias utilizando un medio diferencial y selectivo como el de Mc Conkey-lactosa, no es indicativo para asegurar que la bacteria es de la especie *E. coli*, es por esto que se realizaron una serie de pruebas bioquímicas. Únicamente se les realizó a 58 bacterias.

Las pruebas bioquímicas sugeridas para la identificación de *E. coli* son indol, citrato, sorbitol, Rojo de Metilo y Voges Proskauer. *E. coli* es productora de indol, no utiliza el citrato como única fuente de carbono, fermenta el sorbitol y es Rojo de Metilo positivo y Voges Proskauer negativo. No obstante, en este estudio se realizaron otras pruebas como la hidrólisis de la urea, descarboxilación de algunos aminoácidos, utilización del malonato y fermentación del inositol, que ayudaron a definir mejor la caracterización de las bacterias. Ver Tabla 2a.

Los resultados indicaron que de las 58 cepas evaluadas, 48 (83%), pertenecieron a la especie *E. coli*, algunas otras pertenecieron a especies como *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*. Estos datos coinciden con lo reportado. Se incluyó la cepa W3110 como control positivo y los resultados se indican en la tabla 2b.

Tabla 2a. Pruebas bioquímicas realizadas

Bacteria	G	L	I	M	S	Gas	C	U	Li	Or	Ar	Malo	Ino	Sor	RM	VP
O-1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
O-2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
O-3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
O-4	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
O-5	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
O-8	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
O-9	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
O-10	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
O-11	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
O-13	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
O-17	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
O-18	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
O-19	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
O-22	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-

Bacteria	G	L	I	M	S	Gas	C	U	Li	Or	Ar	Malo	Ino	Sor	RM	VP
O-23	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
O-25	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
O-27	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
O-30	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
VS-54	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
VS-62	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VS-67	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VS-68	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
VS-71	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
VS-72	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
VS-74	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VS-75	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VS-76	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VS-77	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
VS-100	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
EC-4	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
EC-5	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
EC-6	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
EC-7	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
EC-8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
EC-9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
EC-10	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
EC-11	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
EC-12	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
EC-13	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
EC-14	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
EC-15	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
EC-16	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
EC-17	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
EC-18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
EC-19	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
EC-20	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
EC-21	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
EC-23	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
EC-24	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
EC-28	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
M1B1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
M1B3	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
M3B3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
M3B1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M4B1	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Bacteria	G	L	I	M	S	Gas	C	U	Li	Or	Ar	Malo	Ino	Sor	RM	VP
M5B1	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
M6B3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
M7B2	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
C+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
C-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+

C- = Control negativo (*Klebsiella pneumoniae*); C+ = Control positivo (*E. coli* W3110); Cepas sorbitol (-); Cepas de otra especies (EC-4, *Enterobacter cloacae*; M1B3, *Klebsiella oxytoca*); Cepa contaminada, G(glucosa), L(lactosa), I(Indol), M(movilidad), S(H₂S), C(citrato), U(urea), Li(lisina), Or(ornitina), Ar(arginina), Malo(malonato), Ino(inositol), Sor(sorbitol), RM(rojo de metilo), VP(Voges Proskauer)

Tabla 2b. Caracterización bioquímica de *E. coli*

Bioquímicas	E. coli K12 W3110	Obtenido (%)	Reportado %
Fermentación de Glucosa	+	48 (100)	100
Fermentación de Lactosa	+	47 (98)	95
Producción de Indol	+	45 (94)	98
Movilidad	-	31 (65)	50
Producción de H ₂ S	-	0 (0)	1
Citrato de Simmons	-	0 (0)	1
Hidrólisis de Urea	-	0 (0)	1
Lisina Descarboxilasa	+	38 (79)	90
Ornitina Descarboxilasa	-	27 (56)	65
Arginina dihidrolasa	-	0 (0)	17
Utilización de Malonato	-	0 (0)	0
Fermentación de Inositol	-	0 (0)	1
Fermentación de Sorbitol	+	48 (100)	94
Rojo de Metilo	+	48 (100)	99
Voges-Proskauer	-	0 (0)	0
Producción de Gas	+	21 (44)	--

Estos resultados confirman que casi la totalidad de las bacterias analizadas fueron *E. coli*. Como era de esperarse, son muy abundantes en ecosistemas como el de las aguas residuales y heces fecales, lo cual indica que probablemente los fagos también sean parte activa de estos ecosistemas. Sin embargo, aunque los fagos se encuentren también en grandes cantidades, junto con sus hospederos, no nos indica que tan eficiente es su producción, ni que tan infectivos son.

6.2 Bacterias de *E. coli* no lisógenas

Existen ciertas bacterias que son portadoras de profagos. A estas bacterias se les denominan lisógenas o lisogénicas y muestran que algunos fagos, no obstante de que son capaces de adsorberse a ellas, no producen la subsecuente lisis bacteriana, por lo que resultan ser resistentes a la destrucción. Esto es debido, en algunos casos, al profago que portan.

La lisis de estas bacterias lisogénicas ocurre solamente cuando estas células han sido estimuladas por algún agente externo como la luz ultravioleta (U.V.), la mitomicina C, o tratamientos con otros factores inductores. Así en el sobrenadante de estos cultivos se tienen la presencia de fagos.

Los sobrenadantes de los cultivos de cada una de las cepas aisladas, fueron analizados para observar la presencia de fagos, los cuales podrían generar placas en los tapices de las bacterias W3110 y LE392. Los resultados obtenidos muestran que muy pocas bacterias son portadoras de fagos. Ver tabla 3. Otro grupo de bacterias, no tan significativo, mostraron ser portadoras de colicinas. Ver tabla 3.

Las colicinas son proteínas antibióticas, producidas por ciertas cepas de *Enterobacteriaceae*, las cuales son letales para otras bacterias entéricas relacionadas.

La habilidad para sintetizar colicinas depende de la presencia de un factor colicinogénico (factor Col). Ciertos factores Col provienen de elementos genéticos estables, no esenciales, de plásmidos naturales de ADN. Los factores Col se caracterizan por estar asociados a genomas de fagos lisogénicos y virulentos defectivos. Estos difieren en sus propiedades de fertilidad, en ciertas características de exclusión de fagos, y su peso molecular (Herschman et al. 1967).

La síntesis de ciertas colicinas puede ser inducida al igual que algunos profagos mediante la luz ultravioleta, mitomicina C o bien por el secuestro de timina. Su fenotipo característico es formar halos de inhibición parecidos a las placas líticas y similares a las producidas por algunos fagos (Reeves, 1972). Debido a esto, y para evitar la introducción de más variables, tanto las bacterias portadoras de fagos como las portadoras de colicinas fueron descartadas en este estudio.

Tabla 3. Cepas *E. coli* portadoras de fagos y cepas portadoras de colicinas

Cepas <i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i> con colicinas y <i>E. coli</i> lisogenas (goteo de sobrenadante en LE392 Y W3110)					Tipo de bacteria
	0	1×10^{-2}	1×10^{-4}	1×10^{-6}	1×10^{-8}	Colicinógena
O-7	+	-	-	-	-	“
O-29	+	-	-	-	-	“
V.S-60	+	-	-	-	-	“
V.S-61	+	-	-	-	-	“
V.S-80	+	3	-	-	-	Lisógena
V.S-81	+	8	-	-	-	“
*V.S-83	+	40	-	-	-	“
V.S-94	+	-	-	-	-	Colicinógena
V.S-96	+	-	-	-	-	“
E.C-1	+	-	-	-	-	“
M3-B3(2)	+	-	-	-	-	“

***VS.-83** = Las placas generadas por el profago de esta bacteria, solo se evidenciaron en el tapiz de W3110.

• Las cepas portadoras de fagos forman placas aisladas a mayor dilución a diferencia de las portadoras de colicinas.

La solución líquida obtenida a partir del cultivo de la bacteria V.S.-83 fue portador de fagos. Sin embargo, estos solo fueron capaces de formar placas en la bacteria W3110 y no en la bacteria LE392. La bacteria LE392 se caracteriza por no presentar el sistema EcoKI de restricción, codificado por los genes *hsdRMS*, y que ataca el ADN que no está protegido por una metilación específicamente en adeninas. Sin embargo, presenta el sistema de modificación, que se encarga de metilar el ADN en el sitio apropiado para que este sea reconocido como propio de la bacteria (New England Biolabs. 2005-06). A diferencia de la *E. coli* W3110 quien a parte de contar con el sistema de modificación también cuenta con el de EcoKI de restricción, por lo cual se pensaría que sería más fácil el acceso de ADN del fago en la bacteria LE392, ya que este es modificado y no tiene posibilidad de ser destruido por enzimas de restricción. Desconocemos la causa de porqué el fago no puede desarrollarse en LE392.

De las 81 bacterias aisladas, la gran mayoría (86%), resultaron ser bacterias libres de fagos y de la presencia de bacteriocinas (colicinas). Sin embargo, como se muestra en la tabla 3, el 14% fueron bacterias lisógenas o con presencia de colicinas, de los cuales, la mayoría (8) de estas 11 bacterias portaron colicinas.

6.3 Fagos aislados

A partir de diferentes bacterias no lisógenas, incluyendo la bacteria control W3110, se lograron aislar 38 fagos diferentes. Ver tabla 4. Se utilizaron 9 bacterias, 4 de la serie del serotipo O y 5 de la serie V.S. para aislar los fagos del Jm-1 al Jm-19. El resto de los fagos fueron aislados a partir de la bacteria W3110. Interesantemente, todos los fagos que se lograron obtener a partir de las 9 bacterias también fueron capaces de crecer en W3110. La cepa W3110 proveniente de la *E. coli* K12, fue la bacteria utilizada como control positivo, además se utilizó para el aislamiento de algunos fagos.

Tabla 4. Fagos aislados y las bacterias utilizadas

Bacteriófago	<i>E. coli</i> usada como señuelo	Origen de la bacteria	Agua negra	Crecimiento en W3110
Jm1	Serotipo O-5	Regional	#8	+
Jm2	“	“	“	+
Jm3	“	“	“	+
Jm4	“	“	“	+
Jm5	Serotipo O-8	“	#9	+
Jm6	“	“	“	+
Jm7	“	“	“	+
Jm8	Serotipo O-3	“	#10	+
Jm9	“	“	“	+
Jm14	Serotipo O-19	“	#13	+
Jm10	Serie V.S-67	Fecal (animal)	#11	+
Jm11	Serie V.S-62	“	#12	+
Jm12	“	“	“	+
Jm13	“	“	“	+
Jm15	Serie V.S-71	“	#14	+
Jm16	Serie V.S-72	“	#15	+
Jm17	“	“	“	+
*Jm18	*Serie V.S-83	“	#16	+
*Jm19	“	“	“	+
Jm20	W3110	Laboratorio	#1	+
Jm21	“	“	“	+
Jm22	“	“	“	+
Jm23	“	“	“	+
Jm24	“	“	#2	+
Jm25	“	“	“	+
Jm26	“	“	“	+
Jm27	“	“	#3	+
Jm28	“	“	“	+
Jm29	“	“	“	+
Jm30	“	“	#4	+
Jm31	“	“	“	+
Jm32	“	“	“	+
Jm33	“	“	#5	+
Jm34	“	“	“	+
Jm35	“	“	#6	+
Jm36	“	“	“	+
Jm37	“	“	#7	+
Jm38	“	“	“	+

* Los fagos Jm18 y Jm19, fueron aislados a partir de la bacteria lisógena VS.-83. Es posible alguna contaminación con el profago, en el subsecuente ensayo.

6.4 Análisis de la susceptibilidad bacteriana a la infección por fagos

La susceptibilidad a la infección fágica fue evaluada para 48 cepas bacterianas, utilizando los 38 fagos obtenidos a partir de diferentes muestras de aguas residuales. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5a. Ensayo de susceptibilidad de las bacterias a la infección por 38 fagos

<i>E.coli</i> Fagos	W3110 0-2-4-6-8	O-1 0-2-4-6-8	O-2 0-2-4-6-8	O-3 0-2-4-6-8	O-4 0-2-4-6-8	O-8 0-2-4-6-8
Jm1	++ +50 -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ +50 -
Jm2	++ ++ 1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm3	++ ++ 1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm4	++ +50 -	++ - - -	++ - - -	- - - - -	+ - - - -	++ + - -
Jm5	++ ++ 6	- - - - -	+ - - - -	++ + + 3	- - - - -	++ + + 4
Jm6	++ ++ 2	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ + + 4
Jm7	++ ++16	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ + + 5
Jm8	++ ++14	- - - - -	+ - - - -	++ + + 6	- - - - -	+10 - - -
Jm9	++ ++10	+ - - - -	+ - - - -	++ + + 8	- - - - -	+ - - - -
Jm10	++ +50 -	+ - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	++ + - -
Jm11	++ ++ 6	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ - - -	+ - - - -
Jm12	++ ++11	++ - - -	++ + 30 -	- - - - -	+ - - - -	++ - - -
Jm13	++ 50 - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm14	++ + 1 -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm15	++ + + 2	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm16	++ + + 2	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm17	++ + + 3	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ ++ 1
Jm18	++ + + 2	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ ++ 1
Jm19	++ + + 1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ + - -

<i>E.coli</i>	W3110	O-1	O-2	O-3	O-4	O-8
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	++ ++ 1	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm21	++ + 17 -	+ - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	++ 3 - -
Jm22	++ ++ 1	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ 9 - -
Jm23	++ + 31 -	+ - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm24	++ + 50 -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ 30 - -
Jm25	++ ++ 1	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm26	++ + 10 -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ - - -
Jm27	++ + 20 -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	+ 6 - - -
Jm28	++ + 7 -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm29	++ + 13 -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm30	++ + 30 -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ - - -
Jm31	++ ++ 7	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ - - -
Jm32	++ ++ 7	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ - - -
Jm33	++ 50 - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm34	++ + 5 -	++ - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -
Jm35	++ + 25 -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ - - -
Jm36	++ + 3 -	++ - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -
Jm37	++ + + 1	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm38	++ 13 - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ - - -

<i>E.coli</i>	O-9	O-10	O-11	O-13	O-17	O-18
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm2	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm3	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm4	- - - - -	++ + 50 -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm5	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm6	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm7	- - - - -	+ - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm8	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm9	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm10	++ - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm11	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm12	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -
Jm13	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm14	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm15	- - - - -	- - - - -	++ + + 1	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm16	- - - - -	- - - - -	++ + 50 -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm17	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm18	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm19	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	O-9	O-10	O-11	O-13	O-17	O-18
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm21	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm22	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm23	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm24	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm25	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm26	++ + 4 -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm27	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm28	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm29	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm30	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm31	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm32	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm33	- - - - -	6 - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm34	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	++ - - -	++ - - -	++ + - -
Jm35	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm36	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	++ - - -	++ - - -	++ + - -
Jm37	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm38	+ - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	O-19	O-22	O-23	O-25	O-27	O-30
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm1	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm2	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm3	- - - - -	- - - - -	++ + + 3	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm4	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ - - -
Jm5	- - - - -	- - - - -	++ + 50 -	- - - - -	+ - - - -	+ - - - -
Jm6	- - - - -	- - - - -	++ + 50 -	- - - - -	++ - - -	++ - - -
Jm7	- - - - -	- - - - -	++ + 2 -	+ - - - -	++ - - -	+ - - - -
Jm8	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm9	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm10	- - - - -	++ + 20 -	++ + 22 -	- - - - -	+ - - - -	+ - - - -
Jm11	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm12	- - - - -	++ - - -	++ + 50 -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm13	++ 35 - -	+ - - - -	+ - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm14	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm15	- - - - -	- - - - -	++ + - -	++ 5 - -	- - - - -	- - - - -
Jm16	- - - - -	- - - - -	++ + - -	++ 2 - -	- - - - -	- - - - -
Jm17	- - - - -	++ - - -	++ + 30 -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm18	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm19	- - - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	O-19	O-22	O-23	O-25	O-27	O-30
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	++ - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	+ 13 - - -	- - - - -
Jm21	- - - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm22	- - - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm23	- - - - -	- - - - -	++ + 18 -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm24	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	+ 5 - - -	- - - - -
Jm25	- - - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm26	- - - - -	++ + - -	++ + - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm27	- - - - -	- - - - -	++ + - -	++ + - -	- - - - -	- - - - -
Jm28	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm29	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm30	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	15 - - -	- - - - -
Jm31	+ - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm32	+ - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -
Jm33	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm34	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm35	- - - - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	18 - - -	- - - - -
Jm36	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm37	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm38	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	VS-54	VS-62	VS-67	VS-74	VS-75	VS-76
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm1	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm2	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm3	- - - - -	- - - - -	++ + 40 -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm4	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm5	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm6	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm7	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm8	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm9	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm10	+ - - - -	++ - - -	++ + 15 -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm11	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm12	+ - - - -	- - - - -	++ + - -	+ - - - -	++ + - -	++ + - -
Jm13	- - - - -	++ 20 - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm14	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm15	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm16	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm17	- - - - -	++ - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm18	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm19	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	VS-54	VS-62	VS-67	VS-74	VS-75	VS-76
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm21	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ + - -	++ + - -	+ - - - -
Jm22	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm23	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm24	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm25	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm26	+ - - - -	++ + 4 -	++ + - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm27	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm28	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm29	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm30	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm31	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm32	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm33	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm34	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ - - -	++ - - -	+ - - - -
Jm35	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm36	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ + - -	++ - - -	+ - - - -
Jm37	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm38	- - - - -	- - - - -	- - - - -	30 - - - -	+ - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	VS-77	VS-100	E.C-5	E.C-6	E.C-7	E.C-8
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm1	- - - -	++ - -	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -
Jm2	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm3	- - - -	++ - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm4	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm5	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm6	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm7	+ - - -	- - - -	++ + -	+ - - -	- - - -	- - - -
Jm8	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm9	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm10	- - - -	++ + -	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -
Jm11	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm12	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm13	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm14	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm15	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm16	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm17	- - - -	+ - - -	- - - -	+ - - -	- - - -	++ + -
Jm18	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm19	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -

<i>E.coli</i>	VS-77	VS-100	E.C-5	E.C-6	E.C-7	E.C-8
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm21	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	++ + -	- - - -
Jm22	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ + -
Jm23	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm24	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	+ - - -	- - - -
Jm25	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm26	- - - -	++ - -	- - - -	+ - - -	- - - -	+ - - -
Jm27	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm28	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm29	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm30	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm31	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -	++ + -
Jm32	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ + -
Jm33	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm34	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -
Jm35	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm36	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	+ - - -	- - - -
Jm37	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm38	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -

<i>E.coli</i>	E.C-9	E.C-12	E.C-13	E.C-14	E.C-15	E.C-16
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm1	++ - - -	+ - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm2	++ - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm3	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm4	- - - - -	++ + 50 -	- - - - -	++ + 50 -	- - - - -	- - - - -
Jm5	- - - - -	++ - - -	++ - - -	++ - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm6	- - - - -	++ + - -	- - - - -	++ + - -	- - - - -	- - - - -
Jm7	++ - - -	++ - - -	+ - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -
Jm8	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm9	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm10	- - - - -	+ - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm11	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm12	- - - - -	++ + - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -
Jm13	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm14	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm15	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm16	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm17	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm18	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm19	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	E.C-9	E.C-12	E.C-13	E.C-14	E.C-15	E.C-16
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm21	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm22	- - - - -	++ - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -
Jm23	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm24	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm25	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm26	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm27	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm28	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm29	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm30	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm31	- - - - -	++ + + -	- - - - -	++ ++ 2	- - - - -	- - - - -
Jm32	- - - - -	++ + + -	- - - - -	++ ++ 1	++ ++ 3	- - - - -
Jm33	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm34	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm35	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm36	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm37	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm38	- - - - -	++ - - -	- - - - -	++ 40 - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	E.C-17	E.C-18	E.C-19	E.C-20	E.C-21	E.C-23
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm1	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ + -
Jm2	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm3	- - - -	- - - -	- - - -	++ + 16 -	- - - -	- - - -
Jm4	++ - -	+ - - -	- - - -	+ - - -	- - - -	+ - - -
Jm5	- - - -	++ - -	- - - -	++ - -	++ + -	- - - -
Jm6	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm7	+ - - -	+ - - -	- - - -	+ - - -	+ - - -	++ + 50 -
Jm8	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -
Jm9	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ 9 - -	- - - -
Jm10	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	+ - - -
Jm11	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm12	+ - - -	++ - -	- - - -	+ - - -	- - - -	++ - -
Jm13	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm14	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm15	++ + -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm16	++ + -	- - - -	+ - - -	- - - -	+ - - -	- - - -
Jm17	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ + 30 -
Jm18	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	+ - - -	++ + -
Jm19	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -

<i>E.coli</i>	E.C-17	E.C-18	E.C-19	E.C-20	E.C-21	E.C-23
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm21	+ - - -	+ - - -	- - - -	+ - - -	- - - -	++ 20 - -
Jm22	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm23	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm24	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm25	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm26	- - - -	- - - -	+ - - -	- - - -	- - - -	+ - - -
Jm27	++ - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm28	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ 40 - -
Jm29	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	++ 40 - -
Jm30	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm31	- - - -	++ + -	++ - -	- - - -	- - - -	++ - -
Jm32	- - - -	++ + -	++ - -	- - - -	- - - -	++ - -
Jm33	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm34	++ + -	+ - - -	+ - - -	++ + 3 -	++ + -	++ - -
Jm35	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm36	++ - -	+ - - -	+ - - -	++ 50 - -	++ + -	++ - -
Jm37	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -
Jm38	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -	- - - -

<i>E.coli</i>	E.C-24	M1B1	M3B3	M4B1	M5B1	M6B3
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm1	+ - - - -	+ - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm2	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm3	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm4	+ - - - -	+ - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	+ - - - -
Jm5	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -
Jm6	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm7	+ - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm8	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm9	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm10	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm11	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm12	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm13	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm14	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm15	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm16	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm17	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm18	+ - - - -	++ - - -	- - - - -	++ - - -	++ + - -	- - - - -
Jm19	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i>	E.C-24	M1B1	M3B3	M4B1	M5B1	M6B3
Fagos	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8	0-2-4-6-8
Jm20	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm21	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm22	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm23	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm24	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm25	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm26	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm27	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm28	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm29	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm30	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm31	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm32	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm33	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm34	- - - - -	- - - - -	+ - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm35	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm36	- - - - -	- - - - -	++ - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm37	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Jm38	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

<i>E.coli</i> Fagos	M7B2 0-2-4-6-8
Jm1	- - - - -
Jm2	- - - - -
Jm3	- - - - -
Jm4	- - - - -
Jm5	- - - - -
Jm6	- - - - -
Jm7	- - - - -
Jm8	- - - - -
Jm9	- - - - -
Jm10	- - - - -
Jm11	- - - - -
Jm12	- - - - -
Jm13	- - - - -
Jm14	- - - - -
Jm15	- - - - -
Jm16	- - - - -
Jm17	- - - - -
Jm18	+ - - - -
Jm19	- - - - -

<i>E.coli</i> Fagos	M7B2 0-2-4-6-8
Jm20	- - - - -
Jm21	- - - - -
Jm22	- - - - -
Jm23	- - - - -
Jm24	- - - - -
Jm25	- - - - -
Jm26	- - - - -
Jm27	- - - - -
Jm28	- - - - -
Jm29	+ - - - -
Jm30	+ - - - -
Jm31	- - - - -
Jm32	- - - - -
Jm33	- - - - -
Jm34	- - - - -
Jm35	- - - - -
Jm36	- - - - -
Jm37	- - - - -
Jm38	- - - - -

En la tabla se indican las diluciones de los fagos (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}), y la ausencia (-), presencia (+) o número de placas en cada una de ellas. Este ensayo fue realizado una vez.

A partir de la susceptibilidad de las bacterias a la infección por fagos estas se pudieron clasificar en diferentes grupos: muy susceptibles, medianamente susceptibles y resistentes. De esta manera se realizó una tabla que resume los resultados anteriores indicando los diferentes grupos de bacterias. Ver tabla 5b. Se puede observar bacterias que fueron resistentes a todos los 38 fagos (V.S-54, V.S-77, E.C-6, E.C-16, M7B2 y M6B3), las cuales representan un 13% de todas las bacterias analizadas. También muestra aquellas que fueron más sensibles a la mayoría de los fagos, mostrando un comportamiento parecido al de la bacteria control W3110 (O-8, O-23, E.C-12, E.C-23), las cuales representan un 8%.

Tabla 5b. Tabla del ensayo de susceptibilidad resumida

<i>E. coli</i> Fagos	O2	O3	O8	O11	O13	O23	O30	VS-54	VS-67	VS-74	VS-76	VS-77	EC-5	EC-8	EC-12	EC-14	EC-6	EC-16	EC-18	EC-19	EC-20	EC-23	M1B1	M7B2	M6B3	
Jm-1	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
Jm-2	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-3	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Jm-4	±	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-5	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±	-	±	-	-	-	-	-
Jm-6	-	-	+	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-7	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	±	-	±	±	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Jm-8	-	+	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-9	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-10	-	-	±	-	-	+	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-12	+	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-
Jm-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-15	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-16	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-17	-	-	+	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Jm-18	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
Jm-19	-	-	±	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-20	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-21	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
Jm-22	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-23	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-24	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-25	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-26	-	-	±	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-27	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
Jm-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
Jm-30	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-31	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	±	-	±	-	-	-	-
Jm-32	-	-	±	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	±	±	-	±	-	-	-	-
Jm-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-34	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-
Jm-35	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-36	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-
Jm-37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-38	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Susceptible; ± Medianamente susceptible; -: Resistente

En la tabla 6 se observa que las cepas aisladas de aguas residuales pertenecientes a la serie E.C y las de aislados regionales pertenecientes al serotipo O, fueron de las bacterias mas sensibles, permitiendo el crecimiento de mas de 4 fagos; mientras que las cepas provenientes de heces fecales de animales y las de aguas negras (MB), fueron las mas resistentes.

Tabla 6. Susceptibilidad de las bacterias a la infección fágica

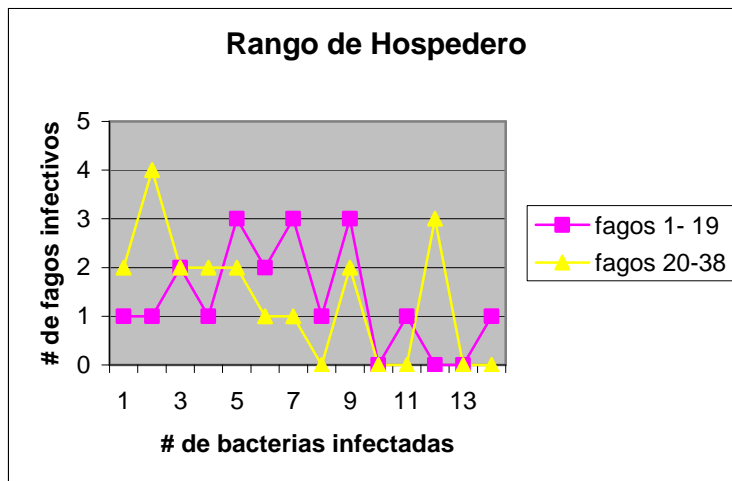
ORIGEN CEPAS SENSIBLES	TOTAL CEPAS	(S) 1 a 3 Fagos (%)	(S) 4 a 8 Fagos (%)	(S) > 9 Fagos (%)	Resistentes (%)
Aguas negras (MB)	6	4 (67)	0 (0)	0 (0)	2 (33)
Aguas negras (E.C)	17	7 (41)	6 (35)	2 (12)	2 (12)
Heces de animales (V.S)	8	2 (25)	4 (50)	0 (0)	2 (25)
Regional	17	11 (65)	4 (24)	1 (6)	0 (0)
Laboratorio W3110	1	–	–	1 (100)	0 (0)

(S) = Susceptibilidad

En la gráfica 1, se observa que tanto los fagos aislados a partir de las bacterias de la serie V.S y serotipo O, como los fagos aislados a partir de la *E. coli* W3110, presentan un rango de hospedero muy similar.

Los resultados indican que la mayoría de las bacterias resultan ser resistentes a la mayoría de los fagos, y solo unas pocas permiten el crecimiento de unos pocos fagos.

Grafica 1. Infectividad de los fagos en relación al rango de hospedero



(Fagos del 1-19, aislados a partir de bacterias serotipo O y fagos del 20-38, aislados a partir de W3110).

Los colifagos somáticos son detectados eficientemente en ecosistemas como aguas residuales. Sin embargo, su actividad con respecto a la infección de sus hospederos se ha reportado que es poco significativa, debido entre otras cosas a condiciones ambientales, y más aún, a que un gran número de sus hospederos específicos han evolucionado adquiriendo un gran número de mecanismos de resistencia. Esto ha permitido que la coevolución de bacterias y fagos sea totalmente asimétrica (Lensky and Levin, 1985). Los resultados indicaron que la replicación de los colifagos en un ambiente de aguas residuales es poco significativa. Esto concuerda con resultados de algunos trabajos como el realizado por (Muniesa et al. 2002), en donde se realizó también un ensayo de susceptibilidad de 291 cepas hospederas a la infección por 25 fagos, y observaron un porcentaje de sensibilidad de solo un 3.02%, concluyendo que la replicación de fagos somáticos en un medio acuático es despreciable.

El hecho de que la mayoría de las bacterias evaluadas no hayan resultado ser portadoras de fagos o de colicinas, indica que las bacterias resistentes, deberán de poseer otro tipo de mecanismo, no relacionado a profagos, que les permita la resistencia a la infección por fagos al menos en las aguas negras donde fueron

recolectadas; es decir, que la inmunidad generada por las bacterias lisógenas probablemente no es mayoritariamente la resistencia bacteriana que se pueda presentar en los ecosistemas.

La proporción de bacterias *E. coli* que fueron sensibles a más de 9 fagos, podrían ser un ejemplo de que en el medio se presenten bacterias con alguna similitud con la cepa W3110, ya que aunque fueron muy pocas, le permitieron el crecimiento a muchos fagos, y en contraposición con otras que fueron totalmente resistentes a todos los fagos ensayados.

En un ecosistema bacteriano pueden coexistir tanto bacterias susceptibles a la infección como aquellas que no lo son (resistentes). Sin embargo, aún es motivo de especulación de que antes de la infección predominen las bacterias susceptibles, y que posteriormente las bacterias resistentes se vuelven predominantes (Hantula et al. 1991). Esto podría explicar el porqué a partir de la misma fuente de aguas negras podemos encontrar ambas poblaciones, y de acuerdo a nuestros resultados vemos que las bacterias resistentes llegan a ser dominantes.

7. CONCLUSIONES

- En las muestras de aguas residuales, el número de cepas de *E. coli*, capaces de soportar el desarrollo de los colifagos es bajo. Por consiguiente la actividad de los colifagos en la muestras de aguas residuales es poco significativa.
- La resistencia que presentan las bacterias a la infección sugiere que deberan de existir un gran número de mecanismos de exclusión.
- Además de los fagos, existen otras formas aunque minoritariamente contribuya al equilibrio entre las poblaciones bacterianas en las aguas negras, como la producción de algunos metabolitos tóxicos (bacteriocinas), etc.
- En los ecosistemas acuosos es donde se encuentran mayoritariamente las interacciones bacterias-fagos, y la tendencia es presentar en una gran proporción bacterias multi-resistentes
- Con estos resultados, se podría explicar, en cierta parte, el porque en una planta de tratamiento de aguas negras, siempre se presentan los lodos, con un alto contenido de bacterias.

8. PERSPECTIVAS:

Se sugiere, evaluar el rango de hospedero de los fagos aislados de aguas residuales, utilizando otro tipo de Enterobacterias no emparentadas con *E. coli*, a fin de ver si los posibles mecanismos de exclusión analizados en cepas de *E. coli* son específicos de esta bacteria o también se presentan en otras cepas (rango de hospedero).

9. BIBLIOGRAFIA

Ackermann, Hans.W., Nguyen, T.M. 1983. Sewage Coliphages Studied by Electron Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*.45 : 1049-1059.

Anderson, E. S. 1957. The relations of bacteriophages to bacterial ecology. In R. E. D. Williams and C. C. Spicer (ed.), *Microbial Ecology: 7th symposium of the society for general microbiology*. University Press, Cambridge.

Araujo, R. M., Puig, A., Lasobras, J., Lucena, F and Jofre, J. 1996. Phages of Enteric Bacteria in Fresh Water with Different Levels of Faecal Pollution. *Journal of Applied Microbiology*. 82: 281-286.

Atlas, R. M., Bartha, R. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid, 4^a Ed. Addison Wesley. Madrid. Pp: 696

Breed, R. S., Murray, E. G. D., and Smith, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., Baltimore: The Williams & Wilkins Company, Pp: 336

Calendar, R. 1988. *The Bacteriophages*. Ed. PIENUM, California, Volume 1. Pp:583.

Donald, L. E and Paynter, M. J. B. 1980. Enumeration of Bacteriophages and Host Bacteria in Sewage and the Activated-Sludge Treatment Process. *Applied And Environmental Microbiology*. 39: 576-583.

Duran, A.E., Muniesa, M., Mendez, X., Valero, F., Lucena, F and Cofre, J. 2001. Removal and Inactivation of Indicator Bacteriophages in Fresh Waters. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 338-347.

Hantula, J., Kurki, A., Vuoriranta, P and Bamford, D. H. 1991. Ecology of Bacteriophages Infecting Activated Sludge Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*. 57: 2147-2151.

Hattmant, S and Fukasawa, T. 1963. Host-Induced Modification of T-even Phages Due to Defective Glucosylation of their DNA. *Microbiology*. 50: 297-299.

Herschman, H. R and Helinski, D. R. 1967. Comparative Study of the Events Associated with Colicin Induction. *Journal of Bacteriology*. 94: 691-699.

Jacob, F., and C. R. Fuerst. 1958. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 18:518-526.

Jenkins John. *Genética de los virus*. 1986. Ed. Reverté S.A, Barcelona, 2da. Edición. Pp: 743.

Kasman, L. M, 2005. Barriers to Coliphage Infection of Comensal Intestinal Flora of Laboratory Mice. *Virology Journal*. 2: 34.

Llivina, L. M., Muniesa, M., Vale, H. P., Lucena, F and Jofre, J. 2002. Survival of Indicator Species and Bacteriophages alter Termal Treatment of Sludge and Sewage. *Applied And Environmental Microbiology*. 69: 1452-1456.

Lenski, R. E and Levin, B. R. 1965. Constraints on the Coevolution of Bacteria and Virulent Phage, a Model, Some Experiments, and Predictions for Natural Communities. *American Naturalist*. 125: 585-602.

Mac Faddin. 1993. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 1ª edición. Editorial Panamericana. México. Pp: 301.

Muniesa, M., Lliviana, L. M., Katayama, H and Jofre, J. 2002. Bacterial Host Strains that Support Replication of Somatic Coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83: 305-315.

New England Biolabs. 2005-06. Catalog & Technical Reference. Restriction of Foreign by *E. coli* K-12. USA.

Reeves, P. 1972. *Molecular Biology Biochemistry and Biophysics “ The Bacteriocins”*. Springer-Verlag. New York.

Shedlovsky, A and Brenner, S. 1963. A Chemical Basis for the Host-Induce Modification of T-even Bacteriophages. *Microbiology*. 50: 300.

Sambrook , J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.

Uc-Mass, A., Loeza. J.E., Garza, M., Guarneros, G., Sánchez, H.J., Kameyama, L. 2004. An orthologue of the *cor* gene is involved in the exclusion of temperate lambdoid phages. Evidence that Cor inactivates FhuA receptor functions. *Virology* 329: 425-433.

10. ANEXO

MEDIOS UTILIZADOS EN LAS BIOQUÍMICAS PARA AISLAMIENTO DE LA *E. coli* Y MEDIOS PARA CULTIVOS BACTERIANOS, DETECCIÓN Y DILUCIÓN DE BACTERIÓFAGOS

- Medios para bioquímicas

Agar Hierro de Kligler pH: 7,4

Polipetona	20 g/l
Lactosa	10 g/l
Dextrosa (glucosa)	1 g/l
Cloruro de sodio (ClNa)	5 g/l
Citrato férrico ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	0.5 g/l
Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.5 g/l
Rojo de Fenol	0.025 g/l
Agar	15 g/l
Agua destilada	A 1 lt

Medio Citrato de Simmons pH: 6.9

Sulfato de magnesio (MgSO_4)	0.2 g/l
Monofosfato de amonio o fosfato de amonio dihi-drogenado (NH_4) H_2PO_4	1 g/l
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1 g/l
Citrato de sodio	(2.77 g de citrato de sodio, 5 I/2 de H_2O)
Cloruro de sodio	5 g/l
Agar	15 a 20 g/l
Azul de Bromotimol	0.08 g/l
Agua destilada	A 1 lt

Agar Urea de Christensen pH: 6.8

Peptona	1 g/l
Cloruro de sodio	5 g/l
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	2 g/L
Dextrosa (glucosa) 0.1%	1 g/l
Urea 20%	20 g/l
Rojo de Fenol	0.012 g/l
Agar	15 a 20 g/l
Agua destilada	1l

Base de descarboxilasa de Møller pH: 6.0

Peptona (pepsina)	5 g/l
Extracto de carne	5 g/l
Púrpura de Bromocresol	0.1 g/l
Rojo de cresol	0.005 g/l
Piridoxal	5 g/l
Dextrosa (glucosa)	0.5 g/l
Agua destilada	A 1lt

Caldo Malonato pH: 6.7

Extracto de levadura	1 g/l
Sulfato de amonio	2 g/l
Fosfato de potasio	0.6 g/l
Fosfato monopotásico	0.4 g/l
Cloruro de sodio	2 g/l
Malonato de sodio	3 g/l
Dextrosa (glucosa)	0.25 g/l
Azul de Bromotimol	0.025 g/l
Agua destilada	A 1 lt

Caldo básico Rojo de Fenol pH: 7.4

Peptona	10 g/l
Extracto de carne	1 g/l
Cloruro de sodio	5 g/l
Rojo de fenol	0.018 g/l
Agua destilada	A 1 lt

Caldo RM / VP pH: 6.9

Polipeptona o peptona amortiguada	7 g/l
Dextrosa (glucosa)	5 g/l
Fosfato de potasio	5 g/l
Agua destilada	A 1 lt

Para esta prueba es necesario agregar el indicador de pH rojo de metilo al caldo después de la incubación

Reactivo de Kovacs para reacción de Indol:

Acohol amilico o isoamilico	150 ml
p-dimetilamino-benzaldehido	10 g
HCl concentrado	50 ml

Se debe agregar 5 gotas al tubo previamente incubado

- Medios para cultivos bacterianos

Medio Mc Conkey – Lactosa

Bacto- peptona	17 g/l
Mezcla de peptonas	3 g/l
Sales biliares	1.5 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
Rojo neutro	0.03 g/l
Cristal violeta	0.001 g/l
Bacto- agar	13.5 g/l

- Para elaborar 10 placas, un total de 250 ml
- Es un medio selectivo y diferencial. Es selectivo porque tiene mucha concentración de sales biliares que solo permiten que crezcan la Enterobacterias (bacterias acostumbradas a vivir en el intestino). Es diferencial porque aquellas Enterobacterias que fermenten la lactosa formarán colonias de color rosa. Las que no fermentan la lactosa serán colonias incoloras.

Medio Luria-Bertani (LB)	1l
Bacto triptona	10g
Bacto levadura	5g
Bacto agar	15g
Cloruro de sodio (NaCL)	5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	10ml

Medio LB liquido	0.5 l
Bacto triptona	5g
Bacto levadura	2.5g
Cloruro de sodio (NaCL)	2.5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	5ml

Medio TB (Triptona “broth” medio)	Para cajas petri 1l
Bacto triptona	10g
Bacto agar	11g
Cloruro de sodio (NaCL)	5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	10ml

Medio TB	0.5 l
Bacto triptona	5g
Bacto agar	3.5g
Cloruro de sodio (NaCL)	2.5g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	5 ml

- Buffer TMG (para la dilución de fagos)

Medio TMG (Tris-magnesio-gelatina)	
Cloruro de sodio (NaCL)	11.7g
Gelatina	1.0g
Tris HCL 1M	1ml
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	0.5 ml
Agua destilada	1 lt

SUSCEPTIBILIDAD DE LOS HOSPEDEROS BACTERIANOS A LA INFECCIÓN POR COLIFAGOS, PROVENIENTES DE AGUAS RESIDUALES

Diaz-Másmela Julieth M ¹, julieth.diaz@javeriana.edu.co & Kameyama-kawabe Luis K ², Luisk@cinvestav.mx

Pontificia Universidad Javeriana; Bogota. Carrera 7 No. 40 – 62 ¹, y Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV; Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, México D. F., MEXICO ².

RESUMEN

En el ambiente de las aguas residuales, muy pocos organismos están libres del ataque de parásitos microbianos. La mayoría son parásitos intracelulares obligados como los bacteriófagos, que pueden causar lisis bacteriana o pueden estar en una forma más estable, como profagos. Sin embargo, las bacterias también han adquirido varios mecanismos de resistencia a condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo la infección por fagos. En este estudio se quiso indagar la susceptibilidad de 48 hospederos bacterianos de la cepa *Escherichia coli* (*E. coli*), a la infección por 38 colifagos provenientes de aguas negras. La cepa de *E. coli* K-12 W3110 fue utilizada como control positivo a la infección de todos los colifagos. El 13% de todas las bacterias analizadas fueron resistentes a los 38 fagos, mientras que aquellas bacterias que fueron susceptibles a la mayoría de los colifagos, mostrando un comportamiento similar al de la bacteria control W3110, representan solo un 8%. Un 79% corresponde a las bacterias que fueron susceptibles o moderadamente susceptibles a la infección de 1 a 9 fagos. Estos resultados sugieren que el número de cepas de *E. coli* capaces de soportar el desarrollo de los colifagos es bajo y las bacterias resistentes son dominantes.

Palabras clave: Aguas residuales, bacterias susceptibles, bacteriófagos, colifagos, *Escherichia coli*

ABSTRACT

In the environment of residual waters, very few organisms are free against attack by microbial parasites. The majority of parasitic intracellular such as bacteriophages,

cause either bacterial lysis or they can be in a stable form as prophage. Nevertheless, bacteria have also acquired several resistance mechanisms to adverse environment conditions, including the infection by phages. In this study, we wanted to investigate the susceptibility of phage infection of 48 host cells *Escherichia coli* (*E. coli*) by 38 coliphages to come from residual waters. *E. coli* strain K-12 (W3110) was used as positive control to the infection of all coliphages. The results showed that 13% of bacteria were resistant to all phages (38), whereas 79% were susceptible or moderately susceptible to the infection of 1 to 9 phages and only 8% were susceptible to most of coliphages, showing a similar behavior to the control strain (W3110). These results suggest that the number of *E. coli* strains capable to allow the development of lytic coliphages is low.

Key words: Bacteriophages, coliphages, Residual waters, *Escherichia coli* and bacterial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos se conocen como virus capaces de infectar y reproducirse en células procariontes o bacterias que se encuentran metabólicamente activas (Jenkins, 1986). Su denominación se relaciona directamente con el huésped específico bacteriano al que infectan. Así, en el caso de los colifagos, se habla de fagos capaces de infectar a las cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Los colifagos somáticos, han sido propuestos como indicadores potenciales de la calidad del agua y cubren un extenso intervalo de fagos que se caracterizan porque son capaces de infectar al huésped a través de la superficie celular (Muniesa et al., 2002). Estos conforman el grupo de fagos que infectan bacterias entéricas y se encuentran abundantemente en las aguas residuales, a donde finalmente llegan después de haber pasado a través del tracto gastrointestinal de animales (Kasman, 2005). Sin embargo, su efecto en las poblaciones bacterianas no es bien conocido y mucho menos en sistemas dinámicos como son los lodos activados y las plantas de tratamiento de aguas residuales. Al respecto, la mayoría de las aportaciones realizadas son teóricas o bien estudios a nivel de laboratorio, donde se utilizan cepas bien

caracterizadas, así como sus respectivos fagos y no cepas y fagos aislados directamente de su ambiente natural.

Las interacciones de parasitismo que existen entre los fagos y las bacterias pueden llegar a ser muy eficientes en las plantas de tratamiento de aguas, ya que abundan diferentes especies de bacterias patógenas y no patógenas. Estas bacterias son transmitidas vía oro-fecal, principalmente por los sedimentos y el efluente que sale de las plantas tratadoras y que al ser utilizados para el tratamiento de cultivos, se convierten en una fuente de contaminación que sin duda afectan a la salud humana. Por ello, el conocer que tan efectiva podría resultar la actividad de los fagos en estos ambientes, sería de gran importancia, ya que los fagos pueden ayudar a eliminar bacterias patógenas principalmente de las cepa *E. coli*, antes de que estas sean diseminadas a los sedimentos, ríos y otras aguas naturales.

En este estudio, se examinó la susceptibilidad de 48 cepas de bacterias *E. coli*, obtenidas de aguas residuales de diferentes lugares de la República Mexicana, a la infección de 38 colifagos aislados también de aguas residuales y se determinó la susceptibilidad de estas bacterias a la infección fágica.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE BACTERIAS DE *E. COLI* SILVESTRE

Algunas bacterias fueron aisladas a partir de muestras de aguas negras, tanto de diferentes canales y riachuelos de la ciudad de México como de otras ciudades de diferentes estados de la República. Otras bacterias fueron tomadas directamente del cepario del laboratorio de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV.

A partir de 1 ml de las muestras de aguas negras, las bacterias se empastillaron por centrifugación a 9000g durante 10 min, lo que permitió sembrar una alícuota de éstas bacterias en medio McConkey más lactosa para obtener colonias aisladas. Las bacterias obtenidas del cepario, fueron estriadas también en medio Mc-Conkey-lactosa.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Cada una de las cepas seleccionadas en medio Mc Conkey-lactosa (Tabla 1), fueron identificadas mediante diferentes pruebas bioquímicas para confirmar su identidad

(especie de *E. coli*). Las bioquímicas se realizaron en el laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaria de Salud, las cuales se enlistan a continuación: Fermentación de glucosa y lactosa, Producción de ácido sulfhídrico (H₂S), Producción de gas, Producción de indol y movilidad, Citrato de Simmons, Hidrólisis de la urea, Descarboxilación de aminoácidos (lisina, arginina y ornitina), Utilización del malonato, Fermentación de inositol y sorbitol, Rojo de metilo y Voges Proskauer.

Tabla 1. Cepas fermentadoras de lactosa en medio Mc Conkey

Origen	Código	Fuente	NB
Cepas ambientales aisladas de diferentes regiones de México	M1B1	Aguas negras	1
	M1B3	“	1
	M3B1	“	1
	M3B3	“	1
	M4B1	“	1
	M5B1	“	1
	M6B3	“	1
	M7B2	“	1
Cepas ambientales proporcionadas por el cepario de genética del CINVESTAV	E.C.	Aguas negras	23
Cepas ambientales proporcionadas por la Dra. Valeria Sousa (actualmente almacenadas en el cepario de genética del CINVESTAV)	V.S.	Heces fecales de animales	19

Cepas serotipo O, proporcionadas por el Dr. Cravioto (preservadas ahora en el cepario de genética del CINVESTAV)	O	Regional	20
--	---	----------	----

M = Muestra de agua residual, B = Bacterias aisladas; E.C. = *E. coli* NB= Número de Bacterias

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS *E. COLI* NO LISÓGENAS

La ausencia de profagos en las bacterias analizadas (bacterias no lisógenas) fue realizada utilizando los cultivos “stocks” de cada una de las bacterias. Esta determinación se realizó debido a que los profagos le confieren inmunidad a las bacterias que los hospedan (bacterias lisógenas) de manera que fue necesario descartarlos para poder evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a la infección por los fagos provenientes de aguas negras. A partir de los “stocks”, se tomó una alícuota, la cual fue sembrada en medio Luria-Bertoni (LB) sólido para obtener colonias aisladas. Una vez obtenidas las colonias se realizó un cultivo líquido de toda la noche en 5 ml de LB. De las *E. coli* crecidas durante toda la noche, se tomó 1ml de cultivo, se centrifugó a 9000 x g durante 10 min y se transfirió el sobrenadante en un tubo limpio. Posteriormente, los fagos presentes en el sobrenadante se purificaron con cloroformo. Después de obtener los fagos, se realizaron diferentes diluciones (1/100), las cuales fueron goteadas en los tapices bacterianos de las cepas control W3110 proveniente de la *E. coli* K12 y LE392 e incubados a 37°C por 24 hrs., para observar la presencia de placas.

OBTENCIÓN DE FAGOS DE SU FUENTE NATURAL

A partir de las muestras de aguas negras, se centrifugó 1 ml a 9000 x g durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y los fagos fueron purificados con cloroformo. Por otro lado, se realizó un tapiz celular, con medio TB (medio Triptona “broth”) sólido. Este tapiz también fue realizado utilizando la bacteria control W3110. Las cajas con los tapices fueron incubadas a 37°C por 24 hrs. A partir de las placas observadas, de cada tapiz bacteriano se tomaron al menos 3 diferentes tipos de placas y así obtener diferentes tipos de fagos, los cuales se propagaron cada una por separado en cajas petri bajo las mismas condiciones (tapiz celular y medio TB sólido). Las cajas se incubaron a 37°C por 24 hrs.

EXPANSIÓN Y CONSERVACIÓN DE FAGOS

La expansión y conservación de los fagos se realizó llevando a cabo el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989).

ENSAYO DE SUSCEPTIBILIDAD

En este ensayo se realizaron diferentes tapices de las cepas de *E. coli*, en medio TB sólido y una vez solidificado el medio, se gotearon sobre los tapices, las distintas diluciones con fagos (desde 1×10^0 hasta 1×10^{-8}), luego se incubó a 37°C por 24 hrs y posteriormente se determinó la presencia o ausencia de placas líticas.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS *E. coli*

Se obtuvieron en total 70 presuntivas cepas de *E. coli* capaces de fermentar la lactosa. Sin embargo, el aislamiento de las bacterias utilizando un medio diferencial y selectivo como el de Mc Conkey-lactosa, no es indicativo para asegurar la identidad de *E.coli*. Debido a esto, se realizó una serie de pruebas bioquímicas adicionales (realizadas solo a 58 bacterias, ya que fueron necesarias al menos unas 45 bacterias, pertenecientes a la especie *E. coli*, para realizar el ensayo de susceptibilidad. Las pruebas bioquímicas sugeridas para la identificación de *E. coli* fueron: a)Indol, b) Citrato, c)Sorbitol, d) Rojo de Metilo y e)Voges Proskauer. Es de notar que, *E. coli* es productora de indol, no utiliza el citrato como única fuente de carbono, fermenta el sorbitol y es Rojo de Metilo positivo y Voges Proskauer negativo (Mac. 1993). No obstante, en este estudio se incluyeron las pruebas de hidrólisis de la urea, descarboxilación de algunos aminoácidos, utilización del malonato y fermentación del inositol, con lo que fue posible caracterizar apropiadamente las bacterias estudiadas. Los resultados de esta caracterización se indican en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de *E. coli*

Bioquímicas	E. coli K12 W3110	Obtenido (%)	Reportado %
Fermentación de Glucosa	+	48 (100)	100
Fermentación de Lactosa	+	47 (98)	95
Producción de Indol	+	45 (94)	98
Movilidad	-	31 (65)	50
Producción de H ₂ S	-	0 (0)	1
Citrato de Simmons	-	0 (0)	1
Hidrólisis de Urea	-	0 (0)	1
Lisina Descarboxilasa	+	38 (79)	90
Ornitina Descarboxilasa	-	27 (56)	65
Arginina dihidrolasa	-	0 (0)	17
Utilización de Malonato	-	0 (0)	0
Fermentación de Inositol	-	0 (0)	1
Fermentación de Sorbitol	+	48 (100)	94
Rojo de Metilo	+	48 (100)	99
Voges-Proskauer	-	0 (0)	0
Producción de Gas	+	21 (44)	--

Los resultados mostrados en la tabla 2, confirman que casi la totalidad de las bacterias analizadas fueron *E. coli*, indicando que de las 58 cepas evaluadas, 48 (83%), pertenecieron a la especie *E. coli* y algunas otras pertenecieron a especies como *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*. Estos datos coinciden con lo previamente reportado por (Breed, 1957). Como era de esperarse, *E. coli* es muy abundante en ambientes como el de las aguas residuales y heces fecales, lo cual sugiere que probablemente los fagos también sean parte activa de estos ecosistemas.

BACTERIAS DE *E. coli* NO LISÓGENAS

Los sobrenadantes de los cultivos de cada una de las cepas aisladas, fueron analizados para observar la presencia de fagos, los cuales podrían generar placas en los tapices de las bacterias W3110 y LE392. Estas bacterias se caracterizan por ser altamente sensibles a la infección de la mayoría de los fagos y se dice que son las cepas más cercanas a la bacteria receptora universal de fagos. Al respecto, los resultados de la tabla 3, muestran que muy pocas bacterias son portadoras de fagos.

Tabla 3. Cepas *E. coli* portadoras de fagos y cepas portadoras de colicinas

Cepas <i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i> con colicinas y <i>E. coli</i> lisogenas (goteo de sobrenadante en LE392 Y W3110)					Tipo de bacteria
	0	1x10 ⁻²	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁶	1x1 ⁸	Colicinógena
O-7	+	-	-	-	-	“
O-29	+	-	-	-	-	“
V.S-60	+	-	-	-	-	“
V.S-61	+	-	-	-	-	“
V.S-80	+	3	-	-	-	Lisógena
V.S-81	+	8	-	-	-	“
*V.S-83	+	40	-	-	-	“
V.S-94	+	-	-	-	-	Colicinógena
V.S-96	+	-	-	-	-	“
E.C-1	+	-	-	-	-	“
M3-B3(2)	+	-	-	-	-	“

***VS.-83** = Las placas generadas por el profago de esta bacteria, solo se evidenciaron en el tapiz de W3110.

• Las cepas portadoras de fagos forman placas aisladas a mayor dilución a diferencia de las portadoras de colicinas.

Otro grupo de bacterias, no tan significativo, mostraron ser portadoras de colicinas.

Las colicinas son proteínas antibióticas producidas por ciertas cepas de *Enterobacteriaceae*; y la capacidad para sintetizar estas proteínas depende de la presencia de un factor colicinogénico (factor Col) que tiene características de

exclusión de fagos (Herschman et al, 1967). Por ello, al igual que algunos profagos, las colicinas también son capaces de impedir la infección de las bacterias colicinógenas por fagos. De las 81 bacterias aisladas, la gran mayoría (86%), resultaron ser bacterias libres de fagos y de la presencia de bacteriocinas (colicinas). Sin embargo, como se muestra en la tabla 3, el 14% fueron bacterias lisógenas o con presencia de colicinas, de los cuales, la mayoría (8) de estas 11 bacterias portaron colicinas.

FAGOS AISLADOS

A partir de diferentes bacterias no lisógenas, incluyendo la bacteria control W3110, se lograron aislar 38 fagos diferentes (Véase Tabla 4). Se utilizaron 9 bacterias, 4 de la serie del serotipo O y 5 de la serie V.S. para aislar los fagos del Jm-1 al Jm-19. El resto de los fagos fueron aislados a partir de la bacteria W3110. Interesantemente, todos los fagos que se lograron obtener a partir de las 9 bacterias también fueron capaces de crecer en W3110. La cepa W3110 fue la bacteria utilizada como control positivo, así como también para el aislamiento de algunos fagos.

Tabla 4. Fagos aislados y las bacterias utilizadas

Bacteriófago	<i>E. coli</i> usada como señuelo	Origen de la bacteria	Agua negra	Crecimiento en W3110
Jm1	Serotipo O-5	Regional	#8	+
Jm2	“	“	“	+
Jm3	“	“	“	+
Jm4	“	“	“	+
Jm5	Serotipo O-8	“	#9	+
Jm6	“	“	“	+
Jm7	“	“	“	+
Jm8	Serotipo O-3	“	#10	+
Jm9	“	“	“	+

Jm14	Serotipo O-19	“	#13	+
Jm10	Serie V.S-67	Fecal (animal)	#11	+
Jm11	Serie V.S-62	“	#12	+
Jm12	“	“	“	+
Jm13	“	“	“	+
Jm15	Serie V.S-71	“	#14	+
Jm16	Serie V.S-72	“	#15	+
Jm17	“	“	“	+
*Jm18	*Serie V.S-83	“	#16	+
*Jm19	“	“	“	+
Jm20	W3110	Laboratorio	#1	+
Jm21	“	“	“	+
Jm22	“	“	“	+
Jm23	“	“	“	+
Jm24	“	“	#2	+
Jm25	“	“	“	+
Jm26	“	“	“	+
Jm27	“	“	#3	+
Jm28	“	“	“	+
Jm29	“	“	“	+
Jm30	“	“	#4	+
Jm31	“	“	“	+
Jm32	“	“	“	+
Jm33	“	“	#5	+
Jm34	“	“	“	+
Jm35	“	“	#6	+
Jm36	“	“	“	+
Jm37	“	“	#7	+
Jm38	“	“	“	+

* Los fagos Jm18 y Jm19, fueron aislados a partir de la bacteria lisógena VS.-83.

Es posible alguna contaminación con el profago (el cual se encuentra integrado en el cromosoma de la bacteria y se replica junto con el de forma pasiva), en el subsecuente ensayo.

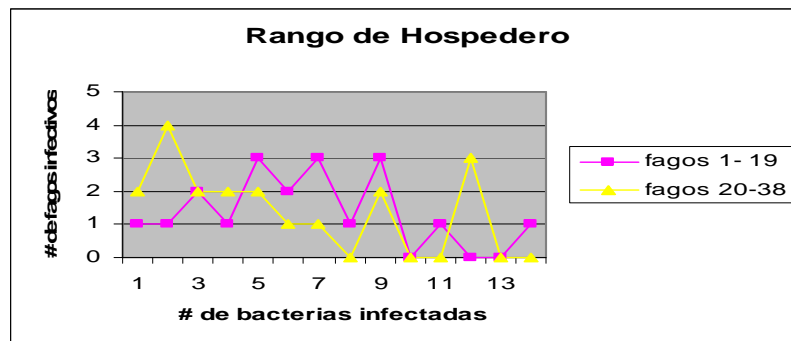
ANÁLISIS DE SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA A LA INFECCIÓN POR FAGOS

La susceptibilidad a la infección fágica se realizó al evaluar 48 cepas bacterianas y 38 fagos provenientes de diferentes muestras de aguas residuales, lo que permitió clasificarlas en diferentes grupos como: a) muy susceptibles, b) medianamente susceptibles y c) resistentes (Tabla 5). En esta tabla, se puede observar bacterias que

fueron resistentes a todos los 38 fagos (V.S-54, V.S-77, E.C-6, E.C-16, M7B2 y M6B3), las cuales representan un 13% de todas las bacterias analizadas. Aquellas que fueron más sensibles a la mayoría de los fagos, mostrando un comportamiento parecido al de la bacteria control W3110 (O-8, O-23, E.C-12, E.C-23) representan un 8%. Se observó que las cepas aisladas de aguas residuales pertenecientes a la serie *E.coli* y las de aislados regionales pertenecientes al serotipo O, fueron de las bacterias mas sensibles ya que permitieron el crecimiento de mas de 4 fagos; mientras que las cepas provenientes de heces fecales de animales y las de aguas negras (MB), fueron las mas resistentes.

Por otro lado en la gráfica 1, se resume que el mayor intervalo de hospedero corresponde a un fago que fue capaz de infectar 13 cepas bacterianas y que tanto los fagos aislados a partir de las bacterias de la serie V.S y serotipo O, como los fagos aislados a partir de la cepa control W3110, presentaron un intervalo de hospedero muy similar.

Grafica 1. Infectividad de los fagos en relación al rango de hospedero



Los resultados indican que la mayoría de las bacterias resultan ser resistentes a la mayoría de los fagos, y solo unas pocas permiten el crecimiento de unos pocos fagos.

Tabla 5b. Tabla del ensayo de susceptibilidad resumida

<i>E. coli</i> Fagos	O2	O3	O8	O11	O13	O23	O30	VS-54	VS-67	VS-74	VS-76	VS-77	EC-5	EC-8	EC-12	EC-14	EC-6	EC-16	EC-18	EC-19	EC-20	EC-23	M1B1	M7B2	M6B3
Jm-1	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
Jm-2	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-3	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Jm-4	±	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-5	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±	-	±	-	-	-	-
Jm-6	-	-	+	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-7	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	±	-	±	±	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Jm-8	-	+	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-9	-	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-10	-	-	±	-	-	+	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-12	+	-	±	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-
Jm-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-15	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-16	-	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-17	-	-	+	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Jm-18	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-
Jm-19	-	-	±	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-20	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-21	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
Jm-22	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-23	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-24	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-25	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-26	-	-	±	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-27	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-
Jm-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	±	-	-
Jm-30	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-31	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	±	±	-	±	-	±	-	-
Jm-32	-	-	±	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-	±	±	-	±	-	±	-	-
Jm-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-34	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-
Jm-35	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-36	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-
Jm-37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jm-38	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Susceptible; ± Medianamente susceptible; -: Resistente

DISCUSIÓN

Los colifagos somáticos son tan abundantes como las bacterias en ecosistemas, y están presentes en el rumen de bovinos, aguas naturales, suelo, heces, aguas residuales, etc. (Donald y Paynter, 1980). Sin embargo, su actividad con respecto a la infección de sus hospederos se ha reportado que es poco significativa, debido entre otras cosas a condiciones ambientales, y más aún, a que un gran número de sus hospederos específicos han evolucionado adquiriendo un gran número de mecanismos de resistencia, los cuales por ejemplo, podrían estar asociados a la pérdida o ganancia de material genético, por mencionar algunos. Esto ha permitido que la coevolución de bacterias y fagos sea totalmente asimétrica (Lensky and Levin, 1985). Los resultados indicaron que la replicación de los colifagos en un ambiente de aguas residuales es poco significativa. Esto concuerda con resultados de algunos trabajos como el realizado por Muniesa et al., en el 2002, en donde se realizó también un ensayo de susceptibilidad de 291 cepas hospederas a la infección por 25 fagos, y observaron un porcentaje de sensibilidad de solo un 3.02%, concluyendo que la replicación de fagos somáticos en un medio acuático es despreciable.

El hecho de que la mayoría de las bacterias evaluadas no hayan resultado ser portadoras de fagos o de colicinas, indica que su resistencia a la infección fágica se debe a otro tipo de mecanismo, no relacionado a profagos o a colicinas, que les permita la resistencia al menos en el ambiente donde fueron recolectadas (aguas residuales). Sin embargo, la proporción de bacterias *E. coli* que fueron sensibles a más de 9 fagos, podrían ser un ejemplo de que, en el medio se encuentran bacterias

con alguna similitud a la cepa W3110, ya que aunque fueron muy pocas, le permitieron el crecimiento a varios fagos, y en contraposición con otras que fueron totalmente resistentes a todos los fagos ensayados.

En un ecosistema bacteriano pueden coexistir tanto bacterias susceptibles a la infección como aquellas que no lo son (resistentes). Sin embargo, aún es motivo de especulación de que antes de la infección predominen las bacterias susceptibles, y que posteriormente las bacterias resistentes se vuelven predominantes (Hantula et al. 1991). Esto podría explicar el porqué a partir de la misma fuente de aguas negras podemos encontrar ambas poblaciones, y de acuerdo a nuestros resultados vemos que las bacterias resistentes llegan a ser dominantes.

Por otro lado, el solo pensar que una bacteria se convierte en el reservorio de millones de fagos, resulta fácil imaginar que al haber un mayor número de fagos (con respecto al número de bacterias), la susceptibilidad a la infección fágica sería predominante. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos, es posible que los diferentes mecanismos moleculares de exclusión fágica, que presentan algunas de las bacterias, sean los responsables directos de que los fagos puedan o no ejercer una infección bacteriana significativa, por lo cual el número de fagos o bacterias presente en el ecosistema no resulta ser una variable trascendental para que la infección ocurra o no.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los investigadores Rosa María Bermúdez-Cruz, Refugio Rodríguez-Vásquez, Guillermo Aquino-Jarquín y Arnulfo Bautista-Santos del Centro de investigación y estudios avanzados del IPN con sede en la ciudad de México y del

laboratorio de bacteriología del Instituto Nacional de la secretaria de salud en México, por su valiosa colaboración en la realización de esta investigación.

REFERENCIAS.

Breed, R. S., Murray, E. G. D., and Smith, N. R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., Baltimore: The Williams & Wilkins Company, Pp: 336

Donald, L. E and Paynter, M. J. B. (1980). Enumeration of Bacteriophages and Host Bacteria in Sewage and the Activated-Sludge Treatment Process. *Applied And Environmental Microbiology*. 39: 576-583.

Hantula, J., Kurki, A., Vuoriranta, P and Bamford, D. H. (1991). Ecology of Bacteriophages Infecting Activated Sludge Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*. 57: 2147-2151.

Herschman, H. R and Helinski, D. R. (1967). Comparative Study of the Events Associated with Colicin Induction. *Journal of Bacteriology*. 94: 691-699.

Jenkins John. *Genética de los virus*. (1986). Ed. Reverté S.A, Barcelona, 2da. Edición. Pp: 743.

Kasman, L. M, (2005). Barriers to Coliphage Infection of Comensal Intestinal Flora of Laboratory Mice. *Virology Journal*. 2: 34.

Lenski, R. E and Levin, B. R. (1965). Constraints on the Coevolution of Bacteria and Virulent Phage, a Model, Some Experiments, and Predictions for Natural Communities. *American Naturalist*. 125: 585-602.

Mac Faddin. (1993). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 1ª edición. Editorial Panamericana. México. Pp: 301.

Muniesa, M., Lliviana, L. M., Katayama, H and Jofre, J. (2002). Bacterial Host Strains that Support Replication of Somatic Coliphages. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83: 305-315.

Sambrook , J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory N.Y.