

NOTA CIENTÍFICA

Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*

Isolation and characterization of specific bacteriophage Va1 to *Vibrio alginolyticus*

Carla Fernández Espinel ^{1*}, Violeta Flores Dominick ¹, Marco Medina Morillo ¹

Instituto del Mar del Perú, Laboratorio de Patobiología Acuática, Centro de Investigaciones Acuáticas "Alexander Von Humboldt", Esquina Gamarra y General Valle S/N Chucuito, Callao, Lima. Perú

Email Carla Fernández: cafernandez@imarpe.gob.pe

Email Marco Medina: mmedina@imarpe.gob.pe

Email Violeta Flores: vflores@imarpe.gob.pe

Resumen

Vibrio alginolyticus está asociado a enfermedades en acuicultura. El uso indiscriminado de antibióticos ha conllevado a la búsqueda de alternativas en el tratamiento de enfermedades bacterianas, entre ellas la aplicación de bacteriófagos, los cuales infectan y destruyen selectivamente bacterias. En ese sentido, en este trabajo se aisló un bacteriófago altamente lítico a *V. alginolyticus* el cual fue denominado Va1, con el objetivo de evaluar los parámetros físicos químicos en los cuales es viable. Para esto, se evaluó al bacteriófago Va1 en diferentes condiciones de pH, temperatura, cloroformo. El fago Va1 presenta mayores títulos a 20 y 30 °C y pH de 5 a 8 disminuyendo su viabilidad a partir de 40 °C y en unidades de pH menores de 5. La exposición al cloroformo redujo la viabilidad del fago Va1 en un 25%. A partir de la curva de un paso se determinó que el periodo de latencia y el tamaño de la explosión fueron de 20 minutos y 192 UFP/centro infectivo respectivamente. Al microscopio electrónico de transmisión el fago Va1 evidenció una cabeza icosaédrica y una cola no contráctil, características propias de la familia *Podoviridae*. En conclusión, el fago Va1 presenta características potenciales para su uso en fagoterapia.

Palabras clave: Bacteriófago; fagoterapia; *Vibrio alginolyticus*; acuicultura.

Abstract

Vibrio alginolyticus is associated with diseases in aquaculture. The misuse of antibiotics has led to the search for alternatives in the treatment of bacterial diseases, among them the application of bacteriophages that infect and destroy bacteria selectively. In this way, a highly lytic *V. alginolyticus* bacteriophage, termed Va1, was isolated, with the aim to evaluate its physical chemical parameters. For this purpose, different temperature, pH, chloroform exposure and host range conditions were evaluated. The temperature stability of phage Va1 showed higher titers at 20 and 30 °C decreasing from 40 °C. With respect to pH, the highest titers for the bacteriophage were between 5 and 8, and chloroform exposure reduced viability of the Va1 phage by 25%. The one-step curve determined that the latency period and the burst size were 20 minutes and 192 PFU / infective center respectively. Under the transmission electron microscope, the Va1 phage showed an icosahedral head and a non-contractile tail, belonging to the *Podoviridae* family. In conclusion, Va1 phage presents potential characteristics for use in phage therapy.

Keywords: Bacteriophage; phagotherapy; *Vibrio alginolyticus*; aquaculture.

Citación:

Fernández Espinel C., V. Flores Dominick, M. Medina Morillo. 2017. Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. Revista peruana de biología 24(1): 093 - 100 (Abril 2017). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103>

Presentado: 06/12/2016

Aceptado: 19/02/2017

Publicado online: 20/04/2017

Información sobre los autores:

CFE, VFD y MMM, realizaron el aislamiento, las pruebas de caracterización y redactaron el manuscrito.

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Journal home page: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citadas. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con editor.revperubiol@gmail.com.

Introducción

Vibrio alginolyticus es una bacteria Gram negativa, presente en todos los ambientes y organismos marinos y se encuentra asociado a enfermedades oportunistas (Thompson & Austin 2006), esto debido a su capacidad de adhesión al mucus del huésped, el cual es un factor crucial en el mecanismo de virulencia (Luo et al. 2016).

En acuicultura, las enfermedades infecciosas, especialmente las bacterianas, son los principales problemas en la expansión en esta industria y son fuente de pérdidas económicas (Flegel 2006). En ese sentido, se ha reportado a *V. alginolyticus* como el causante de enfermedades en organismos acuáticos cultivados (Gómez-León et al., 2005, Martins et al. 2010), especialmente en los estadios iniciales de vida (Zorrilla et al. 2003) produciendo septicemia, hemorragias, úlceras a nivel epitelial con necrotización progresiva (Gómez-León et al. 2005) y acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal (Paperna 1984). A consecuencia de ello, el uso de antibióticos tradicionales ha sido la estrategia más aplicada contra las infecciones bacterianas, pero su uso indiscriminado ha originado la aparición de bacterias multidrogo resistentes, lo que ha conllevado en muchas ocasiones, al desarrollo de patologías que no pueden ser tratadas con antibióticos convencionales e incluso al desarrollo de cepas bacterianas resistentes que pueden infectar a otros organismos, incluyendo al hombre (Defoirdt et al. 2007).

Por ello, en los últimos tiempos las investigaciones se han orientado en la búsqueda de tratamientos alternativos. Los bacteriófagos, virus que infectan bacterias, son considerados como una alternativa prometedora para prevenir y controlar enfermedades de etiología bacteriana en cultivos acuícolas (Ronda et al. 2003, Lomelí 2011, Nakai & Park 2002); por medio de ellos, las enfermedades bacterianas podrían ser tratadas de una forma específica y selectiva, sin afectar la microbiota normal en los sistemas de cultivos acuícolas (Clark & March 2004), además de no generar resistencia bacteriana a antibióticos (Sulakvelidze et al. 2001, Loc-Carrillo & Abedon 2011). Sin embargo, para fines aplicativos, es necesario comprender en primera instancia, el comportamiento del fago en diferentes condiciones fisicoquímicas, para aumentar las probabilidades de éxito de la terapia fágica.

El objetivo de este estudio fue el aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico contra *Vibrio alginolyticus* ATCC® 33787 para optimizar su aplicación como agente terapéutico en acuicultura.

Materiales y métodos

Cepa bacteriana huésped y cinética de crecimiento.- La cepa de *V. alginolyticus* ATCC® 33787, proporcionada por el Banco de Germoplasma del Instituto del Mar del Perú, fue utilizada como bacteria huésped para el aislamiento del bacteriófago. Esta cepa fue cultivada en caldo Tripticasa de soya (TSB) con 1% de NaCl (Merck, Alemania) a 25 °C por 24 horas. En las pruebas sucesivas, se utilizó *V. alginolyticus* ATCC® 33787 en fase logarítmica de su crecimiento (6 horas).

Aislamiento y purificación de bacteriófagos.- El bacteriófago fue aislado del líquido ascítico procedente de un ejemplar de *Paralichthys adspersus* "lenguado", con signos aparentes de enfermedad, procedente del laboratorio de Cultivo de Peces del Instituto del Mar del Perú. La superficie epitelial del ejemplar fue desinfectada con alcohol de 70°, posteriormente, por

abdominocentesis se extrajo el líquido ascítico del interior de la cavidad peritoneal utilizando una jeringa hipodérmica de 20 mL. Las muestras fueron almacenadas en frascos de 50 mL. En seguida, se realizó el aislamiento del bacteriófago siguiendo la metodología de Phumkhachorn (2010) con modificaciones. Las muestras fueron centrifugadas a 3300xg a 4 °C por 20 minutos y el sobrenadante fue filtrado por medio de un equipo de filtración con filtro de membrana de 0.22 µm de porosidad (Merck Millipore®, Alemania). La muestra filtrada fue enriquecida con un volumen igual de caldo Tripticasa de Soya (TSB) (Merck®, Alemania), suplementado con 1% de NaCl y con CaCl₂ 20 mM, a la cual se le adicionó 1 mL de un cultivo de *V. alginolyticus* ATCC® 33787. Esta mezcla fue incubada a 25 °C por 24 horas.

Luego de la incubación, la bacteria fue removida mediante centrifugación a 3300xg a 4 °C por 15 minutos y en seguida el sobrenadante fue filtrado (0.22 µm PES Syringe Filter MS®). Posteriormente, se realizó la prueba del "spot test" según Phumkhachorn (2010), para la cual, 80 µL de sobrenadante filtrado fue inoculado sobre un tapiz de *V. alginolyticus* ATCC® 33787 previamente mezclado con 3 mL de agar Tripticasa de Soya TSA (70%) 1% NaCl a 45 °C y vertido sobre placas con TSA (100%) 1% NaCl. La presencia de zonas de aclaramiento fue verificada luego de 24 horas de incubación a 25 °C como evidencia de la presencia de bacteriófagos.

La purificación del bacteriófago se realizó mediante la técnica de la doble capa según Hernández (2007). A partir del sobrenadante filtrado, se realizaron diluciones seriadas en buffer fosfato salino (PBS). Un mililitro de cada dilución fue mezclado con 1 mL de un cultivo de *V. alginolyticus* ATCC® 33787 en tubos estériles conteniendo 3 mL de TSA (70%) con 1 mL de ClCa₂ 20 mM (45 °C), los cuales se vertieron sobre placas con agar TSA (100%) y se incubaron a 25 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se evidenció la formación de placas de lisis las cuales fueron recortadas con ayuda de un asa de siembra con el aro de nicrom en ángulo recto, trasladadas y depositadas en microtubos de 2 mL conteniendo PBS estéril. En seguida, se agregaron 3 gotas de cloroformo y se agitaron en vortex por 1 minuto. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3300xg a 4 °C por 10 minutos y se filtraron a 0.22 µm. El filtrado fue almacenado en microtubos estériles de 1.5 mL a 4 °C.

Para la cuantificación de las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP.mL⁻¹) se utilizó la siguiente fórmula (Segundo et al. 2010):

$$UFP.mL^{-1} = (\text{Número de placa} \times \text{Factor de dilución}) / \text{Volumen de la alícuota}.$$

Caracterización del bacteriófago Va1

Evaluación de Termoestabilidad.- El test de estabilidad térmica del bacteriófago aislado, fue realizado de acuerdo a la metodología utilizada por Haq (2012). Un mililitro de PBS conteniendo bacteriófagos (título: 6 x 10⁸ UFP.mL⁻¹), fueron dispensados en tubos de ensayo, los cuales fueron sometidos a temperaturas de 20, 30, 40, 50 y 60 °C en baño maría, por 1 hora. Concluido el tiempo se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

Evaluación de la sensibilidad al cloroformo.- La evaluación de la sensibilidad de los bacteriófagos al cloroformo fue realizado

de acuerdo a la metodología utilizada por Wong (1994). Medio mililitro de bacteriófagos en solución PBS (título: 7×10^7 UFP. mL^{-1}) fueron dispensados en tubos de ensayo a los cuales se les adicionó 0.1 mL de cloroformo (grado: PA) e inmediatamente se mezclaron por 10 minutos a temperatura ambiente utilizando un Vortex. Una vez concluido el tiempo, los tubos de ensayo fueron sometidos a centrifugación, a $3300 \times g$ a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante fue utilizado para determinar el título final de bacteriófagos. El mismo procedimiento fue llevado a cabo con el grupo control al cual se sustituyó el cloroformo por solución salina estéril 0.85%. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

Evaluación de la sensibilidad a diferentes pH.- La evaluación de la sensibilidad de los bacteriófagos a diferentes pH fue realizado de acuerdo a la metodología utilizada por Haq (2012). Quinientos microlitros de bacteriófagos en solución buffer PBS (título: 7×10^7 UFP. mL^{-1}) fueron dispensados en tubos de ensayo los cuales contenían 5 mL de PBS, el cual fue previamente ajustado en intervalos de 1 unidad de pH, desde 2 hasta 8, utilizando HCl 1N o NaOH 1N a 25°C durante una hora. Concluido el tiempo, se determinó el título final de los bacteriófagos mediante la técnica de la doble capa. Los tratamientos fueron realizados por triplicado.

Evaluación del espectro de hospedero.- Se utilizó la técnica del "spot test" según Phumkhachorn (2010) modificada. Cincuenta microlitros de cada cepa indicadora se dispensaron en tubos de 13×100 mm conteniendo 3 mL de agar TSA (70%) a 45°C . Esta mezcla se vertió sobre placas Petri de 16×150 mm conteniendo agar TSA (100%) con la finalidad de formar un césped bacteriano. Una vez solidificada la doble capa, se goteó $50 \mu\text{L}$ del bacteriófago para cada una de las cepas indicadoras.

Las cepas indicadoras fueron: *Listonella anguillarum* NCIMB 6, *V. splendidus* NCIMB 1, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* NCIMB 2184, *P. damsela* subsp. *piscicida* NCIMB 2058, *V. harveyi* NCIMB 1280, *Flexibacter maritimus* NCIMB 2153, *Aeromonas hydrophila* (ATCC®7966™), *A. hydrophila* (ATCC®49140™), *A. hydrophila* (ATCC®35654™), *A. salmonicida* (ATCC®33658™), *Streptococcus iniae* (ATCC®29178™), *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (ATCC®13047™), *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* (ATCC®35655™), *Enterococcus faecalis* (ATCC®14506™), *Edwardsiella tarda* (ATCC®15947™), *Citrobacter braakii* (ATCC®10625™), *Escherichia coli* (ATCC®25922™), *V. alginolyticus* (ATCC®17749™), *V. alginolyticus* (ATCC®33787), *Yersinia ruckeri* (ATCC®29473™), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC®13525™), *P. putida* (ATCC®31483™) y *V. parahaemolyticus* (ATCC®17802™).

Reducción del crecimiento bacteriano.- El test de cinética de infección del bacteriófago fue realizado de acuerdo a la metodología utilizada por Haq (2012). Un mililitro de un cultivo de *V. alginolyticus* ATCC®33187 fue inoculado en matraces conteniendo 50 mL de caldo TSB 1% NaCl al que se le adicionó 1 mL del bacteriófago en solución PBS (título: 8×10^8 UFP. mL^{-1}). Posteriormente se incubaron a 25°C en agitación continua. Se utilizó un grupo control al cual no se le inoculó bacteriófagos. La densidad óptica (DO_{600}) fue medida en intervalos de 1 hora por 9 horas. La prueba se realizó por triplicado.

Morfología de los bacteriófagos.- La morfología de los bacteriófagos aislados fue observada mediante Microscopía Elec-

trónica de Transmisión (TEM), con tinción negativa y acetato de uranilo 2%. Las muestras fueron examinadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1200EX) a 80 kV.

Curva de un paso.- El periodo de latencia y el tamaño de la explosión fueron determinados a partir de la curva de un paso, la que fue realizada de acuerdo a la metodología utilizada por Phumkhachorn (2010). Diez mililitros de *V. alginolyticus* ATCC®33787 en fase logarítmica fueron centrifugados a $3300 \times g$ a 4°C por 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 10 mL de caldo TSB 1% NaCl ajustado a 10^8 UFC. mL^{-1} . A esta suspensión se le adicionó 5 mL de bacteriófagos en PBS (7×10^8 UFP. mL^{-1}) a una MOI de 0.1 (Middelboe et al. 2010) y se incubó a 25°C por 30 minutos. Una vez concluido el tiempo de incubación, la mezcla fue centrifugada a $3300 \times g$ a 4°C por 20 minutos y el pellet fue resuspendido en 50 mL de caldo TSB 1% NaCl. Se tomaron muestras cada 10 minutos en un periodo de 3 horas e inmediatamente fueron tituladas por el método de la doble capa (Hernández 2007). La prueba se realizó por triplicado.

Resultados

Cinética de crecimiento de la cepa *V. alginolyticus* ATCC®33787.- La cinética de crecimiento de *V. alginolyticus* ATCC®33787 evidenció que entre las 3 horas y las 9 horas la cepa se encuentra en la fase logarítmica de su crecimiento. (Fig. 1)

Aislamiento y purificación de bacteriófagos.- La prueba del spot test, utilizando a *V. alginolyticus* ATCC®33787 como la cepa indicadora, dio positivo a la presencia de bacteriófagos (Fig. 2A). Además, mediante el método de la doble capa, se aisló un bacteriófago al cual se le nombró como Va1. Las placas de lisis observadas fueron claras, uniformes, de forma circular y pequeñas de aproximadamente 0.1 – 0.5 mm de diámetro promedio (Fig. 2B).

Evaluación de la Termoeestabilidad.- Los resultados evidencian que el bacteriófago Va1 es estable hasta los 20 y 30°C por 60 minutos, disminuyendo su viabilidad a partir de los 40 y siendo nula a 60°C . (Fig. 3).

Evaluación de la sensibilidad al cloroformo.- La viabilidad del bacteriófago Va1 fue reducida casi un 25% al exponerla al cloroformo (Fig. 4).

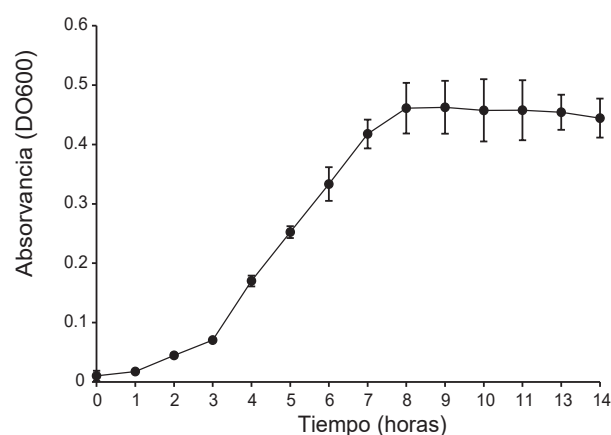


Figura 1. Cinética de crecimiento de la cepa de *V. alginolyticus* ATCC®33787. Barras verticales son la desviación estándar, $n = 3$.

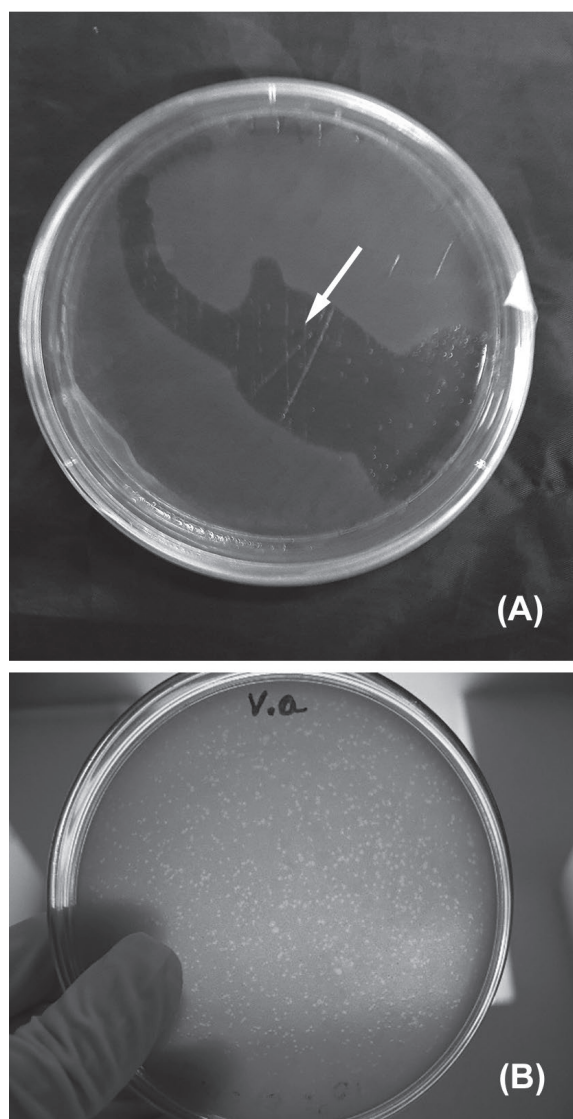


Figura 2. (A) Prueba del “Spot test” contra la cepa *V. alginolyticus* ATCC® 33787. Se observa la zona de aclaramiento en la región de goteo la cual sugiere la presencia de bacteriófagos (flecha) (B) Placas de lisis del bacteriófago Va1 específico a *V. alginolyticus* ATCC® 33787.

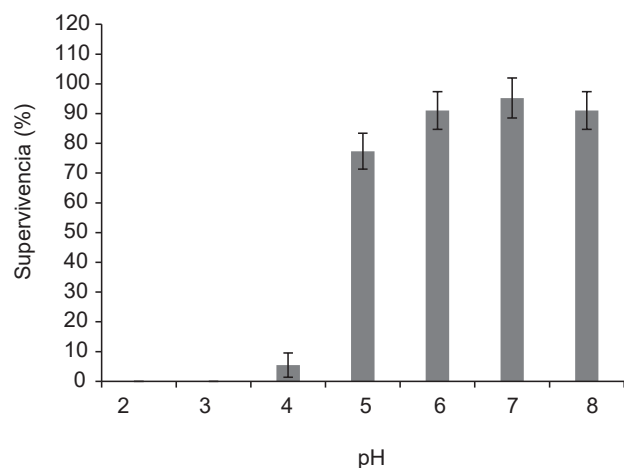


Figura 5. Viabilidad del fago Va1 tratado con diferentes pH. Barras verticales son desviación estándar, n=3.

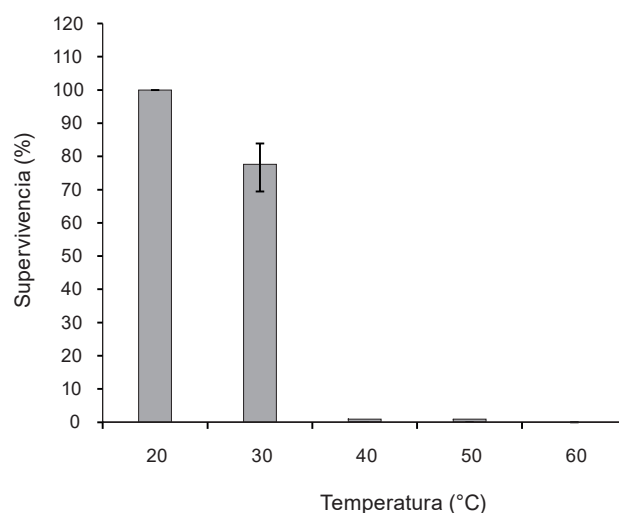


Figura 3. Estabilidad del bacteriófago Va1 sometido a diferentes temperaturas por 30 minutos. El gráfico muestra la inviabilidad del bacteriófago a medida que la temperatura sobrepasa los 30 °C. Barras verticales son la desviación estándar, n=3.

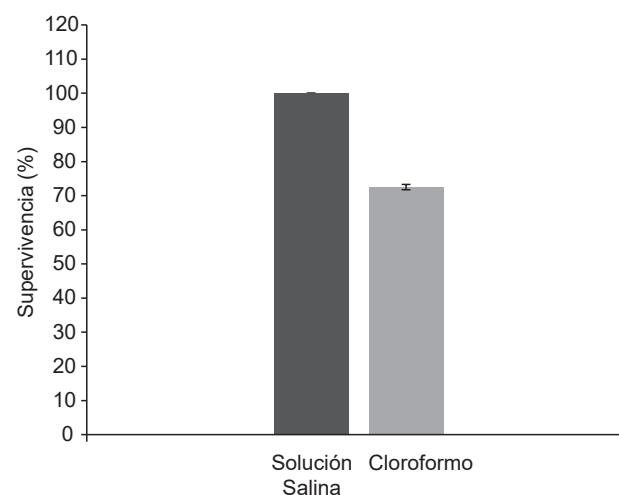


Figura 4. Viabilidad del fago Va1 tratado con cloroformo y sin cloroformo. Barras verticales son desviación estándar, n=3.

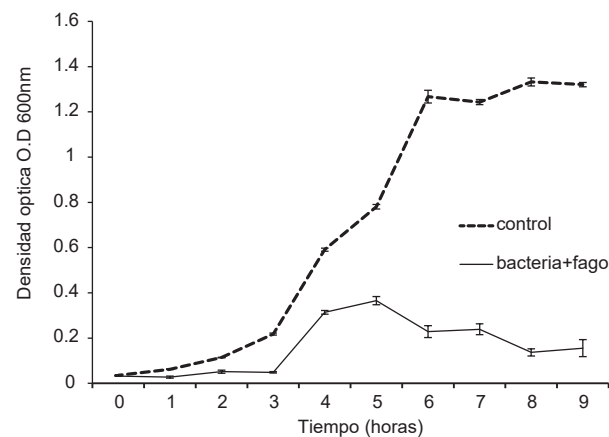


Figura 6. Efecto del fago Va1 sobre la cepa de *V. alginolyticus* ATCC® 33787 en fase logarítmica. Barras verticales son desviación estándar, n=3.

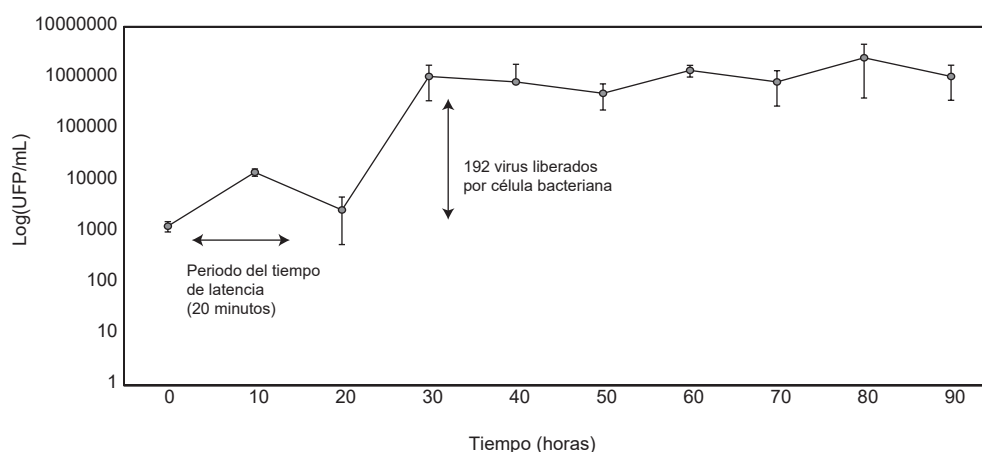


Figura 7. Curva de un paso del bacteriófago Va1. Barras verticales son desviación estándar, n=3.

Resistencia a diferentes pH. El fago Va1 mantiene su viabilidad en un rango de pH entre 5 a 8, adicionalmente observamos que a pH 2, 3 y 4 la infectividad del fago es prácticamente nula (Fig. 5).

Espectro de hospedero. De las 23 cepas utilizadas para determinar el espectro de hospedero del bacteriófago Va1 por medio de la prueba del “spot test”, *V. alginolyticus* ATCC® 33787 evidencio una elevada susceptibilidad en la región de goteo, reflejada por el crecimiento nulo de la cepa, adicionalmente se evidenció un ligero aclaramiento para *V. parahaemolyticus* ATCC® 17802™. (Tabla 1).

Reducción del crecimiento bacteriano. La infección de *V. alginolyticus* ATCC® 33787 con el fago Va1 (7×10^8 UFP.mL⁻¹) fue monitoreada por 9 horas. Se observó que el bacteriófago Va1 es capaz de lisar a *V. alginolyticus* ATCC® 33787 impidiendo su normal crecimiento. (Fig. 6).

La curva de un paso. Los parámetros de multiplicación del ciclo lítico del bacteriófago Va1 fueron determinados a partir de la curva de un paso (Fig. 7). Se determinó que el periodo de latencia dura aproximadamente 20 minutos, y el tamaño de la explosión fue de 192 fagos por centro infectivo.

Microscopia electrónica. Se observó que el fago Va1 pertenece a la familia *Podoviridae* por presentar cabeza de forma icosaédrica con un talo corto no contráctil y un diámetro menor al diámetro de la cabeza. (Fig. 8).

Discusión

En el presente trabajo se aisló un bacteriófago altamente lítico contra la cepa de *V. alginolyticus* ATCC® 33787 a partir del líquido ascítico de un ejemplar de *P. adspersus* con signos aparentes de enfermedad, lo que sugiere la posible presencia de *Vibrio alginolyticus* en la infección, ya que se encuentra asociado a enfermedades oportunistas (Thompson & Austin 2006). Además, otros autores han reportado el aislamiento de bacteriófagos líticos contra *V. alginolyticus* a partir de muestras de ambiente acuático (Lin et al. 2012, Kalatzis et al. 2016).

El fago Va1 aislado contra *V. alginolyticus* produjo placas claras de un diámetro de 0.5 a 1 mm de diámetro. Estos diámetros de placas son semejantes a los reportados por Hidaka y Tokushige

(1978) y Solís et al. (2016) para otros fagos contra bacterias del género *Vibrio*, quienes aislaron placas de 0.5 mm y 1 mm contra *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae* respectivamente.

La microscopia electrónica reveló que el fago Va1 concuerda morfológicamente con los fagos ØA318 (Lin et al. 2012) y VAP1

Tabla N°1: Evaluación del espectro de hospederos del bacteriófago Va1.

Cepa	Especie	Fago Va1
NCIMB 6	<i>L. anguillarum</i>	-
NCIMB 1	<i>V. splendidus</i>	-
NCIMB 2184	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	-
NCIMB 2058	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicidae</i>	-
NCIMB 1280	<i>V. harveyi</i>	-
NCIMB 2153	<i>F. maritimus</i>	-
ATCC®7966™	<i>A. hydrophila</i>	-
ATCC®49140™	<i>A. hydrophila</i>	-
ATCC®35654™	<i>A. hydrophila</i>	-
ATCC®33658™	<i>A. salmonicida</i>	-
ATCC® 29178™	<i>S. iniae</i>	-
ATCC® 13047™	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-
ATCC® 35655™	<i>A. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	-
ATCC® 14506™	<i>E. faecalis</i>	-
ATCC® 15947™	<i>E. tarda</i>	-
ATCC® 10625™	<i>C. braakii</i>	-
ATCC® 25922™	<i>E. coli</i>	-
ATCC® 33787™	<i>V. alginolyticus</i>	+
ATCC® 17749™	<i>V. alginolyticus</i>	+
ATCC® 29473™	<i>Y. ruckeri</i>	-
ATCC® 13525™	<i>P. fluorescens</i>	-
ATCC® 31483™	<i>P. putida</i>	-
ATCC® 17802™	<i>V. parahaemolyticus</i>	+/-

* += Intenso aclaramiento,
- = no se evidenció aclaramiento,
+/- = ligero aclaramiento

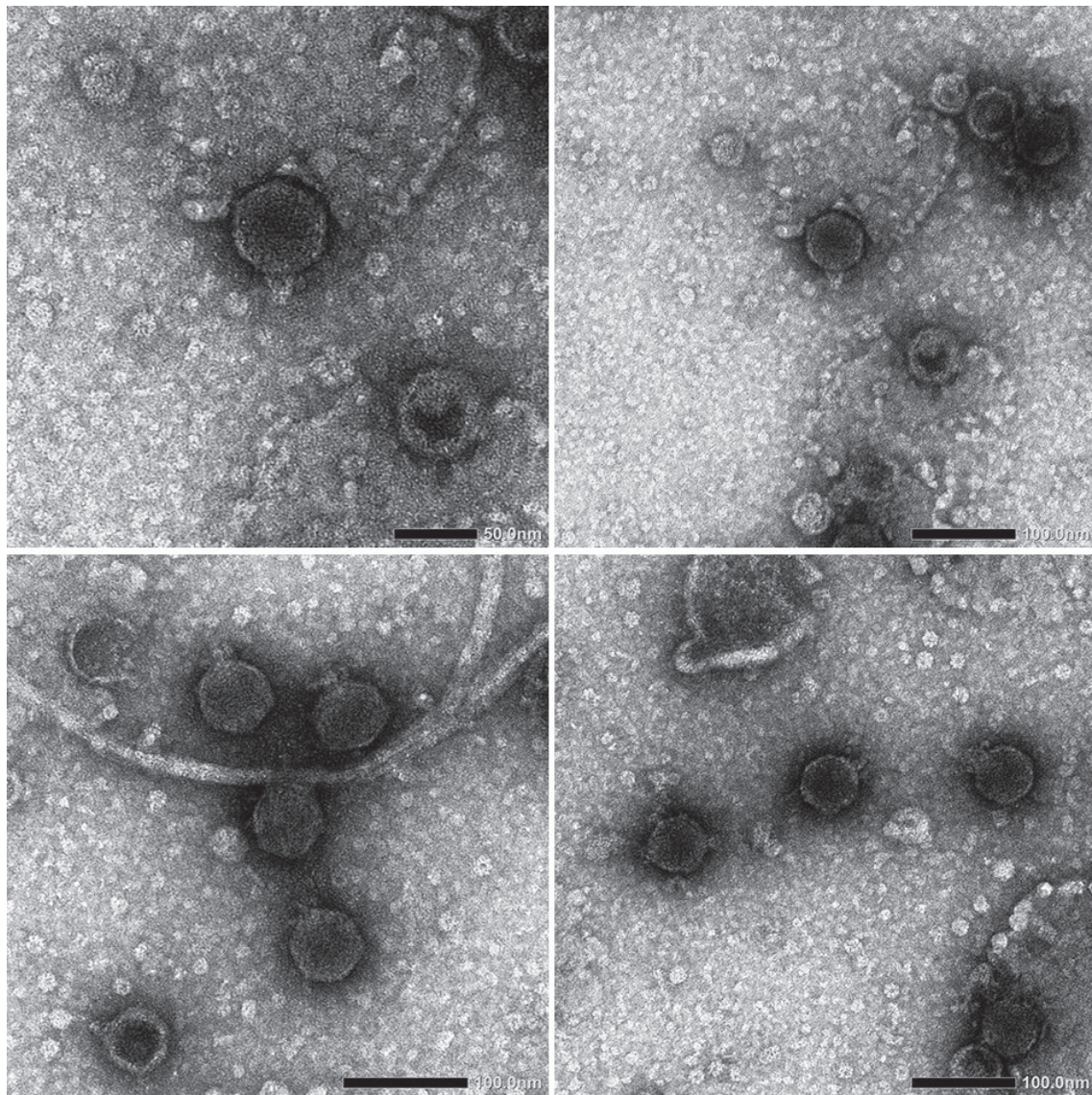


Figura 8. Microfotografía electrónica del bacteriófago Va1 perteneciente a la familia Podoviridae.

(Heo et al. 2012) ambos específicos a *V. alginolyticus* y el fago VpV262 (Hardies et al. 2003) específico a *V. parahaemolyticus*. El fago Va1 se clasifica dentro del tipo C en el manual de Bradley (1967), clasificación que corresponde a la familia *Podoviridae*, que se caracteriza por tener una cabeza de seis lados, una cola no contráctil más corta que el diámetro de la cabeza y presencia de ácido nucleico del tipo ADN (Bradley 1967, Ackermann 2001, Sillankorva et al. 2008, Moebus & Nattkemper 1981).

La curva de un paso mostró las etapas implicadas en el ciclo de multiplicación de los bacteriófagos. El periodo de latencia y el tamaño de la explosión son parámetros esenciales para comprender las propiedades y variación entre fagos y hospederos (Middelboe et al. 2010; Wang 2005). Algunos autores han reportado para el género *Vibrio*, periodos de latencia de 30, 120 y 65 minutos y tamaño de explosión de 78 y 23 partículas víricas por centro infectivo (Phumkhachorn y Rattanachaikunsopon 2010, Sung Lee et al. 2014). Sin embargo, la curva de un paso depende del índice de multiplicidad de infección (MOI), la cual se sugiere que debe utilizarse en un rango de 0.1 y 0.01 debido

a que una MOI más alta incrementa la probabilidad de que una bacteria sea infectada por más de un fago incrementado así el número total de fagos por centro infectivo (Middelboe et al. 2010). Así, el fago Va1 tiene un tamaño de explosión de 192 unidades víricas por centro infectivo utilizando un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 comparado con otros fagos específicos a *V. alginolyticus* cuyo tamaño de explosión fue de 97 y 44 fagos por centro infectivo utilizando un MOI de 0.01 (Kalatzis et al. 2016). Se ha evidenciado que mientras más corto es el periodo de latencia y mayor el tamaño de explosión, el bacteriófago puede ser aplicado con mayores probabilidades de éxito en fagoterapia (Middelboe et al. 2010, Abedon et al. 2001), ya que al producirse más partículas virales a partir de un centro infectivo, aumentan las posibilidades de controlar mejor las poblaciones bacterianas.

El pH ácido disminuye la viabilidad del bacteriófago Va1, mientras que a unidades de pH cercanas al valor neutro se mantiene estable. Resultados similares fueron hallados en bacteriófagos de otros vibrios (Phumkhachorn y Rattanachaikunsopon

2010). La importancia de este ensayo radica en la posibilidad de aplicaciones futuras de fagoterapia vía oral, en ese sentido, el bacteriófago de este estudio estaría probablemente limitado de administrarse por esta vía. Además, el bacteriófago *Va1* es estable entre 20 y 30 °C y disminuye su viabilidad conforme la temperatura se eleva. Lin et al. 2012, reportaron que la estabilidad para el fago OA318 específico a *V. alginolyticus* estuvo en 20 y 40 °C. Posiblemente las limitaciones respecto a los parámetros ambientales extremos se deba al origen natural de sus bacterias huésped, ya que los vibrios se han reportado en ambiente marinos (Thompson & Austin 2006), donde la temperatura y el pH se mantienen constantes.

El resultado de la prueba de rango de hospederos fue positivo para *V. alginolyticus* ATCC® 17749™ y *V. alginolyticus* ATCC® 33787™ y negativo para la mayoría de cepas testigos a los que fue enfrentado el fago *Va1*. La cepa *V. parahaemolyticus* ATCC® 17802™ resultó en un ligero aclaramiento cuando se enfrentó con el fago *Va1*. Esto se debería probablemente a que *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* son cepas altamente homogéneas, entre 99,88 y 61,77% de nucleótidos idénticos (Osorio & Klose 2000). Sin embargo, el aclaramiento para *V. parahaemolyticus* fue considerado (+/-) por que no se evidenció una lisis total, a pesar del elevado título del fago *Va1*.

En el proceso de purificación de bacteriófagos, el cloroformo cumple un rol importante al lisar al remanente bacteriano, sin embargo en este estudio se evidenció que su utilización disminuyó la viabilidad del bacteriófago en un 25%. Resultados similares fueron reportados por Wong (1996). En ese sentido, en nuestro laboratorio, hemos evitado el uso de este químico en el proceso de purificación con resultados satisfactorios.

En conclusión, el bacteriófago aislado en este estudio, con un periodo de latencia corto y un tamaño de explosión alto, presenta características potenciales para su utilización en pruebas de fagoterapia cuya técnica representa una alternativa al tratamiento con antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas en el campo de la acuicultura.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Toshihiro Nakai, Profesor de la Universidad de Hiroshima, Japón, por su ayuda en la toma de fotografías electrónicas. Al laboratorio de Cultivo de Peces Marinos del Instituto del Mar del Perú.

Literatura citada

- Abedon S., T. Herschler, D. Stopar. 2001. Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response. *Applied Environmental Microbiology*. 67(9):4233-4241. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4233-4241>.
- Ackermann H. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology* 146: 843-857
- Bradley D. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*. 31(4):230-314.
- Clark J., & J. March. 2004. Bacterial viruses as human vaccines. *Expert Review of Vaccines* 3(4):463-476. <https://doi.org/10.1586/14760584.3.4.463>
- Defoirdt T., N. Boon, P. Sorgeloos, et al. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnology*. 25(1):472-479. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.001>
- Flegel T. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. 258(1):1-33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.013>
- Gómez J., L. Villamil, M. Lemos, et al. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied Environmental Microbiology*. 71(1):98-104. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.98-104.2005>.
- Hardies S., A. Comeau. Et al. 2003. The complete sequence of marine bacteriophage VpV262 infecting *Vibrio parahaemolyticus* indicates that an ancestral component of a T7 viral supergroup is widespread in the marine environment. *Virology*. 310(2):359-271. [http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00172-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00172-7)
- Hernández A. 2007. Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea. Memoria, Doctor, Biología Funcional y Molecular. Universidad de Oviedo, España.
- Heo Y., C. Lee, M. Baek. Et al. 2012. Morphological characterization of *Vibrio alginolyticus* specific bacteriophage isolated from fish farms on west coast of Korea. *Journal of fish pathology*. 25(3):165-172. <https://doi.org/10.7847/jfp.2012.25.3.165>.
- Hidaka T. & A. Tokushige. 1978. Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* Bacteriophages in Sea Water. *Memoirs of Faculty of Fisheries*. 27(1):79-90.
- Haq U, Chaudhry W, Andleeb S, et al. 2012. Isolation and Partial Characterization of a Virulent Bacteriophage IHQ1 Specific for *Aeromonas punctata* from Stream Water. *Microbial Ecology*. 63:954-963. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9944-2>.
- Kalatzis P., R. Bastías, C. Kokkari, et al. 2016. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages, St2 and Grn1; phage therapy application for biological control of *Vibrio alginolyticus* in aquaculture live feeds. *PLOS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151101>.
- Lin Y., C. Chiu & F. Chang. 2012. Characterization of a new phage, termed A318, which is specific for *Vibrio alginolyticus*. *Arch Virology*. Springer Vienna. 157(5):917-926. <https://doi.org/10.1007/s00705012-1244-8>.
- Loc-Carrillo C., & S. Abedon. 2011. Pros and cons of phage therapy bacteriophage. *Landes Bioscience*. 1(2):111-114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>.
- Lomelí C. 2011. La fagoterapia como estrategia para reducir la mortalidad por Vibriosis en larvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Memoria, Magister en Ciencias en manejo de Recursos Marinos. IPN-CICIMAR. La Paz B.C.S. Acceso online 18/04/2015.
- Luo G., L. Huang, Y. Sun, Y. Qin, X. Xu, L. Zhao, Q. Yan. 2016. *flrA*, *flrB* and *flrC* regulate adhesion by controlling the expression of critical virulence genes in *Vibrio alginolyticus*. *Emerging Microbes & Infections*. 5. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.82>
- Martins M., J. Mourinho, G. Fezer, et al. 2010. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 70(1):205-209. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010000100028>
- Middelboe M., A. Chan & S. Bertelsen. 2010. Isolation and life cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. *MAVE*. 13:118-133. <https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.118>
- Moebus K., & H. Nattkemper. 1981. Bacteriophage sensitivity patterns among bacteria isolated from marine waters. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 34:375- 385. Doi: 10.1007/BF02074130.
- Nakai T., & S. Park. 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in Microbiology*. 153(1):13-18. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01280-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01280-3)
- Osorio C., & K. Klose. 2000. A region of the transmembrane regulatory protein *toxR* that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*. 182(2):526-528. <https://doi.org/10.1128/JB.182.2.526-528.2000>
- Paperna I. 1984. Review of diseases affecting cultured *Sparus aurata*

- and *Dicentrarchus labrax*. París. 465-482.
- Phumkhachorn P. & P. Rattanachaikunsopon. 2010. Isolation and partial characterization of a bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi*. *African Journal of Microbiology Research* 4(16):1794-1800.
- Ronda C., M. Vázquez, R. López. 2003. Los bacteriófagos como herramienta para combatir infecciones en acuicultura. *Revista AquaTIC*. 18:3-10.
- Segundo N., E. Hernández, O. López, O. Torres. 2010. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41(3):17-26
- Sillankorva S., P. Neubauer & J. Azeredo. 2008. Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens*. *BMC Biotechnology*. 8:80-91. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-80>
- Solís A., U. Hernández, A. Navarro, et al. 2016. Genetic characterization of ØVC8 lytic phage for *Vibrio cholerae* O1. *Virology Journal*. 13-47. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0490-x>.
- Sulakvelidze A., Z. Alavidze & G. Morris. (2001). Minireview- Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(3):649-659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
- Sung Lee H., S. Choi, H. Shin, et al. 2014. *Vibrio vulnificus* Bacteriophage SSP002 as a Possible Biocontrol Agent. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(2):515-524. <https://doi.org/10.1128/AEM.02675-13>.
- Thompson F., B. Austin. 2006. The biology of vibrios. Wallingford, D.C. pp. 357-411.
- Wong A. 1994. Purificación y caracterización biológica del bacteriófago uB-19 específico de *Bacillus thuringiensis* Memoria, Magister en Ciencias con especialidad en Microbiología. México. Acceso online 18/04/2015.
- Zorrilla I., S. Arijó, M. Chabrillon, et al. 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole (*Solea senegalensis*, Kaup) and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal Fish Disease*. 26(2):103-108. DOI: 10.1046/j.1365-2761.2003.00437.x.