

Determinación de los cambios que genera la presencia de los Iones Mg^{2+} , Ca^{2+} , y Na^+ en la proliferación de salmonelófagos líticos.

María José Guazá Balanta

Directores:

MSc. Carlos Andrés Aranaga Arias

Dra. Aura Dayana Falco Restrepo

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2023**

Determinación de los cambios que genera la presencia de los Iones Mg^{2+} , Ca^{2+} , y Na^{+} en la proliferación de salmonelóforos líticos.

María José Guazá Balanta

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbiólogo.**

Directores:

**MSc. Carlos Andrés Aranaga Arias
Dra. Aura Dayana Falco Restrepo**

Línea de Investigación:

Investigación e Innovación en Enfermedades Tropicales

Grupo de Investigación:

QUIBIO

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología**

IMPACTOS

Relacione los impactos que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIOS
Científico	• Aprobación de trabajo de grado para optar por el título de microbiólogo. • Aportar información que beneficie la obtención de bacteriofagos en diversos estudios que los involucren. • Compartir información que contribuya a la búsqueda de soluciones a la resistencia antimicrobiana (RAM).	Autores, grupo de investigación de la Universidad Santiago de Cali, comunidad científica con intereses en los bacteriofagos.
Social	• disminuir la percepción general de aspecto negativo que se asocia a los microorganismos, exponiendo el potencial que algunos de estos tienen para aportar en proyectos que busquen encontrar alternativas a problemáticas que afectan directamente a la población.	Comunidad en general.

DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS QUE GENERA LA PRESENCIA DE LOS IONES Mg^{2+} , Ca^{2+} , Y Na^{+} EN LA PROLIFERACIÓN DE SALMONELÓFAGOS LÍTICOS.

María José Guazá¹, Carlos Aranaga¹, Aura Falco²

¹ Grupo de investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

² Grupo de investigación en Microbiología, Industria y Medio Ambiente (GIMIA), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

RESUMEN

Una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comunes a nivel mundial es la salmonelosis, esta es producida por el género bacteriano *Salmonella* spp. La resistencia a antibióticos que esta bacteria ha conferido inicia la búsqueda de alternativas para su tratamiento, siendo la fagoterapia una de estas. La adhesión de los bacteriófagos a la superficie celular es la primera y una de las principales etapas en la infección viral. Existen iones como el Mg^{+2} , Ca^{+2} y Na^{+} que trabajan como cofactores de la adhesión de los bacteriófagos a sus huéspedes trayendo como consecuencia un aumento en la población viral. Es por ello que en este trabajo a partir de la determinación del título viral de un bacteriofago infectivo para *Salmonella* (4×10^9 UFP/mL), se determinaron los cambios en la proliferación de este en presencia de los iones Mg^{+2} , Ca^{+2} y Na^{+} , siendo el ion Mg^{+2} aquel en el que se encontraron cambios que pueden potencializar la obtención del bacteriofago a partir de una muestra compleja como lo es una matriz ambiental sólida.

Palabras clave: bacteriófagos, *Salmonella*, iones de adhesión, fagoterapia.

DETERMINATION OF THE CHANGES GENERATED BY THE PRESENCE OF Mg^{2+} , Ca^{2+} , AND Na^{+} IONS IN THE PROLIFERATION OF LYTIC SALMONELLOPHAGES.

ABSTRACT

One of the most common foodborne diseases worldwide is salmonellosis, which is caused by the bacterial genus *Salmonella* spp. The resistance to antibiotics that this bacteria has conferred begins the search for alternatives for its treatment, phage therapy being one of these. The adhesion of bacteriophages to the cell surface is the first and one of the main stages in viral infection. There are ions such as Mg^{+2} , Ca^{+2} and Na^{+} that work as cofactors for the adhesion of bacteriophages to their hosts, resulting in an increase in the viral population. That is why in this work, based on the determination of the viral titer of a bacteriophage infective for *Salmonella* (4×10^9 PFU/mL), the changes in its proliferation in the presence of Mg^{+2} , Ca^{+2} and Na^{+} and ions were determined. The Mg^{+2} ion was the one in which changes were found that can potentiate the obtaining of the bacteriophage from a complex sample such as a solid environmental matrix.

Keywords: bacteriophages, *Salmonella*, adhesion ions, phage therapy.

1. INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan bacterias y se reproducen dentro de ellas. Son organismos acelulares, lo que significa que no tienen células propias y no pueden reproducirse por sí mismos sin la ayuda de una célula hospedadora. Estas entidades biológicas son de amplia distribución en la naturaleza ya que se encuentran en todos los ambientes donde las bacterias proliferan y debido a su capacidad lítica se les considera elementos antibacterianos capaces de regular las poblaciones bacterianas [1].

El ciclo vital de un bacteriófago es el proceso mediante el cual un virus bacteriófago se reproduce dentro de una célula bacteriana. Se conocen dos posibles ciclos biológicos de los bacteriófagos: El latente o lisogénico en donde el genoma viral recombina en el cromosoma bacteriano en forma de profago y se transmite de forma vertical en cada división celular; y el lítico, en el cual tras la formación de la progenie viral se produce la lisis y muerte de la bacteria infectada [2].

El proceso de infección viral de los fagos se constituye por diferentes fases. La adhesión o fijación a la superficie de la célula bacteriana es el primer paso del ciclo lítico, la infección de la célula empieza cuando las fibras del bacteriófago reconocen y se unen a las moléculas de la superficie bacteriana, está mediada por estructuras o receptores específicos y cofactores que varían en la interacción entre el bacteriófago y el hospedador, factores externos y del estado fisiológico del hospedero [3]. Estos receptores bacterianos pueden ser de naturaleza proteica, lipoproteica, polisacáridica, lipopolisacáridica, de ácido teicoico, flagelos y pili. El genoma de la bacteria es el que determina la síntesis de estos receptores, lo que significa que un proceso de mutación en los receptores puede convertir a una bacteria sensible o resistente a los bacteriófagos. La presencia de estos receptores va a ampliar o reducir el espectro de los fagos a una especie o cepa bacteriana [4].

La adhesión de un bacteriófago a su hospedador bacteriano está influenciada por diversos factores, Principalmente por la especificidad de anclaje; La concentración de fagos y bacterias relativa de bacteriófagos y bacterias en el entorno es crucial para la infección viral; A mayor concentración de fagos, es más probable que encuentren y se adhieran a sus hospedador bacterianos. Las interacciones electrostáticas entre los fagos y las bacterias también pueden influir en la adhesión; La carga eléctrica de las superficies bacterianas y de los fagos puede afectar la afinidad de unión entre ellos; Otro factor muy importante que puede afectar la adhesión de los bacteriófagos son las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH y la presencia de ciertos iones en el medio [5]. Entre los cofactores de adhesión se encuentran iones de calcio, magnesio y algunos aminoácidos que ayudan a mantener la unión entre fago y célula hospedera [6]. Estos iones no solo están relacionados con el proceso de adhesión, sino que ciertos fagos dependen de estos para poder penetrar su material genético. Pueden actuar como protector ante la acidez, acelerar el proceso de adsorción, variando la cinética del fago, y además promover una propagación más rápida de estos virus [7].

Debido a que los bacteriófagos han sido objeto de investigación para diversas aplicaciones en distintos campos; En este trabajo se pretende determinar si la presencia de los iones Mg^{2+} , Ca^{2+} y Na^{+} generan cambios en la morfología de la placa lítica, la infección viral y la recuperación a partir de una matriz ambiental sólida de un bacteriófago lítico infectivo para *Salmonella*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestra bacteriana y bacteriofago

La bacteria huésped *Salmonella* sp. (SIR) y el salmonelófago phago 52 (Φ 52) fueron obtenidos del Departamento de Microbiología de la Universidad Santiago de Cali, ambos aislados en investigaciones previas de la Universidad en la ciudad de Cusco, Perú.

2.2 Evaluación de la presencia de bacteriofago con capacidad infectiva empleando la tecnica spot

Para evaluar la presencia de bacteriófagos infectivos se mezcló 100 µl de un cultivo fresco de salmonella con 6 ml de agar blando Tripticasa de soya (TSAB) en un tubo de ensayo pequeño estéril. La mezcla se homogeneizó con un vortex y se vertió en una caja con TSA. Una vez se solidificó, se sembraron spots de 10 µl del bacteriofago y de diluciones seriadas de este (10^{-1} - 10^{-7}), una vez las gotas fueron absorbidas por el agar, se procedió a incubarlas a 37°C durante 20 horas.

2.3 Determinación del título viral

Se preparó un cultivo bacteriano en fase logarítmica, inoculando una asada de un cultivo de *Salmonella* sp., previamente refrigerado en caldo tripticasa soya (TSB) que se incubó a $36,5 \pm 2$ °C, 16 horas. Para determinar la carga viral del bacteriófago se realizaron diluciones seriadas de la solución que contiene el bacteriófago Φ52, posterior a ello la enumeración de bacteriófagos se realizó mediante la Técnica de Doble Capa descrita por Kropinski y colaboradores [8]. Se mezclaron 10µL de las mismas, 200µL del cultivo de la bacteria y 6 mL de Agar Tripticasa Soya (TSA) a 0.5%, se homogeneizó, y se vertió en placas de Petri que contenían una capa de TSA al 1,0 % y se incubó toda la noche [9].

2.3.1 Cálculo de la carga viral

Después del ensayo en placa, la carga viral se calculó como una medida de unidades de formación de placa (UFP) por mililitro, utilizando la ecuación 1.

$$UFP/mL = \frac{No.placas}{vol\ inoculado \times dilución\ (última\ donde\ hubo\ placas\ líticas\ contables)} \quad (1)$$

2.3.2 Aumento del título viral en medio líquido

Se agregó el Phago52 a un cultivo fresco de *Salmonella* sp., y se incubó a 37°C durante 18 horas, para luego centrifugar a 8000rpm y filtrarse con una membrana de 0,45 µm, para realizar la Técnica de Doble Capa descrita por Kropinski y colaboradores [8]. y calcular nuevamente la carga viral utilizando la ecuación 1 [10]. El proceso se realizó hasta obtener una concentración significativa.

2.4 Morfología de placas líticas

Implementación de la Técnica de Doble Capa descrita por Kropinski y colaboradores con modificaciones para observar las placas líticas generadas por el Phago52, se mezclaron 6ml de agar semisólido 100µL de una dilución del Phago52 (esta dilución fue aquella en la que se hizo un conteo de entre 10-30 zonas de lisis) con 200µL de un cultivo fresco de salmonella, y 200µL del tratamiento, se utilizaron diferentes tratamientos, por lo tanto, se creó por cada tratamiento placas por duplicado.

- Tratamiento 1 (H₂O estéril) equivalente al control.
- Tratamiento 2 (NaCl 0.1M)
- Tratamiento 3 (MgCl₂ 0.1M)
- Tratamiento 4 (MgSO₄ 0.1M)
- Tratamiento 5 (CaCl₂ 0.1M)

Posterior a la incubación se evaluaron características macroscópicas presentes en las zonas de lisis para cada uno de los tratamientos.

2.5 Evaluación de las soluciones en una matriz sólida

Se recolectó una muestra de suelo en la Universidad Santiago de Cali, posteriormente esta fue trasladada al Laboratorio de Investigación donde se esterilizó; seguidamente a la muestra de suelo estéril se le añadieron 100µl de fago, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

2.5.1 Enriquecimiento

Se añadió 10gr de la muestra a 90 ml del tratamiento que presentó un mayor cambio benéfico para la infección viral y se dejó en temperatura ambiente durante 24 horas. (también se realizó el control).

2.5.2 Obtención de fagos líticos (centrifugación y filtración)

En un tubo de centrifuga se agregaron 20 ml de la muestra enriquecida, para luego centrifugar a 8000 rpm y 4° durante 15 minutos (Centrífuga Refrigerada velocity 18R), se tomó el sobrenadante para pasarlo por un filtro de 0,45 µm. Este filtrado se usó para la obtención de los fagos (Londoño, 2016).

Se utilizó el filtrado para la Implementación de la Técnica de Doble Capa descrita por Kropinski y colaboradores (Clokic, 2009), y finalmente se realizó el cálculo de la carga viral por cada tratamiento, para ello se utilizó la ecuación 1.

2.5.3 Aislamiento y purificación

De la placa de Petri se extrajo una placa de lisis aislada, se pasó a un tubo con 5 ml de TSB y se adicionaron 0,2 ml de la cepa utilizada en el spot. Las mezclas se incubaron a 37°C hasta que los cultivos se lisen completamente, se realizará el mismo proceso de centrifugación y filtración usado para la muestra inicial, para finalmente realizar nuevamente un aislamiento por la Técnica de Doble Capa descrita por Kropinski y colaboradores [8]; donde se tomó una placa de lisis aislada y se hizo un nuevo enriquecimiento por triplicado, después del tercer proceso, una fracción del cultivo lisado se filtró con membrana de 0,45 µm de tamaño de poro y se le adicionó 4% (v/v) de CHCl₃, finalmente se conservó refrigerada a 4°C. Estas fracciones filtradas servirán como stock para propagar fagos aislados en ensayos posteriores [10] .

3. RESULTADOS

3.1 Evaluación de la presencia de bacteriofago con capacidad infectiva empleando la técnica de spot.

Previamente se realizó el aumento del título viral 2 veces, para posteriormente realizar una técnica por spot la cual confirmó la presencia del bacteriofago con capacidad infectiva para *Salmonella*.

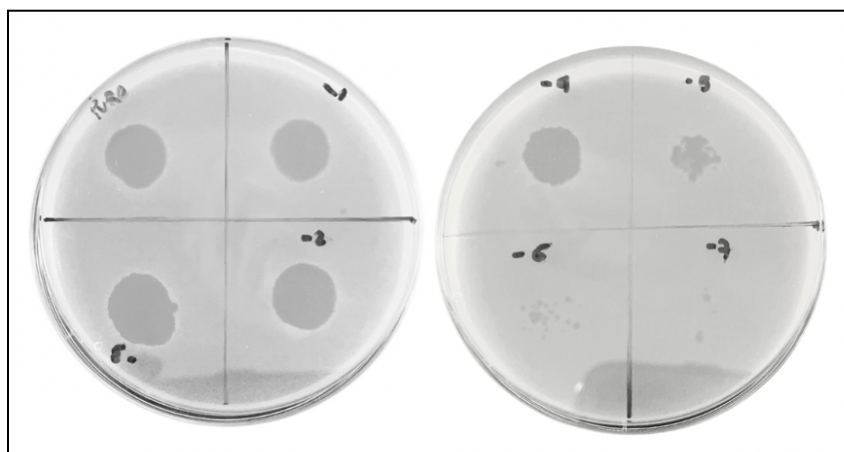


Figura 1. Determinación de la presencia del phago 52 por técnica de spot

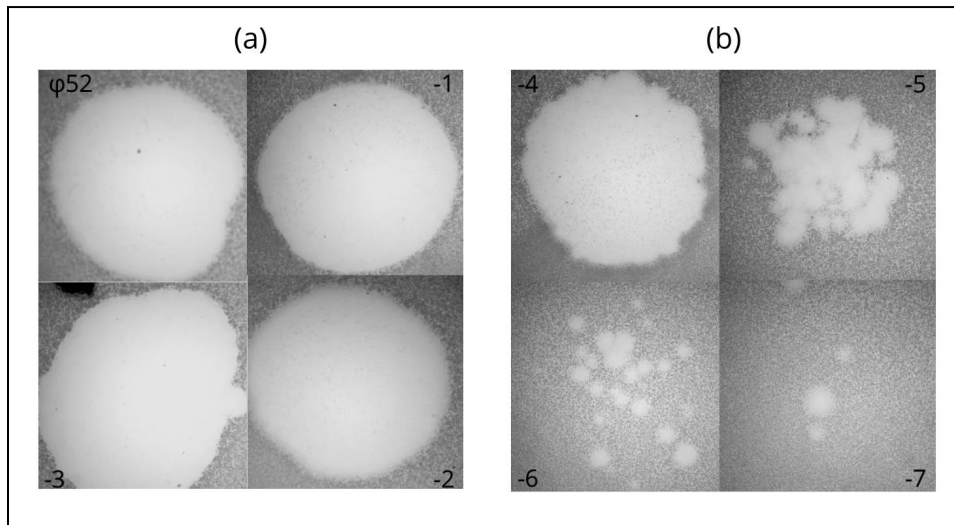


Figura 2. Visión microscópica de las zonas de lisis del phago 52 por técnica de spot

3.2 Establecimiento del título viral a partir de una muestra de Phago52.

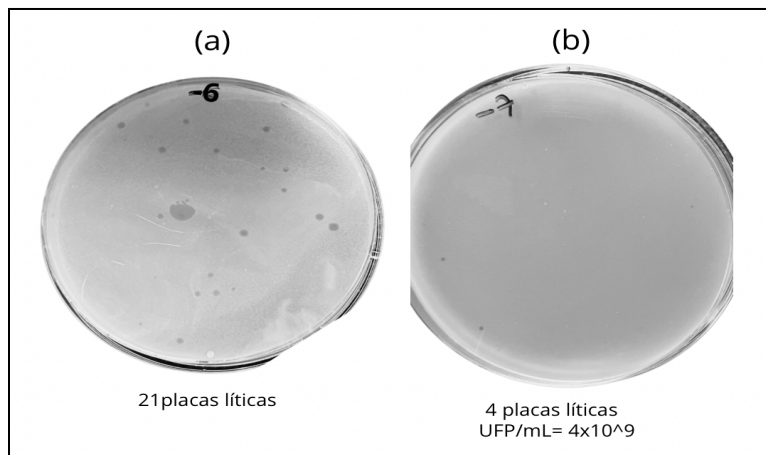


Figura 3. Método doble capa para el $\Phi 52$. (a) dilución 10^{-6} , (b) dilución 10^{-7} .

Se partió inicialmente del $\Phi 52$ a una concentración desconocida, por lo cual se implementó el método de doble capa a las diluciones en la que se observaron placas contables por el método por spot y utilizando la ecuación 1 se determinó que el $\Phi 52$ tenía una concentración de 4×10^9 UFP/mL.

3.2 Determinación de los cambios morfológicos existentes en las placas líticas generadas por el Phago52 en presencia de soluciones de $MgCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2$ y $NaCl$.

Para asegurarse de que la selección de la concentración de las soluciones no inhibiera el crecimiento bacteriano previamente se analizó el tiempo de generación de la cepa cuando el medio contenía las soluciones, y con base a ello se calculó el porcentaje de inhibición.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de *Salmonella* A600nm de 0,254 en presencia de soluciones de MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 y NaCl .

Tratamiento	Porcentaje de inhibición
MgSO_4	37.1%
MgCl_2	37.4%
CaCl_2	22%
NaCl	25%

Los porcentajes de inhibición no fueron significativos, pero teniendo en cuenta que hubo un cambio para el crecimiento de *Salmonella* en el control con respecto al crecimiento cuando fue evaluada con los tratamientos, se disminuyó la concentración de las soluciones de 0,1 M (100 mM) a 0.05 M (50 mM).

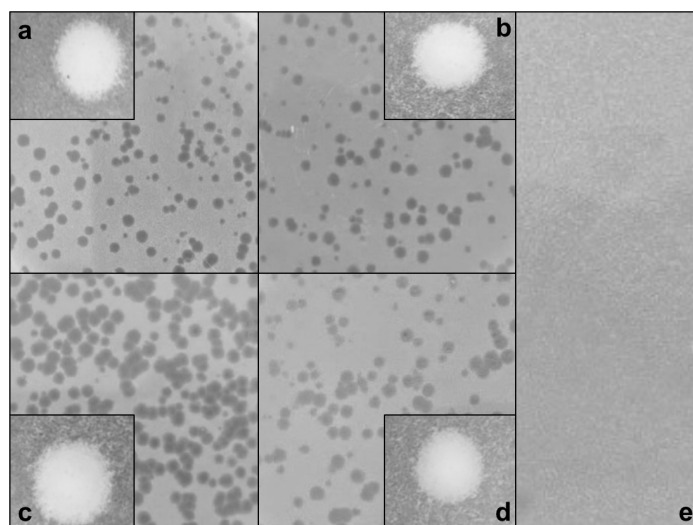


Figura 4. Placas líticas de las soluciones. (a) H_2O (control); (b) 0.05M NaCl ; (c) 0.05M MgSO_4 ; (d) 0.05M MgCl_2 ; (e) 0.05M CaCl_2 .

3.3 Evaluación del efecto de la presencia de MgCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 y NaCl sobre la eficiencia del proceso de obtención del Phago52 a partir de una matriz ambiental sólida.

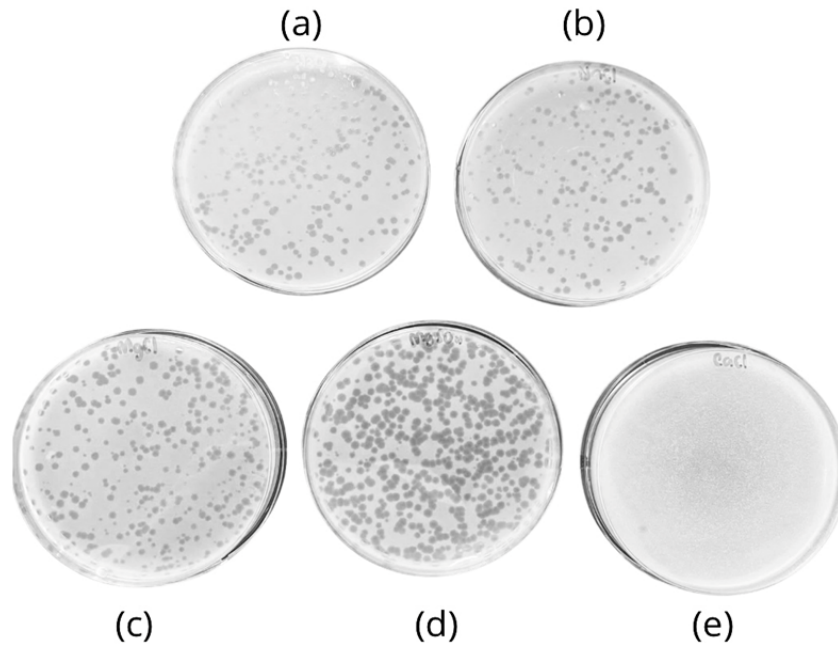


Figura 5. Placas líticas y carga viral de las soluciones en la recuperación del phago52 a partir de una matriz sólida.(a) H₂O (control); (b) 0.05M NaCl; (c) 0.05M MgCl₂; (d) 0.05M MgSO₄; (e) 0.05M CaCl₂.

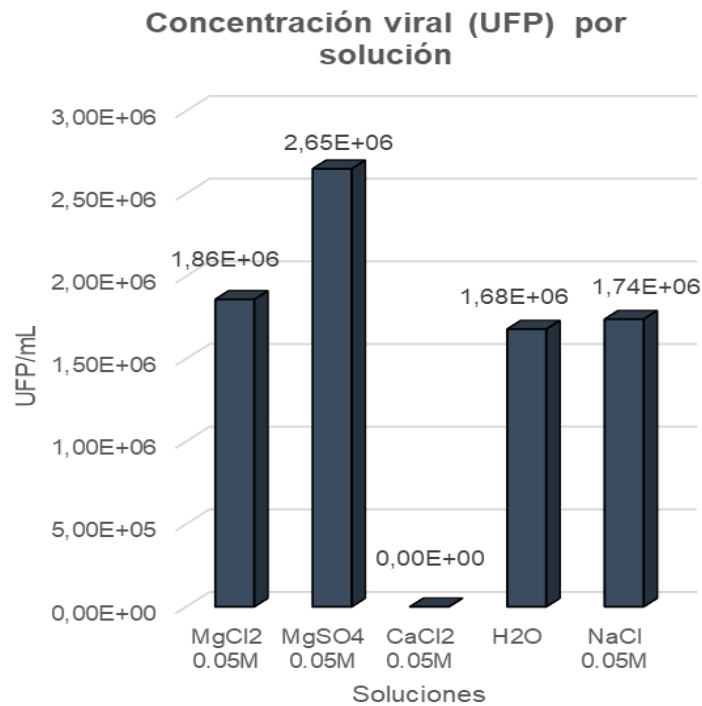


Figura 6. Concentración viral (UFP/mL) para cada una de las soluciones evaluadas.

4. DISCUSIÓN

Los bacteriófagos han sido objeto de investigación para diversas aplicaciones en distintos campos; su capacidad para infectar y matar bacterias específicas ha llevado a su utilización a muchas aplicaciones, principalmente en terapias antibacterianas, conocidas como terapia fágica, donde los bacteriófagos se utilizan para combatir infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos convencionales. Los bacteriófagos también se emplean en la industria alimentaria como agentes de control biológico. Además, actualmente se investiga su uso como conservantes naturales en la prolongación de la vida útil de los alimentos [11]. En el ámbito de la agricultura, los bacteriófagos se están estudiando como una alternativa a los pesticidas químicos [12].

Sin embargo, los estudios generalmente están enfocados en la obtención de los fagos aislados de muestras ambientales en especial muestras hídricas. La mayoría de los estudios que se han realizado incluyen muy poca información sobre factores que puedan hacer más eficiente la obtención de estos organismos. Por esta razón, en este estudio se evaluó el comportamiento de un salmonefago lítico con diversas soluciones compuestas de iones o cofactores de adhesión. Esto, con el fin de determinar si existen cambios significativos en la proliferación del virus, inicialmente se realizó la determinación del título viral del fago 52. Los resultados obtenidos indican que un salmonefago lítico (phago 52) con una concentración viral de 4×10^9 UFP/mL, no presenta variaciones en características macroscópicas de las placas líticas como los bordes, rugosidad, sin embargo pueden presentar variaciones en el tamaño, profundidad, cantidad y estos cambios pueden depender de los iones que se encuentren presentes en la interacción huésped-hospedero.

Según los cambios observados en las placas líticas de cada una de las soluciones evaluadas (figura 4) el Mg^{+2} fue el ion en el cual se visualizaron cambios más favorables para la infección viral, los iones magnesio son importantes para la replicación del material genético del fago. Muchos genomas bacteriófagos tienen ADN bicatenario y la replicación de este ADN requiere la presencia de iones de magnesio como cofactores de las enzimas involucradas en el proceso. La ausencia de iones magnesio puede inhibir la replicación del ADN viral y, en consecuencia, la producción de nuevas partículas virales [13]. Por el contrario de la solución con Ca^{+2} en la cual se observó una inhibición de la infección viral, se conoce que la presencia de Ca^{+2} es crucial para la adhesión del bacteriófago a la superficie de la bacteria hospedera ya que estos iones interactúan con los grupos de carga negativa en la superficie de la bacteria, lo que permite neutralizar estas cargas, posibilitando la adhesión del fago a la célula dando inicio al proceso de infección [14], sin embargo se ha reportado que el $CaCl_2$ puede llegar a poseer actividad antimicrobiana.

Algunos patógenos bacterianos como *P. aeruginosa*, *Salmonella* y *Escherichia coli* pueden alterar los niveles de Ca^{2+} del huésped activando el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y liberando Ca^{2+} de las reservas intracelulares al citosol. Estas interacciones pueden estar mediadas por proteínas asociadas a la superficie bacteriana, y se ha demostrado que tales alteraciones en el Ca^{2+} del huésped facilitan la adherencia bacteriana y la penetración en las células del huésped. Sin embargo, en diferentes especies bacterianas, el Ca^{2+} elevado estimula o reduce la formación de biopelículas [15].

El Ca^{2+} elevado del hospedero puede tener un efecto regulador negativo sobre la virulencia y, por tanto, contribuir a las defensas del huésped. Un ejemplo es la enzima endopoligalacturonasa (PehA), que degrada la pared celular, y que está regulada negativamente por niveles altos de Ca^{2+} en un patógeno vegetal, *Pectobacterium carotovorum*. Esto evita que el patógeno infecte la planta [16].

En el caso de la recuperación de bacteriofagos a partir de una matriz sólida se observa que el valor recuperado es mucho menor que la cantidad agregada inicialmente. El suelo es un complejo donde la biodiversidad y las interacciones entre microorganismos, animales y plantas contribuyen a su vida y funcionamiento óptimo [17]. Los microorganismos, incluidos hongos, arqueas y bacterias, desempeñan un papel clave en la descomposición de la materia orgánica, en los ciclos biogeoquímicos y la disponibilidad de nutrientes para las plantas [18]. Los virus también son entidades biológicas que forman parte de la biodiversidad del suelo con funciones esenciales pero relativamente inexploradas [19].

Desde el inicio de las investigaciones sobre la diversidad viral en los suelos, el conocimiento sobre los virus del suelo se ha ampliado mucho [20]; especialmente en el caso de los bacteriófagos. Los bacteriófagos son omnipresentes en el medio ambiente, sin embargo los bacteriófagos parecen ser más abundantes en los humedales y en los bosques, debido al alto contenido de agua. De hecho, muchos factores abióticos pueden estar involucrados en la distribución, abundancia y diversidad de los bacteriófagos en los suelos, la temperatura y el pH se consideran uno de los factores claves más determinantes [21-22].

Por esta razón, se sugiere que el uso de Mg^{+2} en estudios que involucren como objetivo la obtención de bacteriofagos podría hacer del estudio uno más exitoso, en especial cuando se trata de que la obtención sea a partir de muestras ambientales más complejas como el suelo. Es por ello que el conocer factores que beneficien o incapaciten la replicación viral pueden ser de gran ayuda en investigaciones posteriores.

5. CONCLUSIONES

Iones como el Mg^{+2} , Ca^{+2} y Na^{+} pueden realizar cambios en la proliferación de un bacteriofago lítico infectivo para salmonella, iones como el calcio pueden potencializar el hospedador, mientras que los iones de cloro pueden afectar el crecimiento bacteriano, y por lo tanto verse ineficiente la proliferación viral, en cuanto a los 3 iones evaluados el ion Mg^{2+} es el que más atribuye un cambio benéfico para la infección viral logrando potencializar la obtención del bacteriofago, incluso en muestras complejas como lo es una matriz ambiental sólida.

PERSPECTIVAS

A futuro, se sugiere realizar variaciones en las concentraciones de las soluciones para saber si los cambios son persistentes, o si existen variaciones significativas en estos.

6. AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecerle a Dios y a mi familia, en especial a mi abuela y a mi madre quienes han apoyado incondicionalmente cada etapa de mi vida, además de ser el motor que me permitió enfrentar las adversidades presentes en el transcurso de estos 5 años. Agradezco a la Universidad Santiago de Cali por abrirme sus puertas y permitirme lograr una meta tan importante.

A el MSc. Carlos Aranaga y a la Dra. Aura Falco por compartirme su preciado conocimiento de la forma más excepcional, además de guiar e impulsar mi crecimiento académico y personal.

A todos los docentes con los que he coincidido en mi vida académica por demostrar que cuando las cosas se hacen de corazón todo es posible.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos, compañeros y futuros colegas quienes hicieron de esta etapa una maravillosa, de la cual me llevo múltiples anécdotas y gratas experiencias que guardaré para siempre.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Hernández, R. E., & Castellanos, L. (2014). Uso de los bacteriófagos en el sector agropecuario. Agroecosistemas, 2(2), 361–371.

[2] Reina, J., & Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? Revista Española de Quimioterapia, 31(2), 101. Retrieved from /pmc/articles/PMC6159377/
/pmc/articles/PMC6159377/?report=abstract <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6159377/>

- [3] Flores, I., Escobar, G. (2017). Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos [Tesis Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga]. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
- [4] Segundo-Arizmendi N, Gómez-García J, Flores-Cuevas K, Duque-Montañó B, López-Villegas E, Baltazar-Hernández E, et al. Caracterización parcial del bacteriófago S 1 , lítico contra *Salmonella enterica* , con posible uso farmacéutico. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2017;48
- [5] Mangalea, M. R., & Duerkop, B. A. (2020). Fitness Trade-Offs Resulting from Bacteriophage Resistance Potentiate Synergistic Antibacterial Strategies. *Infection and Immunity*, 88(7). <https://doi.org/10.1128/iai.00926-19>
- [6] Lopez D. Tesis Pregrado “Bacteriofagos como alternativa para eliminar cepas de *Acinetobacter baumannii* resistente a antibioticos presentes en tres hospitales del Ecuador.” *Fac Ciencias Ambient Univ Int Sek.* 2015.
- [7] Farfán, E., J. (2017). Estudio farmacocinético preliminar de la fagoterapia para el control de *Salmonella* spp. en pollos de engorde.
- [8] Clokie MRJ, Kropinski AM, editores. *Bacteriophages: methods and protocols*. Vol. 1; New York: Humana Press; 2009. 307 p
- [9] Barquero, M. S., Jiménez, L. M. C., Jiménez, K. B., & Araya, R. A. (2012). Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Revista Peruana de Biología*, 19(3). <https://doi.org/10.15381/rpb.v19i3.1050>
- [10] Dini, C. (2011). Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). *Universidad Nacional de La Plata*.
- [11] Gabriel Gaviria, A., de María González, S., & Jhon Castaño, O. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5α a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1). <https://doi.org/10.21897/rmvz.253>.
- [12] Sabour, P. M., & Griffiths, M. W. (2010). Chapter 12-Phage-microbial interactions in food and environmental applications. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 71, pp. 263-287). Academic Press.
- [13] Poul, M.A., Marks, H., Karassina, N., Alkhatib, H., & Marazzi, I. (2019). Magnesium and Calcium Ions: Key Players in the Interactions between Bacteriophages and Their Hosts. *Journal of Virology*, 93(22), e00906-19.
- [14] Farfán Esquivel, J. (2017). Estudio farmacocinético preliminar de la fagoterapia para el control de *Salmonella* spp. en pollos de engorde. Uniandes.
- [15] King, M. M., Kayastha, B. B., Franklin, M. J., & Patrauchan, M. A. (2020). Calcium Regulation of Bacterial Virulence. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1131). https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_33
- [16] Alvarez Barragán, H. (2012). *Efecto del manejo nutricional del calcio en la expresión de Botrytis cinérea en flores y tallos de rosa sp.* Universidad Nacional de Colombia.
- [17] Gewirtz AT et al. (2000) *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca²⁺-mediated activation of the NF-κB pathway. *J Clin Invest* 105(1):79–92
- [18] R. D. Ochoa & V. H. Ochoa *Aplicación de microorganismos y sus beneficios en suelos para la producción agrícola..* [online]. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/25714>.

- [19] Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M. I., & Oves, M. (2016). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. In *Microbiological Research* (Vol. 183). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>
- [20] Kimura, M., Jia, Z. J., Nakayama, N., & Asakawa, S. (2008). Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. In *Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 54, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00197.x>
- [21] Williamson, K. E., Fuhrmann, J. J., Wommack, K. E., & Radosevich, M. (2017). Viruses in Soil Ecosystems: An Unknown Quantity Within an Unexplored Territory. *Annual Review of Virology*, 4. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041639>.
- [22] Florent, P., Cauchie, H. M., Herold, M., Jacquet, S., & Ogorzaly, L. (2022). Soil pH, Calcium Content and Bacteria as Major Factors Responsible for the Distribution of the Known Fraction of the DNA Bacteriophage Populations in Soils of Luxembourg. *Microorganisms*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071458>

ANEXO 1: INFORMACIÓN ADICIONAL DEL FORMATO

Tabla 2. Tiempo de generación de *Salmonella* spp.

	HORA			
Tratamiento	Hora 1	Hora 6	Hora 12	Hora 22
Control	0,176 Abs	0,640 Abs	0,850 Abs	1,140 Abs
MgSO₄	0,010 Abs	0,490 Abs	0,650 Abs	0,769 Abs
MgCl₂	0,005 Abs	0,518 Abs	0,630 Abs	0,766 Abs
CaCl₂	0,681 Abs	0,805 Abs	0,828 Abs	0,920 Abs
NaCl	0,001 Abs	0,599 Abs	0,676 Abs	0,887 Abs

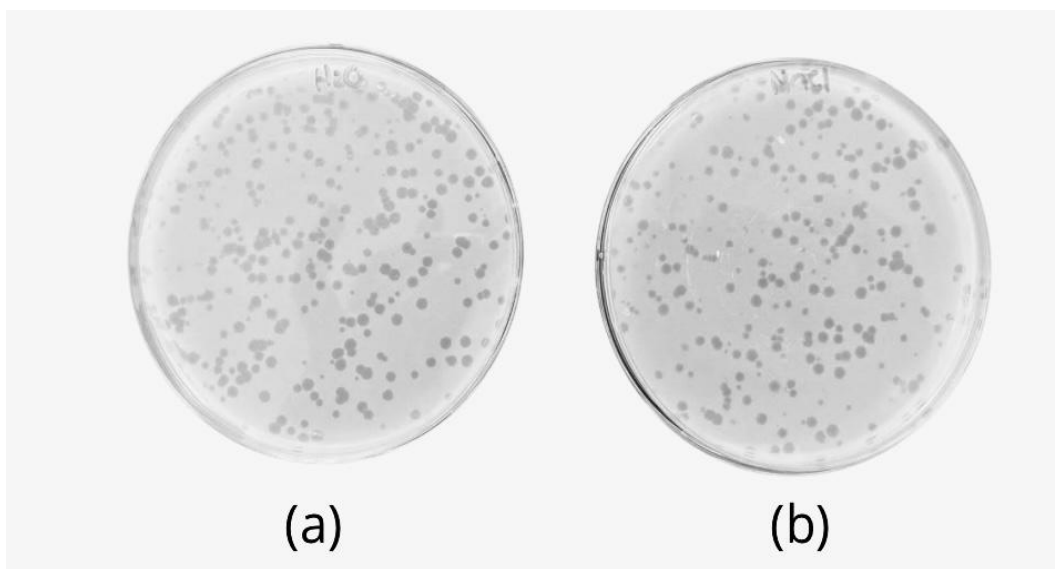


Figura 7. Placas líticas de las soluciones . (a) H₂O (control); (b) 0.05M NaCl

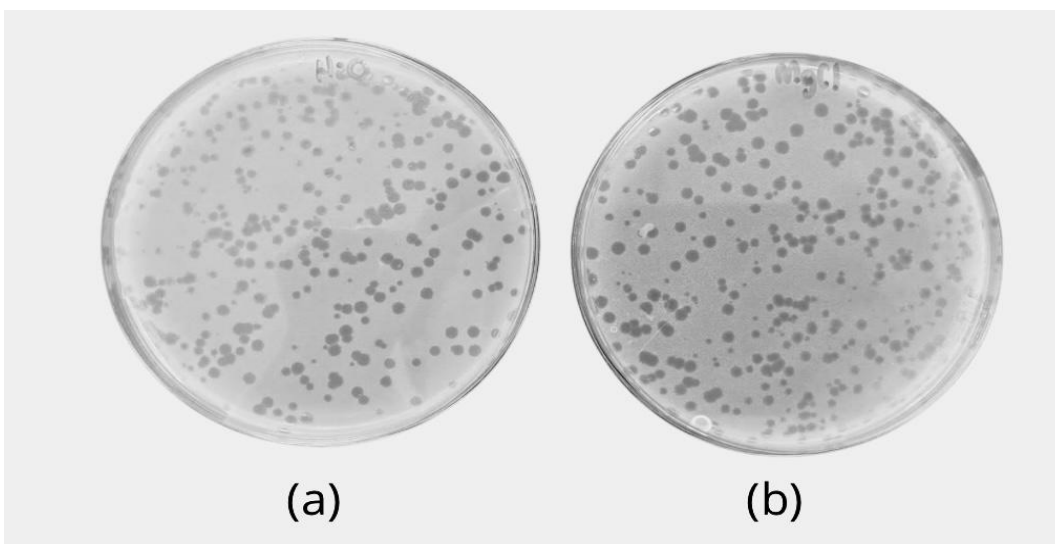


Figura 8. Placas líticas de las soluciones. (a) H₂O (control); (b) 0.05M MgCl₂.

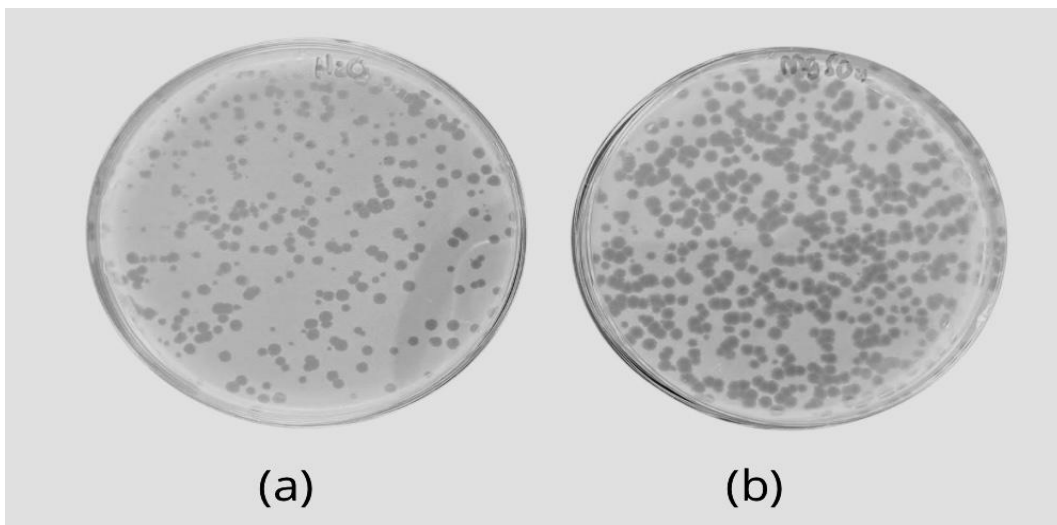


Figura 9. Placas líticas de las soluciones . (a) H_2O (control); (b) 0.05M MgSO_4 .

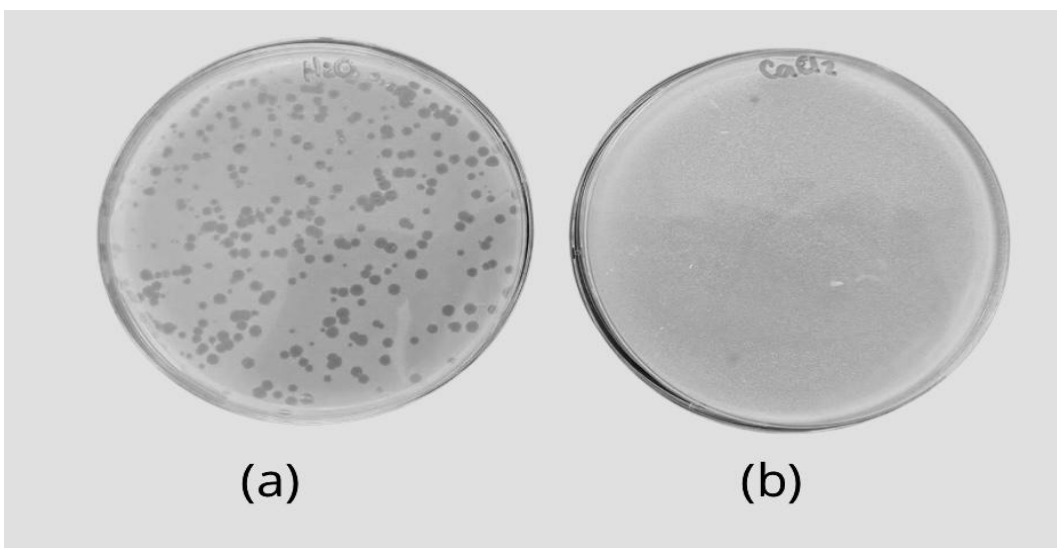


Figura 10. Placas líticas de las soluciones . (a) H_2O (control); (b) 0.05M CaCl_2 .