



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

## **“Encapsulación de fagos en perlas de alginato para el delivery de Fagoterapia en acuicultura contra vibrios”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

Ingeniera en Biotecnología Molecular

**Sergueia Indira Blas Chumacero**

**Director:**

Dr. Jaime Romero Ormazábal

**Patrocinante:**

Dr. Marcelo Baeza Cancino

22 de Mayo, 2023  
Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE CIENCIAS  
AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

**Informe de aprobación seminario de título**

Se informa a la Escuela de Ciencias Ambientales y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la  
Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por

**Sergueia Indira Blas Chumacero**

**“Encapsulación de fagos en perlas de alginato para el delivery de Fagoterapia en  
acuicultura contra vibrios”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para  
optar al Título de

**Ingeniera en Biotecnología Molecular**

**Director Seminario de Título:**

Dr. Jaime Romero Ormazábal

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:**

Dra. Laura Tamayo

**Evaluador:**

Dr. Rafael Opazo

Santiago de Chile, 22 de mayo 2023

## II. BIOGRAFÍA



Nacida el 5 de febrero de 1998 en Perú, se crió solo por dos años en su país natal, para en el 2000 llegar a Chile, país que sería su hogar hasta el día de hoy. Su familia consiste en sus padres, sus hermanos, sus tatas y sus mascotas (sus niños). Aprendiendo que *“de repente encuentras la familia en el corazón y no en la sangre”*.

La noción de su niñez es bastante confusa y ambigua, desde pequeña fue preguntona, muy habladora, y es este sentimiento de querer saber el porqué de las cosas que ha pavimentado su camino por la vida.

Desde niña demostró su amor por la biología, sin embargo, indecisa al escoger a sus cortos años lo que quería ser de “grande”, entre ser doctora para cuidar a los demás o veterinaria por su eterno amor a los animales, nunca encontró lo que realmente le apasionaba.

Finalmente, a la edad de 13 años, conoció a quien la guiaría por un camino más científico. A los 17 años decidió la carrera que quería por el nombre extravagante, y aunque todavía su camino en la vida le parece abstracto, tiene pocos arrepentimientos de su decisión, conservando aquel espíritu de niña, que aún se interesa en el porqué de las cosas.

En el presente, después de una pandemia, sigue soñando en grande, a veces muy utópicamente, pero *“el futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños”*.

### III. AGRADECIMIENTOS

En este punto de mi vida, quisiera agradecer a todas las personas que guiaron el camino en mi formación profesional, y que me alentaron de diferentes formas a perseguir mis sueños y a tener fe en mí.

Agradezco al Dr. Jaime Romero Ormazábal, por brindarme la instancia de poder crecer profesionalmente y expandir mis conocimientos junto al equipo del Laboratorio de Biotecnología del INTA, cuyo Proyecto Fondecyt Cód. 1200523, permitió el financiamiento del presente estudio.

Doy gracias a mis docentes, especialmente a mi profesora de enseñanza básica, la profesora Norma Cecilia, aquella docente que me inspiró y guío por el camino de la biología, al permitirme ser curiosa y preguntar el porqué de las cosas.

Gracias a las niñas del lab, nada hubiese sido posible sin ustedes. Gracias Vicky por escucharme siempre, por alentarme y enseñarme muchas cosas que hoy sé, gracias por darle ese toque materno a una experiencia inolvidable.

Gracias a mi familia, a mis padres Úrsula y Roberto, a mis hermanos Mely, Miguel, Victoria, Tito y Yuri. A mi minizoológico de mascotas en casa. Gracias a mi Kekita, y a mi Tata ustedes llenaron ese vacío de un amor de abuelos que creí ya olvidado y gracias Frank por soportarme en cada reunión familiar. Son parte de mi alma, su amor y apoyo es todo para mí.

Finalmente, pero no menos importante gracias a mis amigas y amigos, por los momentos vividos, y por los años compartidos en esta carrera que parecía no terminar nunca, las quiero mucho Lou y Maca. Una mención especial a mi mejor amigo, Junior, te quiero mil.

## IV. ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Acuicultura: Especies producidas en Chile y problemáticas asociadas .....	1
1.2.	Enfermedades asociadas a los cultivos: Vibriosis.....	4
1.2.1.	Vibrio alginolyticus .....	5
1.3.	Estrategias de control de enfermedades: Problema de resistencia a antibióticos .....	6
1.4.	Nuevo enfoque contra bacterias resistentes: Fagos como agentes terapéuticos (Fagoterapia) ....	8
1.4.1.	Consideraciones biológicas.....	9
1.4.2.	Pros y contras de la Fagoterapia y antibióticos .....	10
1.5.	Estabilidad de los fagos .....	12
1.6.	Encapsulación de fagos: Perlas de alginato .....	13
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1.	Modelo de estudio: Cepa GV09 ( <i>Vibrio alginolyticus</i> ) .....	16
3.2.	Cinética de crecimiento cepa hospedera .....	16
3.3.	Bacteriófagos aislados desde chorito y caracol.....	17
3.3.1.	Enriquecimiento (propagación) de fagos y titulación .....	17
3.4.	Caracterización de bacteriófagos .....	18
3.4.1.	Rango hospedero y EOP (eficiencia de plaqueo).....	19
3.4.2.	Curva de adsorción .....	19
3.4.3.	Curva One Step y Burst Size.....	20
3.4.4.	Extracción y purificación de DNA viral .....	21
3.4.5.	DGREA.....	22
3.4.6.	Curva de cinética de infección .....	23
3.5.	Encapsulación de fago en perlas de alginato .....	23

3.6.	Difusión del fago encapsulado.....	25
3.7.	Almacenamiento y estabilidad de las perlas de alginato/fago .....	25
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1.	Curva de calibración cepa GV09: Estandarización de biomasa y fases de crecimiento .....	26
4.2.	Fagos que infectan la cepa GV09 ( <i>Host range</i> ).....	27
4.3.	Eficiencia de plaqueo (EOP).....	29
4.4.	Curva de adsorción .....	30
4.5.	Curva One Step y Burst Size .....	32
4.6.	Extracción de DNA: Cuantificación y cualificación del DNA viral .....	34
4.7.	DGREA: Huella dactilar fagos Ch20 y Ca8 .....	36
4.8.	Curva de infección fago Ch20 .....	37
4.9.	Difusión de fagos encapsulados en perlas de alginato .....	40
4.10.	Estabilidad de los fagos encapsulados .....	42
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN Y PROYECCIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>

## V. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Variedad de especies producidas en Chile 2021 (FAO, 2022) .....	<b>2</b>
<b>Tabla 2.</b>	Pros, contras y similitudes de la Fagoterapia en comparación con la terapia con antibióticos. (Doss, 2017).....	<b>11</b>
<b>Tabla 3.</b>	Fagos aislados de muestras de Chorito y Caracol. ....	<b>17</b>
<b>Tabla 4.</b>	Clasificación esquemática del spot a causa de la lisis producida por el bacteriófago en la cepa.....	<b>27</b>
<b>Tabla 5.</b>	Resultados del rango hospedero.....	<b>28</b>
<b>Tabla 6.</b>	Valores de EOP y títulos obtenidos. ....	<b>29</b>
<b>Tabla 7.</b>	Datos obtenidos de la cuantificación de DNA mediante TECAN spark NanoQuant plate.....	<b>34</b>
<b>Tabla 8.</b>	Características físicas de las perlas de alginato a diferentes % finales .....	<b>41</b>

## VI. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo de infección por fagos líticos.....	10
<b>Figura 2.</b>	Estructura molecular de alginato de sodio (a), y la interacción entre los cationes de calcio y el oxígeno del ácido Gulurónico (b). .....	14
<b>Figura 3.</b>	Esquema representativo del Burst size, y la ecuación para obtener el número de viriones liberados por bacteria. ....	21
<b>Figura 4.</b>	Diagrama representativo de la encapsulación de fagos en perlas de alginato.....	24
<b>Figura 5.</b>	Curva de crecimiento de la cepa GV09 ( <i>V. Alginolitycus</i> ). ....	26
<b>Figura 6.</b>	Spot de lisis de los bacteriófagos sobre un césped de la cepa GV09.....	28
<b>Figura 7.</b>	Curvas de adsorción fago Ch20 y fago Ca8.....	31
<b>Figura 8.</b>	Curva One step del fago Ch20 y fago Ca8.....	33
<b>Figura 9.</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los genomas de los fagos Ch20 y Ca8. Marcador de peso molecular $\lambda$ <i>HindIII</i> . ....	35
<b>Figura 10.</b>	Patrones de restricción de los genomas de los bacteriófagos Ch20 y Ca8. Análisis DGREA obtenido con la endonucleasa <i>Taq I</i> . Ld corresponde al marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. ....	36
<b>Figura 11.</b>	Curva de infección fago Ch20. Relación de las absorbancias del control vs de la cepa infectada con el fago Ch20.....	38
<b>Figura 12.</b>	Representación gráfica de la disminución de concentración representada.....	39
<b>Figura 13.</b>	Cinética de infección fago Ch20 para con la cepa GV09. ....	40
<b>Figura 14.</b>	Curva de difusión del fago encapsulado a diferentes % de alginato. ....	41
<b>Figura 15.</b>	Curva de estabilidad del fago Ch20 sin encapsular a diferentes temperaturas	

(4, -20, -80°C) de almacenamiento. ....	42
<b>Figura 16.</b> Curva de estabilidad del fago Ch20 encapsulado a diferentes temperaturas (4, -20, -80°C) de almacenamiento .....	43

## VII. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ON</b>	Over night, incubación de un cultivo por toda la noche
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>DGREA</b>	direct genome restriction enzyme analysis
<b>EOP</b>	Eficiencia de plaqueo
<b>MOI</b>	Multiple of infection (multiplicidad de infección)
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placa
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>Bp</b>	Pares de bases
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>DNAbc</b>	DNA bicatenario
<b>OD</b>	Densidad óptica
<b>UCN</b>	Universidad católica del norte
<b>LBAMS</b>	Medio de cultivo (para un litro de medio: Triptona 0,1%(m/v), Extracto de levadura 0,05%(m/v), MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1,2%(m/v), NaCl 1,25%(m/v), KCl 0,015%(m/v), CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,014%(m/v).

## RESUMEN

La acuicultura en Chile es una industria importante y en constante crecimiento, contando con múltiples especies acuáticas como productos. Sin embargo, uno de los desafíos que enfrenta la acuicultura es el control de enfermedades que afectan a los organismos cultivados; donde la vibriosis es una de las enfermedades bacterianas, más recurrentes, especialmente en etapas larvales. El *Vibrio alginolyticus* es un *Vibrio* que afecta a un rango amplio de huéspedes en la acuicultura en Chile, especialmente en condiciones de altas densidades de cultivo y contaminación por residuos orgánicos. Actualmente, el manejo de la vibriosis y otras infecciones bacterianas, se basan en el control de ambientes y uso frecuente de antibióticos. Sin embargo, el uso excesivo de estos últimos ha derivado al aumento en la frecuencia de selección de bacterias resistentes, incentivando un impulso a la generación de estrategias alternativas. La Fagoterapia ha ganado un renovado interés, con el uso de bacteriófagos como agentes para el control de bacterias patógenas, por su capacidad de infectar y lisar a las bacterias hospederas específicas. No obstante, la susceptibilidad de los fagos a agentes externos entorpece el desarrollo de esta técnica como terapia antibacteriana al presentar desventajas al administrar y almacenar los bacteriófagos.

En el presente estudio se tuvo por objetivo diseñar perlas de alginato para el delivery de fagos contra vibrios en acuicultura. Para poder completar esta meta, se comenzó con la caracterización de los fagos previamente aislados en el laboratorio de Biotecnología del INTA. Se contó con 8 fagos que presentaban la capacidad de lisar a

la cepa patógena GV09 (*V. alginolyticus*), donde solo 2 de los 8 fagos resultaron como altamente virulentos por su EOP. Estos fueron los fagos Ch20 y Ca8 que presentaron una caracterización muy similar, lisis transparentes, DNA bicatenario, además de similares tiempos de adsorción y latencia. Sin embargo, un análisis DGREA reveló que los fagos son genéticamente diferentes.

Luego se procedió con el análisis de cinética de infección del fago con un mayor Burst Size, definido como el número de viriones liberados por bacteria infectada, correspondiente al fago Ch20. Donde se observó una reducción del crecimiento bacteriano mediante absorbancia y recuento de UFC/ml.

Finalmente se encapsuló el fago bajo 3 condiciones de % final de alginato (% v/v) en solución para determinar el % que permitiese la mayor tasa de difusión del fago al medio. Como resultado las perlas al 2% final de alginato (% v/v) en solución presentaron una mayor tasa de difusión tras 5 horas de ensayo con respecto a las perlas al 3%. Por lo tanto, se seleccionaron las perlas al 2% para determinar la viabilidad del fago bajo distintas condiciones de almacenamiento, con respecto a la temperatura usada.

Obteniéndose dentro de los primeros 15 días una mejor estabilidad del fago encapsulado a 4 °C, y para el caso del fago no encapsulado, después de 30 días de almacenamiento, este presentó una mejor estabilidad de su título a -80°C. Por lo que los resultados muestran el potencial de la encapsulación de fagos en perlas de alginato para el delivery y almacenamiento de fagos en acuicultura.

## ABSTRACT

Aquaculture in Chile is an important and constantly growing industry, with multiple aquatic species as a product. However, one of the challenges facing aquaculture is the control of diseases affecting cultured organisms, where vibriosis is one of the most recurrent bacterial diseases, especially in larval stages. *Vibrio alginolyticus* is a *Vibrio* that affects a wide range of hosts in aquaculture in Chile, especially in conditions of high culture densities and contamination by organic waste. Currently, the management of vibriosis and other bacterial infections is based on environmental control and frequent use of antibiotics. However, the excessive use of antibiotics has led to an increase in the frequency of selection of resistant bacteria, encouraging the generation of alternative strategies. Phage therapy has gained renewed interest, with the use of bacteriophages as agents for the control of pathogenic bacteria, due to their ability to infect and lyse specific host bacteria. However, the susceptibility of phages to external agents hinders the development of this technique as an antibacterial therapy by presenting disadvantages when administering and storing bacteriophages.

The objective of the present study was to design alginate beads for the delivery of phages against vibrios in aquaculture. In order to complete this goal, we started with the characterization of the phages previously isolated in the Biotechnology laboratory of INTA. There were 8 phages with the ability to lyse the pathogenic strain GV09 (*V. alginolyticus*), where only 2 of the 8 phages were found to be highly virulent due to their EOP. These were the phages Ch20 and Ca8 that presented very similar characterization, transparent lysis, double-stranded DNA, as well as similar adsorption

and latency times. However, a DGREA analysis revealed that the phages are genetically different.

Then we proceeded with the analysis of infection kinetics of the phage with a higher Burst Size, defined as the number of virions released per infected bacterium, corresponding to phage Ch20. A reduction of bacterial growth was observed by absorbance and CFU/ml count.

Finally, the phage was encapsulated under 3 conditions of final % of alginate (% v/v) in solution to determine the % that allowed the highest rate of phage diffusion to the medium. As a result, the beads at 2% final alginate (% v/v) in solution presented a higher rate of diffusion after 5 hours of testing with respect to the beads at 3%. Therefore, the 2% beads were selected to determine the viability of the phage under different storage conditions, with respect to the temperature used.

A better stability of the encapsulated phage was obtained within the first 15 days at 4 °C, and in the case of the non-encapsulated phages, after 30 days of storage, it presented a better stability of its titer at -80 °C. Therefore, the results show the potential of phage encapsulation in alginate beads for phage delivery and storage in aquaculture.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Acuicultura: Especies producidas en Chile y problemáticas asociadas

Según la FAO (2022), la producción de peces, algas y mariscos por pesca de captura se ha mantenido más o menos estable desde la década de los 80, mientras que la producción de alimentos por parte de la acuicultura ha aumentado, casi de la misma manera que el consumo de productos marinos en todo el mundo. La acuicultura en Chile presenta una actividad económica importante, tanto así, que el país es reconocido a nivel mundial como uno de los principales productores y exportadores de productos acuícolas. Este sector en Chile ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, donde destaca la producción de salmónidos, posicionándose como el segundo productor a nivel mundial (Salmon Atlántico, Salmon Coho y Trucha Arcoíris) justo después de Noruega, concentrando el 28% de la producción en 2021; con una producción de 978.273 toneladas (Consejo del salmon, 2022; Sernapesca, 2021). Siendo uno de los sectores económicos con mayor actividad relacionada al desarrollo de mercados nacionales e internacionales (O'ryan & pereira, 2015; FAO, 2022).

Si bien la acuicultura en Chile es representativa por la producción de salmónidos a nivel mundial, esta está constituida por una amplia gama de otras especies de peces, además de destacarse como un importante productor de abulón, trucha y algas, entre otros (Tabla 1). Productos que presentan una demanda creciente en los mercados

internacionales contribuyendo aún más a un mejor desarrollo del sector económico del país (Subpesca, 2022).

**Tabla 1. Variedad de especies producidas en Chile 2021 (FAO, 2022)**

<b>Especie</b>	<b>Unidades (Toneladas - peso vivo)</b>
Salmón del Atlántico	724835
Chorito	424294
Salmón plateado	212720
Trucha arco iris	56520
Gracilarias	15565
Ostión abanico	3890
[Spirulina maxima]	1361
Abulón colorado	1122
Choro	833
Cholga	722
Salmón plateado	479
Salmón del Atlántico	445
Ostra chilena	398
Trucha arco iris	136
Ostión japonés	79
[Haematococcus]	72
Salmón real	23
Medregal rabo	8
Esturión del Danube	7
Corvina pampera	3
Luga negra o crespá	3
Abulón japonés	2
Cochayuyo	2
Gigartina de	1
<b>Total (Toneladas - peso vivo)</b>	<b>1443520</b>

La producción de estas especies en acuicultura se realiza en centros de cultivo que reproducen parcialmente las condiciones de desarrollo del ambiente natural de las especies en cuestión, la cual requiere principalmente de bordes costeros estratégicos. En la acuicultura chilena, una diversidad de especies (chorito, ostión, ostra, etc.), presenta en su crecimiento fase larval, la cual representa una fase crucial en su cultivo. Durante esta etapa de su ciclo de vida, las larvas son especialmente susceptibles a diversas infecciones y problemáticas. Por lo que, para mantener las condiciones favorables y así permitir el cultivo de estas especies, se recurre al uso de múltiples estrategias, principalmente para prevenir y controlar distintos patógenos, ya que son una amenaza constante para la tasa de producción de los cultivos. De esta forma maximizan la sobrevivencia al controlar los ciclos de vida, su alimentación y condiciones de salud (Estay & Chávez, 2015).

Sin embargo, este uso indiscriminado de recursos naturales y estrategias de tratamiento de enfermedades, según estudios anteriores, ha generado un impacto en áreas como, la calidad del agua, al deteriorarla por los residuos orgánicos e inorgánicos que dejan los cultivos, y en la transmisión de enfermedades e infecciones. (Sepúlveda, 2013; Lozano-Muñoz I, 2021).

En pocas palabras, las diversas condiciones artificiales del medio ambiente en sistemas de cultivo, la alimentación y los residuos orgánicos de los cultivos pueden constituirse como un espacio propicio de proliferación de diversas enfermedades y patógenos, donde se destaca principalmente la vibriosis. (Rojas, y otros, 2021; Leyton & Riquelme, 2008).

## 1.2. Enfermedades asociadas a los cultivos: Vibriosis

La acuicultura en Chile ha presentado una serie de enfermedades asociadas que afectan a los organismos. Algunas de las enfermedades más frecuentes presentes en los cultivos son la Vibriosis, Yesiniosis, infecciones por hongos y parásitos (Fuentes, 2022). Afectando la mayoría de estas patologías a los estados larvales de los cultivos. Es importante destacar, las enfermedades asociadas a los cultivos no están limitadas solo a las fases larvarias, pueden afectar a diferentes etapas de desarrollo, sin embargo, en fase larval es donde son más susceptibles (de la Fuente, 2015).

Destacándose entre estas enfermedades, se encuentra la Vibriosis, la cual es una de las enfermedades más frecuentes y latentes en los criaderos de acuicultura Chile, y en el mundo. Causada por familia *vibrionaceae* la cual es compuesta por gama-Proto bacterias Gram negativas, presente en ambientes marinos (Pérez-Reytor D, 2017). Esta enfermedad es causada por algunas especies de *Vibrio* de los cuales diversos estudios los señalan como abundantes en el ecosistema marino. En la actualidad se han aislados diferentes especies del género *Vibrio* en territorio nacional, tales como: *Vibrio tubiashii*, *Vibrio bivalvicida* en ostiones (*Argopecten sp*) (Rojas R. M., 2015), *Vibrio toranzoniae* en congrio (*Genypterus chilensis*) (Lasa, 2015), *Vibrio parahaemolyticus* en choritos (*Mytilus chilensis*) (Bacian, 2021), etc.

El proceso de infección de estas bacterias patogénicas (vibriosis) regula una serie de factores de virulencia, permitiendo así el invadir y sobrevivir en el hospedero, donde finalmente se adaptan a las condiciones ambientales donde esté el hospedero (Porcheron & Dozois, 2015). Son patógenos que tienen una amplia gama de hospederos y ambientes favorables para su patogenicidad, van desde peces,

crustáceos, algas, incluso se han descrito vibrios de vida libre; y desde agua salada hasta agua dulce. Caracterizándose así, el género *Vibrio* como el más abundante y diverso; siendo uno de los causantes de la mayor cantidad de infecciones por bacterias marinas a nivel mundial (Baker-Austin, 2018).

### **1.2.1. *Vibrio alginolyticus***

Un ejemplo actual, es *V. alginolyticus*, el cual es parte de los microorganismos más frecuentes de los ambientes marinos, no solo presentes en Chile, ya que su distribución es mundial.

Se presenta en diversos organismos marinos como peces, bivalvos, corales, entre otros. Es un bacilo Gram negativo, móvil por flagelos laterales (LAF) y polares (POF), presentando el fenómeno de Swarmin. Cuando está en medios líquidos se desarrolla el flagelo POF, mientras que cuando es transferida a un medio sólido el flagelo LAF se expresa y la célula se elonga lo cual le permite moverse y expandirse por toda la superficie (Atsumi, 1996). Este grupo *Vibrio* es el más halófilo de todos, llegando a crecer en concentraciones de hasta un 10% de NaCl. Como fuente de carbono utiliza glucosa, y sales biliares como fuente de nitrógeno (Moreno, 2005).

En la actualidad, más y más estudios lo señalan como un potencial riesgo, en peces, por ejemplo, la vibriosis inducida por esta cepa, demuestra una alta mortalidad relacionada a hinchazón abdominal; causa además septicemia, hemorragias,

ulceras en la piel, hígados hemorrágicos y acumulación de líquidos en la zona peritoneal (Costa C, 2022; Balebona MC, 1998). Por ejemplo, se ha reportado por Platt en la década del 95' (The role of chitin in the thermoprotection of *Vibrio cholerae*), que junto a otras especies de vibrios, *V. alginolyticus* son responsables de ocasionar muerte larval de bivalvos, debido a un estado de estrés del hospedero, lo que da una respuesta neuroendocrina induciendo a la liberación de hierro el cual es un elemento importante para la reproducción y proliferación de los vibrios. Las larvas infectadas por este *Vibrio* pueden presentar una serie de síntomas, en los cuales se incluye, un retraso del crecimiento, afectando al desarrollo en posteriores ciclos de vida; deformaciones y con mayor probabilidad una alta tasa de mortalidad. Las infecciones no solo se limitan a los cultivos marinos, sino que infecta a humanos, causando desde gastroenteritis hasta otitis y septicemia (Wang J, 2021). Representando una amenaza para la salud humana y causante de múltiples infecciones que afectan a la industria acuícola (Zheng HY, 2021; Citi BE, 2015).

### **1.3. Estrategias de control de enfermedades: Problema de resistencia a antibióticos**

La estrategia principal para controlar los brotes de infecciones bacterianas por *Vibriosis*, y en general, en los cultivos acuícolas consiste básicamente en el uso de antibióticos y químicos convencionales. En acuicultura se utilizan a menudo productos químicos que contienen metales tales como el Cobre (Cu), su función consta de ser un

antiincrustante para las jaulas y como control químico de parásitos (Schlenk D., 1998; Pavón A, 2022). Pero la estrategia principal para el control de los cultivos acuícolas es el uso de antibióticos.

Los antibióticos son fármacos antibacterianos usados para matar o inhibir la propagación de patógenos bacterianos. Son usados frecuentemente en acuicultura, incluyendo diferentes tipos como: tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicoles,  $\beta$ -lactámicos, nitrofuranos, lincosamidas y polimixinas (Sun R, 2020). El uso y la cantidad de antibióticos en la acuicultura varían mucho entre los países. Chile se sitúa en el segundo lugar como país con más antibióticos autorizados, justo después de Corea del sur, siendo los más usados Oxitetraciclina, el Florfenicol y la Sulfadiazina (Lulijwa R, 2020; Preena PG, 2020; Miranda, 2018).

Por su lado el uso de químicos con metales, como los que contienen Cu (Sulfato de cobre) como principio activo, las jaulas o los ambientes artificiales que presentan aleaciones de cobre como estrategia antimicrobiana, generan frecuentemente concentraciones de metales en el agua y sedimentos, que junto a los antibióticos aumentan la probabilidad de selección de resistencia y mutación en los patógenos bacterianos presentes en los cultivos (Banquero F., 2008; Watts JEM, 2017). Causando finalmente un daño para la salud humana y la polución ambiental (Pavón A, 2022).

Si bien la terapia con antibióticos es lo más usado para controlar enfermedades bacterianas, como la vibriosis en la acuicultura, el uso prolongado de estos en

acuicultura aumenta notoriamente la selectividad en las poblaciones de bacterias. Los antibióticos al ser relativamente estables y no biodegradables, pueden dejar residuos en los productos acuícolas que fueron tratados, ampliando la tasa de transferencia horizontal de genes (Gullberg E., 2011). Siendo catalogados como uno de los más importantes tipos de contaminantes emergentes (Sodhi, 2021).

Las infecciones por bacterias multirresistentes se han convertido en una amenaza. Esto conlleva que la efectividad de esta estrategia haya disminuido con el tiempo, principalmente por el aumento de la frecuencia de estas. Por lo que la búsqueda de terapias alternativas o nuevas es crucial (Concha, 2021; García, y otros, 2019; Buschmann, 2012).

#### **1.4. Nuevo enfoque contra bacterias resistentes: Fagos como agentes terapéuticos (Fagoterapia)**

Actualmente, la prevalencia de bacterias multirresistentes a las estrategias convencionales, contaminación del medio ambiente, escasez de desarrollo de nuevos antibióticos y la prevalencia de demanda de productos libres de pesticidas, ha llevado a la búsqueda de nuevas estrategias contra enfermedades bacterianas (Svircev, 2018).

Un enfoque renovado de las estrategias convencionales es el uso terapéutico de bacteriófagos, latentes agentes bactericidas ya que infectan exclusivamente bacterias (Pires DP, 2016). Este enfoque de Fagoterapia en la actualidad ha retomado protagonismo, debido a la capacidad de caracterizar y probar fagos como terapias

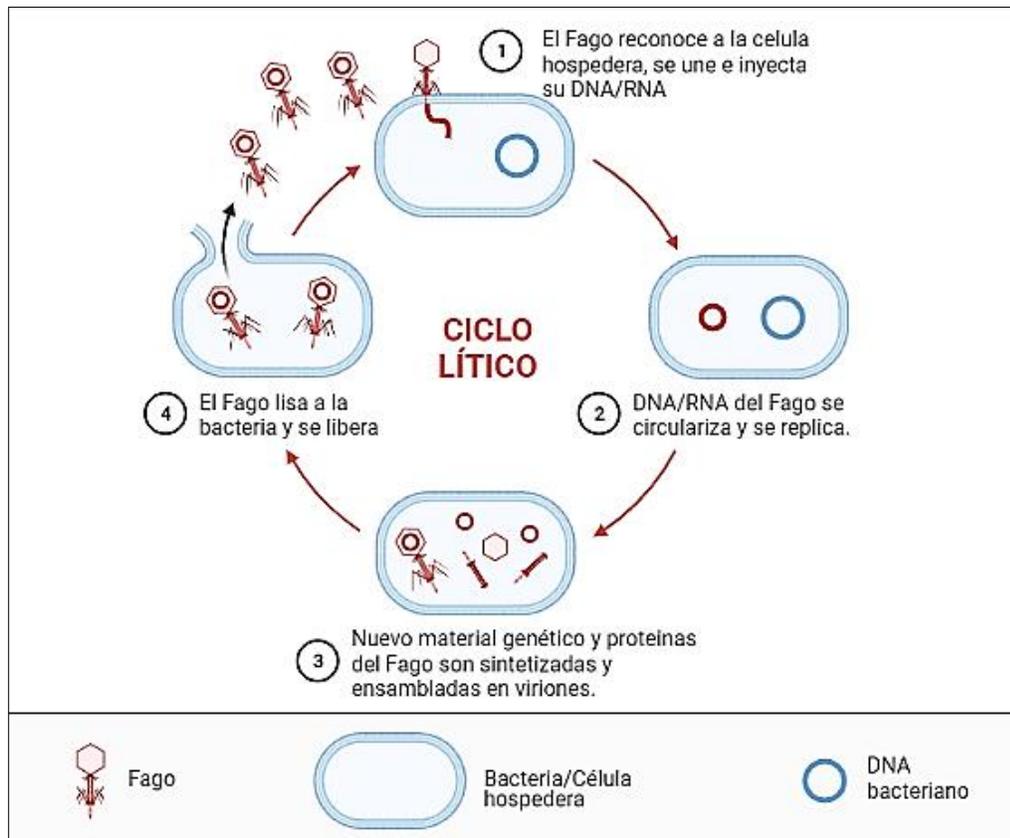
antibacterianas, además de la extrema biodiversidad de fagos presentes en la naturaleza. (Wasik & Turner, 2013; Kortright KE, 2019).

Los fagos replican su material genético en las células bacterianas, esto destaca un beneficio de la terapia con fagos, como señala Kortright (2019) *“utilizar virus líticos como "medicamentos" amplificadores que atacan y matan a las células susceptibles puede ser más eficiente que aplicar antibióticos que no pueden auto amplificarse”*.

#### **1.4.1. Consideraciones biológicas**

Los requisitos mínimos que se sugieren para el uso terapéutico de los fagos son el uso de Fagos estrictamente líticos, Deben ser altamente infectivos (amplio rango hospedero) y que presenten actividades antimicrobianas demostradas contra el patógeno objetivo. Tiempos de latencia cortos y un alto número de viriones liberados por célula infectada también son características favorables (Burst size) (Gordillo & Barr, 2019; Middelboe M., 2010).

Durante el ciclo de infección lítica (Fig. 1.), los fagos reconocen la superficie de la célula bacteriana con alta especificidad (Adsorción); el fago entrega su material genético ya sea DNA o RNA al hospedero; el material genético lineal del fago se circulariza y se replica en el citosol hasta que las proteínas codificadas por los fagos se activen para lisar la bacteria. Finalmente rompen la célula y liberan su progenie, que infectarán nuevas células bacterianas reiniciando el ciclo, aumentando el número de fagos de forma exponencial (Prada-Peñaranda, 2014).



**Figura 1. Ciclo de infección por fagos líticos.**

### 1.4.2. Pros y contras de la Fagoterapia y antibióticos

Si bien los fagos no son organismos vivos, presentan un dinamismo que le permite ser un agente antibacteriano, especialmente los cuales presentan un ciclo lítico. Por otro lado, los antibióticos son sustancias químicas que alteran distintos procesos fisiológicos hasta llevar a la bacteria a la muerte. Es por esto que se realiza una comparación entre fagos y antibióticos (Tabla 2), y poder determinar qué tan diferentes o similares pueden ser en su mecanismo de acción (Gordillo & Barr, 2019).

**Tabla 2. Pros, contras y similitudes de la Fagoterapia en comparación con la terapia con antibióticos. (Doss, 2017).**

Pros	Contra	Similitudes
Son altamente específicos, por lo que no interrumpen con la microbiota del organismo que se esté tratando.	Esta especificidad también se considera una desventaja, puesto que se debe identificar el agente específico de cada patología.	La actividad contra los patógenos está influenciada por el sistema inmunológico del hospedero.
La resistencia a fagos se desarrolla más lenta que a antibióticos.	Lábiles a distintos agentes externo.	Su efectividad se ve alterada por pH, UV y temperatura.
Una vez que la bacteria se lisa deja de replicar su material genético.	Espectro de acción estrecho y limitado.	Ocurrencia de resistencia bacteriana.
La replicación exponencial le permite administrar dosis menores.	Decaimiento del título en el tiempo.	Ausencia de un marco regulatorio en materia de propiedad intelectual

A pesar de todas las ventajas que presenta la terapia basada en fagos, hay desventajas que hacen que el desarrollo de esta técnica se vea dificultado, especialmente la estabilidad limitada de los fagos en solución y a la caída del título que experimentan durante el procesamiento y el almacenamiento. Lo que la convierte en una terapia deficiente como tratamiento antimicrobiano (Malik DJ, 2017).

### **1.5. Estabilidad de los fagos**

Por lo general, los fagos se aíslan de muestras ambientales, se analizan contra cepas bacterianas patógenas, para determinar su rango hospedero, todo esto en ensayos *in vitro*. Los fagos generalmente se enriquecen, al cultivar la bacteria hospedera hasta la fase de crecimiento logarítmico. Se infecta el cultivo con el fago, este se absorbe, replica y lisa a la bacteria para liberar los viriones de fago. Este proceso de enriquecimiento constantemente está en constante proceso, gracias al ciclo lítico (Malik DJ, 2017).

*In vitro* los fagos, post enriquecimiento y purificación, pueden volver a suspenderse en soluciones tampón y almacenarse en frío. Pero es en este proceso de pausa, donde los fagos no tienen a su hospedero, y su estabilidad y título decaen notoriamente.

Para mejorar la estabilidad de los fagos se puede recurrir a diversas estrategias como, suspensiones a base de agua, liofilización, secado por aspersion y encapsulación (J. Colom, 2017). Sin embargo, los fagos al ser lábiles a diferentes agentes externos son susceptibles a estrategias como lo es el secado por aspersion o liofilización, causando una posible denaturación. Por lo que, la encapsulación es una de las técnicas más prometedoras.

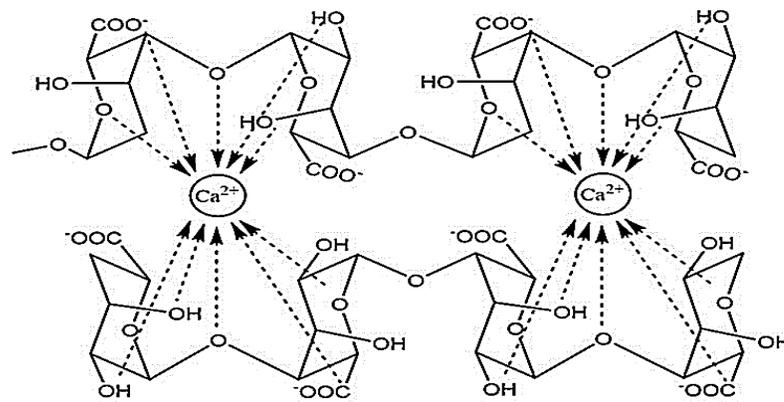
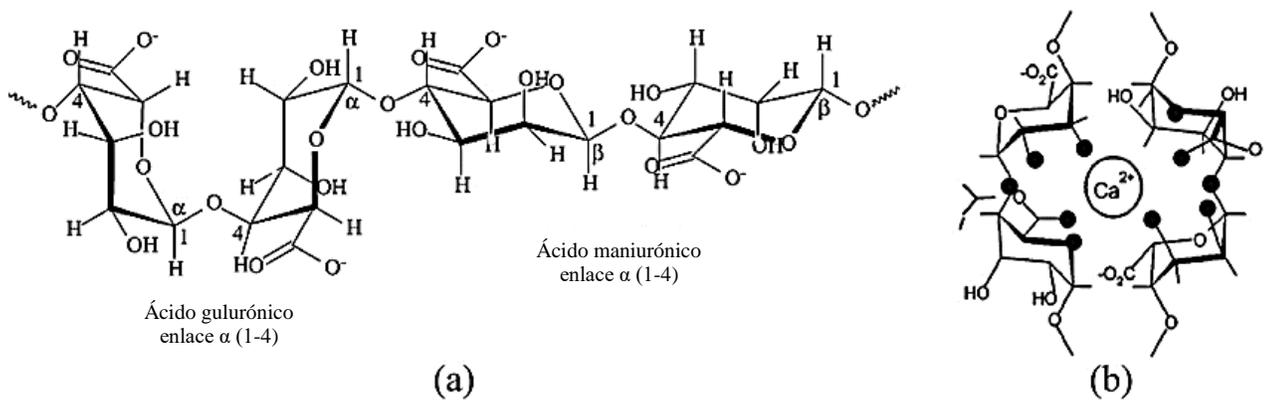
La encapsulación retiene los fagos dentro de un biomaterial para protegerlos de las condiciones ambientales externas y preservar su actividad en el entorno objetivo, proporcionando una solución renovada para mejorar la estabilidad de los fagos y dependiendo del biomaterial, y su porosidad, le dan un valor agregado para su administración (Champagne & Fustier, 2007; Ilomuanya MO, 2022; Yang Y, 2022).

## **1.6. Encapsulación de fagos: Perlas de alginato**

La encapsulación es una técnica donde se retiene gotas de un compuesto de interés en una matriz de encapsulación para proteger y permitir la liberación del compuesto en diferentes momentos y/o condiciones (Champagne & Fustier, 2007).

La encapsulación con alginato de sodio ha sido una de las más estudiadas a lo largo del tiempo. El alginato de sodio es considerado como el sistema más común de encapsulación (Remminghorst U., 2006). Es un polisacárido aniónico extraído de algas pardas, inocuo y de bajo costo, reconocido y aprobado por la agencia de alimentos y medicamentos del gobierno de Estados Unidos (FDA) como un producto GRAS (generalmente reconocido como seguro) en alimentos y medicamentos ya que son biocompatible y biodegradables (Saltz & Kandalam, 2016).

La característica más importante del alginato de sodio es la capacidad de gelificar en presencia de cationes polivalentes. Se generan geles tras el intercambio iónico entre el ión  $\text{Na}^+$  y los cationes polivalentes, el Calcio es el catión más común aplicado para formar geles de alginato iónico. La estructura del alginato consta de unidades  $\beta$ -D-Maniuronato (M) y  $\alpha$ -L-Guluronato (G) donde en presencia de cationes de calcio, los grupos  $\text{COO}^-$  de los bloques G y M atrapan los cationes en una red tridimensional y termo irreversible (Kamali moghaddam, 2014). (Fig. 2).



**Figura 2.** Estructura molecular de alginato de sodio (a), y la interacción entre los cationes de calcio y el oxígeno del ácido Gulurónico (b).

Como se mencionó, las perlas de alginato se pueden obtener mediante complejación de polielectrolitos. Por ejemplo, por goteo, el método consta de dejar caer la solución de alginato con el principio activo que se requiera encapsular, a una solución catiónica. Permitiendo la formación de una red polimérica (fig. 2) gracias a los ácidos G y M otorgándoles porosidad a las perlas (Muchiutti, 2019).

La porosidad de las perlas es una característica bastante favorable a la encapsulación de fagos, para la implementación de la tecnología al delivery de Fagoterapia contra vibrios en acuicultura, permitiendo la difusión de los fagos desde las perlas a las aguas de cultivo

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Diseñar perlas de alginato para el delivery de fagos contra vibrios en acuicultura

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Diseñar una fórmula para la encapsulación de fagos en perlas de alginato de sodio, contemplando el porcentaje del stock inicial y la relación v/v de este con el fago.
2. Evaluar los pretratamientos de los fagos para una exitosa formación de perlas de alginato de sodio por extrusión, de modo de favorecer la estabilidad de estas.
3. Evaluar la estabilidad de fagos encapsulados en diferentes soluciones de alginato de sodio,
4. Examinar la estabilidad de las perlas de alginato/fago en el tiempo en diferentes condiciones de almacenamiento.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Modelo de estudio: Cepa GV09 (*Vibrio alginolyticus*)

La cepa GV09 corresponde a un *Vibrio alginolyticus*. La cepa fue proporcionada por la Universidad Católica del Norte (UCN), aislado de un brote de vibriosis en un cultivo de acuicultura en el norte del país. La cepa fue utilizada como bacteria hospedera para la caracterización de los fagos. La cepa fue crecida, en medio LBAMS a 28°C con agitación constante a 180 RPM.

#### 3.2. Cinética de crecimiento cepa hospedera

Para definir el tiempo de las fases de crecimiento de la cepa GV09 y relacionarla con una densidad óptica, se realizó una curva de calibración según el principio de Diaz (2011)

La cepa se aisló mediante un traspaso de líquido a sólido en placas de LBAMS agar para obtener colonias aisladas. Se incubaron las placas a 28°C. Posterior a la incubación se tomó una colonia aislada del traspaso previamente realizado y se dejó incubar ON. Se inoculó medio LBAMS en un matraz con 1:100 de cultivo ON de la cepa hospedera, se tomó un volumen para medir la densidad óptica en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm. Por consiguiente, se realizó una siembra de 100 µl del inóculo a placas de LBAMS agar mediante rastrillo. La toma de muestras, siembra y medición de la densidad óptica se realizó cada 20 minutos hasta aproximadamente 5 horas.

Con los datos obtenidos se realizó una curva de calibración relacionando absorbancia y

UFC/ml y se determinó las fases del crecimiento de la cepa huésped. Todos los datos fueron obtenidos por triplicado. Las UFC/ml se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$UFC/mL = (\text{Número de colonias} * \text{factor de dilución}) / \text{volumen de alícuota}.$$

### 3.3. Bacteriófagos aislados desde chorito y caracol

Los fagos usados en los ensayos se obtuvieron de aislados anteriores realizados en el laboratorio de muestras de territorio nacional (Algarrobo, V Región-Valparaíso, Chile) (Tabla 3).

**Tabla 3. Fagos aislados de muestras de Chorito y Caracol.**

Muestra	Nomenclatura
Chorito	Ch1
	Ch8
	Ch10
	Ch20
Caracol	Ca1
	Ca4
	Ca5
	Ca8

#### 3.3.1. Enriquecimiento (propagación) de fagos y titulación

Se utilizaron las estrategias descritas por Van Twest (2009), con ligeras modificaciones, para el enriquecimiento de fagos con la finalidad de lograr un stock para su uso en distintos ensayos. El enriquecimiento se realizó con la cepa GV09 como hospedera.

En primer lugar, se procedió a la propagación de estos, la cepa hospedera se cultivó en

medio LBAMS a 28°C por 180 RPM, como cultivo ON, y se usó para enriquecer y titular los fagos Ch5, Ch8, Ch10, Ch20, Ca1, Ca4, Ca5 y Ca8.

Se inoculó un matraz de medio LBAMS 1:100 con un cultivo ON de la cepa huésped y se dejó en agitación constante de 180 RPM a 28°C hasta una  $OD_{620\text{ nm}}$  0,3. Posteriormente se infectó el inóculo con 1 ml de fago, se dejó el matraz con el inóculo infectado en agitación constante de 180 RPM a 28°C hasta visualizar lisis en el medio. Este proceso de enriquecimiento se realizó con todos los fagos anteriormente mencionados.

Los fagos enriquecidos se purificaron mediante centrifugación a 4°C por 7500 x g durante 10 minutos, para posteriormente filtrarlos por filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . El título del fago se determinó usando microgotas (10  $\mu\text{l}$ ) de diluciones en serie (1:10) sobre césped bacteriano inoculado a una  $OD_{620\text{nm}}$  0,3, en placas de LBAMS, utilizando el método de doble agar según el protocolo 9224 B, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Se dejaron secar las microgotas por 15 minutos a temperatura ambiente y luego se incubó ON a 28°C. Finalmente, se realizó el conteo de unidades formadoras de placas por ml para determinar la concentración final de los fagos (UFP/ml). Para la cuantificación de las unidades formadoras de placa por ml se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{UFP/mL} = (\text{Número de placas} * \text{factor de dilución}) / \text{volumen de alícuota.}$$

#### **3.4. Caracterización de bacteriófagos**

Cada ensayo y condición cuentan con replicas por triplicado para que los resultados sean lo más representativo posible. La caracterización de los fagos se realizó siguiendo

el protocolo de Peters (2022), bajo ligeras modificaciones.

#### **3.4.1. Rango hospedero y EOP (eficiencia de plaqueo)**

Se llevó a cabo este ensayo para determinar que fagos son capaces de infectar a la cepa GV09, permitiendo seleccionar aquellos con mayor capacidad de infección para estudios posteriores.

Por el método de doble agar se sembraron microgotas de los fagos en cuestión sobre césped de cepa GV09. Se incubó por 24 horas a 28°C. Se seleccionaron los fagos capaces de realizar lisis en la placa de doble agar.

La eficiencia de plaqueo por otra parte, es una prueba que permite determinar la capacidad infectiva de un fago. Esta prueba se llevó a cabo sembrando microgotas de diluciones seriadas sobre un césped de cepa GV09 usando el método de doble agar. Se incubó por 24 horas a 28°C, para posteriormente cuantificar las UFP para determinar su concentración (UFP/ml). Determinándose la relación del título del fago con la cepa GV09, y así seleccionar el mejor candidato para los experimentos que prosiguen.

#### **3.4.2. Curva de adsorción**

Para determinar el tiempo de adsorción de los fagos seleccionados anteriormente, se realizó una dilución 1/100 del cultivo ON de la cepa huésped en un matraz con medio de cultivo LBAMS y se incubó en agitación constante, 180 RPM a 28°C, hasta alcanzar una  $OD_{620nm}$  igual a 0,7. A continuación se infectó el cultivo con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Posterior a la infección, todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y sin agitación. Se tomaron muestras de 1 ml cada 2 minutos por 30 minutos. Cada alícuota se traspasó a un tubo con 10  $\mu$ l de cloroformo y se dejó reposar en hielo.

Finalmente, al terminar los 30 minutos del ensayo, se centrifugaron las muestras a 13.000 g por 5 minutos. El sobrenadante se filtró por filtros pirinola de 0,22  $\mu\text{m}$  y se tituló cada tiempo por método de doble agar. Las placas se dejaron incubar 24 horas a 28°C, para finalmente hacer el recuento de UFP. Este procedimiento se realizó de manera independiente para cada fago.

### **3.4.3. Curva One Step y Burst Size**

Una vez teniendo el tiempo de adsorción correspondiente a cada fago, se procedió a realizar la curva One Step. Con la finalidad de determinar el número de viriones liberados por bacteria afectada.

Primeramente, se extrajeron 5 ml de un cultivo de OD<sub>620nm</sub> 0,7, se infectó a un MOI 0,01, como fue descrito anteriormente. El cultivo infectado se dejó en reposo el tiempo estimado como fase de absorción característico de cada fago. Posterior al tiempo de adsorción se centrifugó a 6000 x g por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó con medio SM, se volvió a centrifugar en las condiciones anteriormente señaladas. Finalmente se suspendió el pellet en medio LBAMS.

El pellet resuspendido fue diluido 1:100 en medio LBAMS, se extrajo 1 ml de la muestra, se centrifugó a 15.000 g por 3 minutos, se filtró a 0,22  $\mu\text{m}$ , el filtrado se mantuvo a 4°C. Este proceso se repitió cada 5 minutos hasta completar 90 minutos. El ensayo se mantuvo en condiciones de agitación constante de 180 RPM a 28°C. Finalizando el ensayo, se titularon los fagos por método de doble agar.

El Burst Size, representa el número de fagos liberados, denominado como el tamaño de explosión, el cual se calcula a través de la curva One Step. Para calcular el Burst Size,

se emplea la siguiente ecuación (Fig. 3).

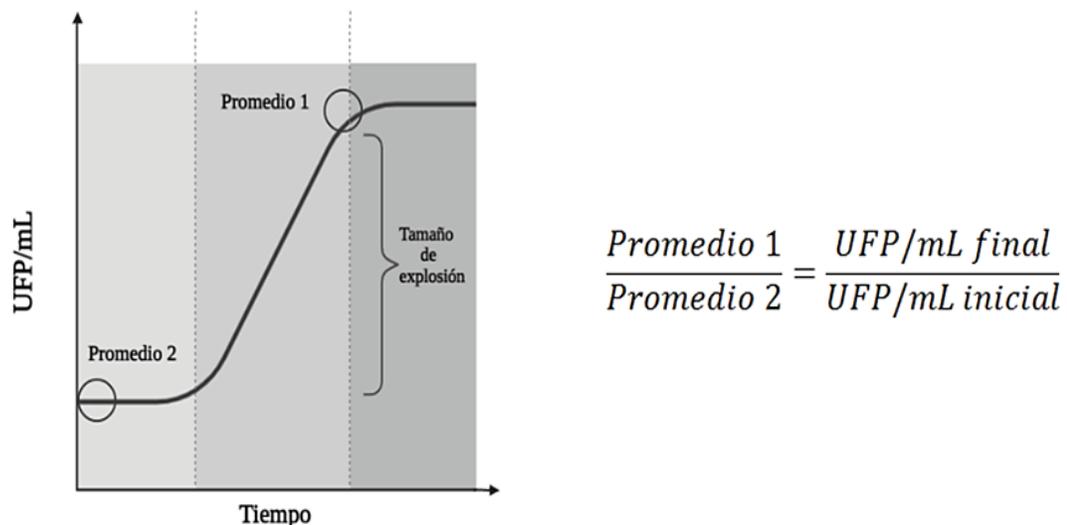


Figura 3. Esquema representativo del Burst Size, y la ecuación para obtener el número de viriones liberados por bacteria.

#### 3.4.4. Extracción y purificación de DNA viral

La extracción y purificación del DNA viral de los fagos Ca8 y Ch20 se realizó mediante el método PCI/SDS (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico), modificado de Phagehunting (phagesdb.org). Se enriqueció el fago obteniéndose un título superior a  $10^8$  UFP/ml requerido como mínimo según el método PIC/SDS. En 1 ml del lisado, se agregaron 12,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (1M), 1 ml de ADNasa I, 1  $\mu$ l de ARNasa A y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, se agregó en el siguiente orden, 40  $\mu$ l de EDTA (0,5 M), 10  $\mu$ l de Proteinasa K (10 mg/ml), 50  $\mu$ l de SDS 10% (m/v) y se incubó a  $55^\circ C$  por 1 hora, se agitó en vortex en intervalos de 20 minutos. Para extraer el material genético se alicuotó en dos tubos eppendorf 500  $\mu$ l del lisado, se añadieron 1 volumen de

fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en cada tubo y se invirtió el tubo numerosas veces para homogeneizar. La mezcla se centrifugó a 13.000 RPM por 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa cuidando de no tocar la interfase. Luego, se precipitó el material genético agregando 1 ml de etanol al 95% y 50  $\mu$ l de acetato de sodio 3M a la fase acuosa obtenida anteriormente, y se dejó la mezcla en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 13.000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet obtenido con 500  $\mu$ l de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 13.000 RPM por 10 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante, se dejó secar al aire, para luego resuspender en 50  $\mu$ l de buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) y dejar incubando a 37°C por 10 minutos. Una vez extraído el DNA viral se procedió a su cuantificación y cualificación. El material genético purificado se almacenó a -20°C.

La cuantificación del DNA viral se realizó mediante NanoQuant de TECAN. Por otro lado, la cualificación del DNA se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v). Como marcador de peso molecular se utilizó, bajo instrucciones del fabricante,  $\lambda$  HindIII (Thermo Scientific).

#### **3.4.5. DGREA**

Para diferenciar cada fago según su patrón de digestión, se realizó un análisis directo del genoma con enzima de restricción (DGREA). Se usó un protocolo modificado de (Fuenzalida L, 2006). El ensayo consistió en tratar 3  $\mu$ l (previamente diluido 1:2) de DNA viral de cada fago, con 1  $\mu$ l de *TaqI* (Thermo Scientific) como enzima de restricción, 2  $\mu$ l del buffer de la enzima y se llevó a un volumen final de 20  $\mu$ l con agua libre de nucleasas.

Se incubó la muestra a 65°C por 2 horas. Posteriormente se agregó 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) a cada tubo y se incubó a 37°C por 2 horas. La incubación de las muestras fue realizada en termociclador.

Los productos de la digestión se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%, a 100 V por 2 horas. Para finalmente ser revelado por protocolo de tinción de plata.

#### **3.4.6. Curva de cinética de infección**

Se llevó a cabo esta curva para observar la relación existente entre el fago y la cepa hospedera.

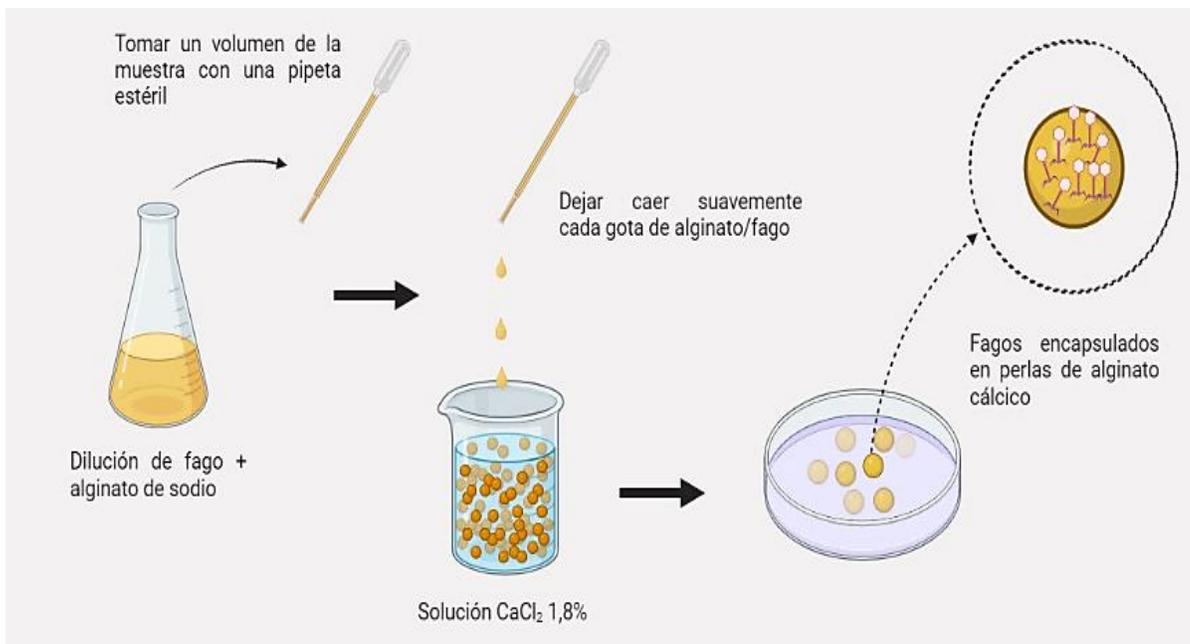
Para poder determinar la cinética de infección del fago Ch20, se realizó una dilución 1/50 de un cultivo ON en un matraz con medio LBAMS, al realizar la inoculación se infectó esta con una dilución 1/50 del stock del fago Ch20. El matraz control, fue inoculado con una dilución 1/50 del cultivo ON. Los matraces fueron incubados a agitación constante de 180 RPM a 28°C. Se tomaron muestras cada 1 hora durante un periodo total de 10 horas, para medir absorbancia (620 nm) en espectrofotómetro, contabilizar mediante microgota las UFC/ml y contabilizar, previa filtración, UFP/ml. Para el control solo se midió absorbancia y se contabilizó UFC/ml.

#### **3.5. Encapsulación de fago en perlas de alginato**

Previo a la encapsulación del fago Ch20 en perlas de alginato cálcico se realizó una diálisis del lisado. Posteriormente el alginato sódico polvo (Merk) se disolvió en agua MiliQ a una concentración final de 6% (p/v) como stock inicial. Para poder formar las perlas de

alginato por extrusión, se usó como medio entrecruzante cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (sigma-aldrich), a una concentración final de 1,8 % (p/v) en agua MiliQ. Al stock inicial de alginato se añadió fago dializado hasta llegar a una concentración final de 3%, 2% y 1% de alginato/fago, con respecto a la concentración inicial. Se agitó en vortex a temperatura ambiente, para homogeneizar.

La solución de alginato/fago se añadió gota a gota a un volumen arbitrario de solución iónica,  $\text{CaCl}_2$  (1,8% p/v) a temperatura ambiente, utilizando pipetas de Pasteur esterilizadas (Fig 4). El fago encapsulado en perlas de alginato se dejó en reposo por 1 minuto en la solución iónica. Después del reposo en solución, las perlas se filtraron para retirar excedente de solución iónica para posteriormente almacenarlas a  $4^\circ\text{C}$  para su uso.



**Figura 4.** Diagrama representativo de la encapsulación de fagos en perlas de alginato.

### **3.6. Difusión del fago encapsulado**

Para liberar el fago encapsulado, se realizó la difusión de este mediante una incubación de las perlas en Buffer SM (50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01% gelatina (v/w)), en constante agitación, 180 RPM a 25°C. Se tomaron muestras cada 30 minutos por 5 horas, para determinar el grado de difusión de las perlas y cuanto fago liberaba al medir la concentración (UFP/ml) por microgota sobre césped bacteriano, usando el método de doble agar.

### **3.7. Almacenamiento y estabilidad de las perlas de alginato/fago**

Para determinar la estabilidad de los fagos encapsulados se realizó la determinación del título del fago posterior a su almacenamiento.

Posterior a la encapsulación del fago Ch20 en perlas de alginato, se almacenó en medio SM. Se almacenaron las perlas bajo 3 temperaturas diferentes, 4 °C, -20°C y -80°C. Se realizó la titulación y eficiencia de plaqueo, posterior a un proceso de incubación. Se incubaron las perlas en tampón SM en agitación constante de 180 RPM y 25°C. Se realizó la titulación esporádicamente hasta cumplir 1 mes de almacenamiento. La titulación y eficiencia de plaqueo se repitió para cada una de las temperaturas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Curva de calibración cepa GV09: Estandarización de biomasa y fases de crecimiento

La cinética de crecimiento de la cepa GV09 del *Vibrio alginolyticus* evidenció que entre los 80 minutos y los 220 minutos la cepa se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento. La curva de calibración (Fig 5) además relaciona la concentración de la cepa con la densidad óptica. En los ensayos correspondientes a la caracterización de los fagos las O.D relevantes ( $_{620\text{nm}}$ ) son 0,3 y 0,7, las cuales presentan una concentración bacteriana de  $7,7 \times 10^7$  y  $2,7 \times 10^8$ , respectivamente.

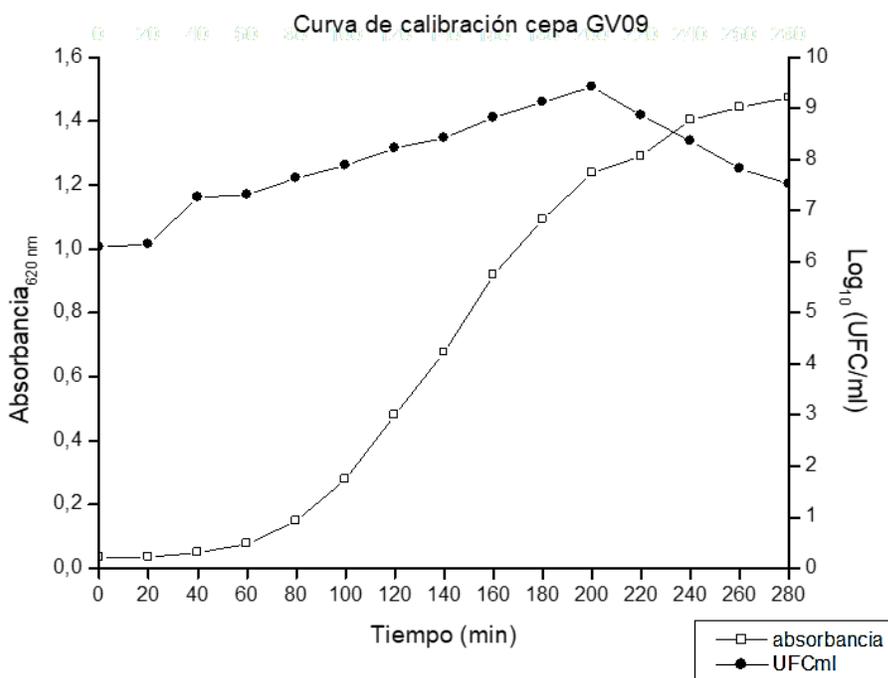
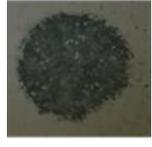


Figura 5. Curva de crecimiento de la cepa GV09 (*V. Alginolyticus*).

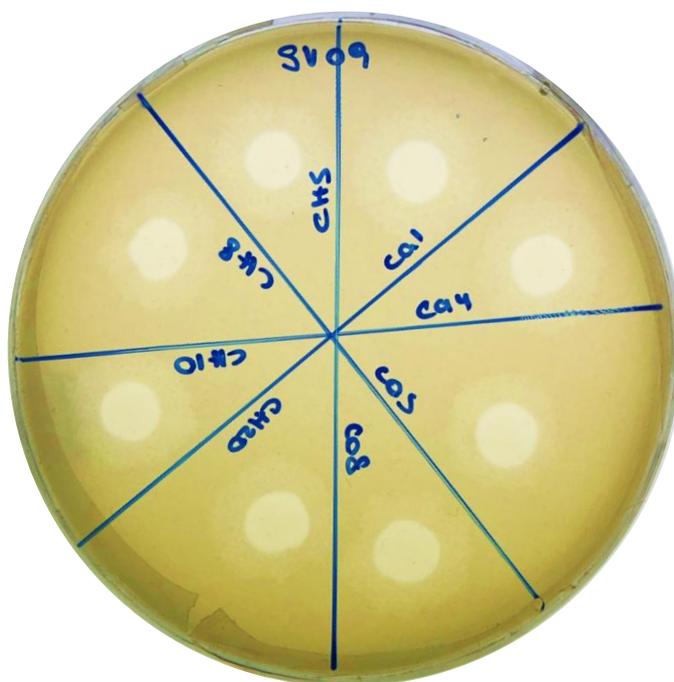
#### 4.2. Fagos que infectan la cepa GV09 (*Host range*).

Solo los fagos capaces de lisar a la cepa GV09 eran de interés, por lo que, para determinar que los fagos fueron capaces de realizar lisis, el criterio empleado en la clasificación de estos fue la clasificación de los spots tras el ensayo, representado en la siguiente tabla (Tabla 4).

**Tabla 4. Clasificación esquemática del spot a causa de la lisis producida por el bacteriófago en la cepa.**

<b>Criterio de Clasificación</b>	<b>Descripción</b>	<b>Significado</b>	<b>Visualización</b>
4	Spot completa y claro	Cepa altamente susceptible al bacteriófago	
3	Spot claro en todas partes, pero con un fondo ligeramente brumoso	Cepa levemente susceptible al bacteriófago	
2	Spot turbio sustancial en toda la zona despejada		
1	Spot muy turbio o algunas placas individuales		
0	Spot negativo, sin aclaramiento	Cepa no susceptible al bacteriófago	

El ensayo de rango hospedero reflejo los siguientes spots, Figura 6.



**Figura 6. Spot de lisis de los bacteriófagos sobre un césped de la cepa GV09**

Teniendo en cuenta el criterio de clasificación según la tabla 5 y los resultados del spot según la Figura 6, los resultados obtenidos del rango hospedero de los fagos para con la cepa GV09, fueron:

**Tabla 5. Resultados del rango hospedero**

Fago Cepa	Ch5	Ch8	Ch10	Ch20	Ca1	Ca4	Ca5	Ca8
<b>GV09</b>	4	4	4	4	4	4	4	4

Según los resultados presentados puede observarse que todos los fagos presentaron la capacidad de lisar a la bacteria con un spot de lisis de 4, por lo que todos son seleccionados para realizar el siguiente ensayo de caracterización EOP.

### 4.3. Eficiencia de plaqueo (EOP)

Posterior al enriquecimiento y titulación de cada fago, se cuantifico y determinó la concentración de fagos en UFP/ml correspondiente de cada uno. Los valores de EOP con respecto a la capacidad infectiva fueron obtenidos mediante la relación del fago con un título más alto. Donde se clasifican como los fagos altamente virulentos ( $1,0 > \text{EOP} > 0,5$ ), moderadamente virulentos ( $0,049 > \text{EOP} > 0,001$ ), poco virulento pero activo ( $\text{EOP} < 0,0009$ ) o no virulentos (sin presencia de placas de lisis) según (Mirzaei & Nilsson, 2015; Ramig RF, 2019).

Se presentan a continuación los resultados asociados a la EOP procedentes de los fagos que mostraron un spot de 4 (Tabla 6).

**Tabla 6. Valores de EOP y títulos obtenidos.**

<b>Cepa GV09</b>			
<b>Fago</b>	<b><math>\bar{x}</math> UFP/ml</b>	<b>EOP</b>	<b>Clasificación</b>
<b>Ch5</b>	$7,5 \times 10^5$	0,0002	Poco virulento pero activo
<b>Ch8</b>	$2,3 \times 10^6$	0,0006	Poco virulento pero activo
<b>Ch10</b>	$5,4 \times 10^5$	0,0002	Poco virulento pero activo
<b>Ch20</b>	$3,6 \times 10^9$	1	<b>Altamente virulento</b>
<b>Ca1</b>	$4,0 \times 10^6$	0,0011	Moderadamente virulento
<b>Ca4</b>	$3,3 \times 10^7$	0,0092	Moderadamente virulento
<b>Ca5</b>	$4,5 \times 10^7$	0,0125	Moderadamente virulento
<b>Ca8</b>	$2,8 \times 10^9$	0,7778	<b>Altamente virulento</b>

En este ensayo se puede observar que a pesar de que inicialmente todos los fagos presentaban un spot de 4, no presentaron en su mayoría un valor de EOP favorable. Con respecto a la morfología en placa, todos los fagos presentan placas uniformes, con una visible identificación de actividad despolimerasa, la cual es representada con la formación de halos alrededor de las placas de lisis (Fig 6.).

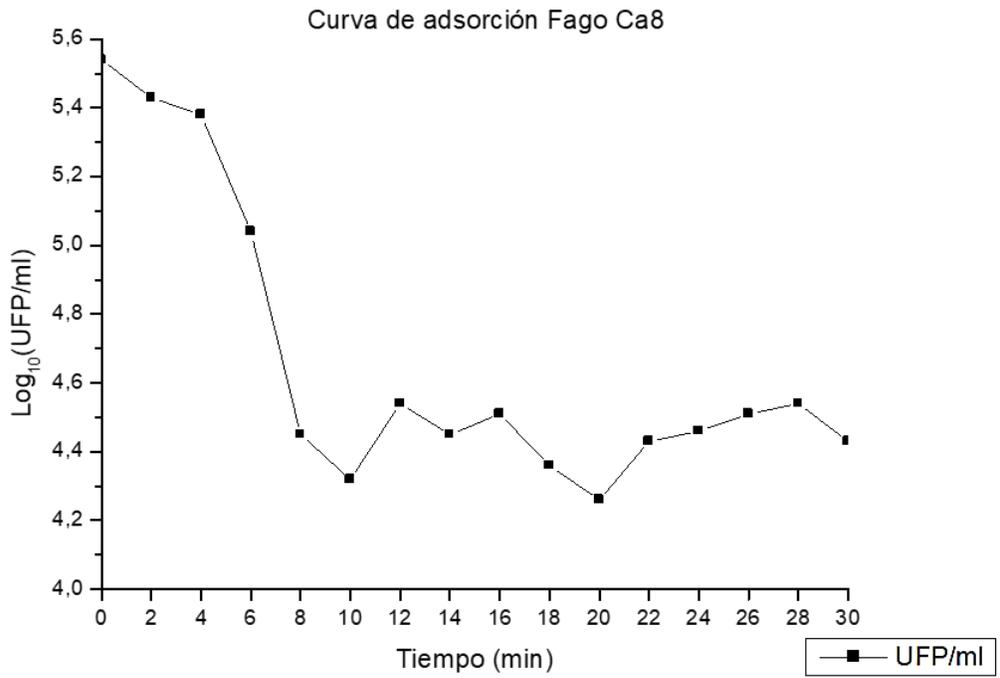
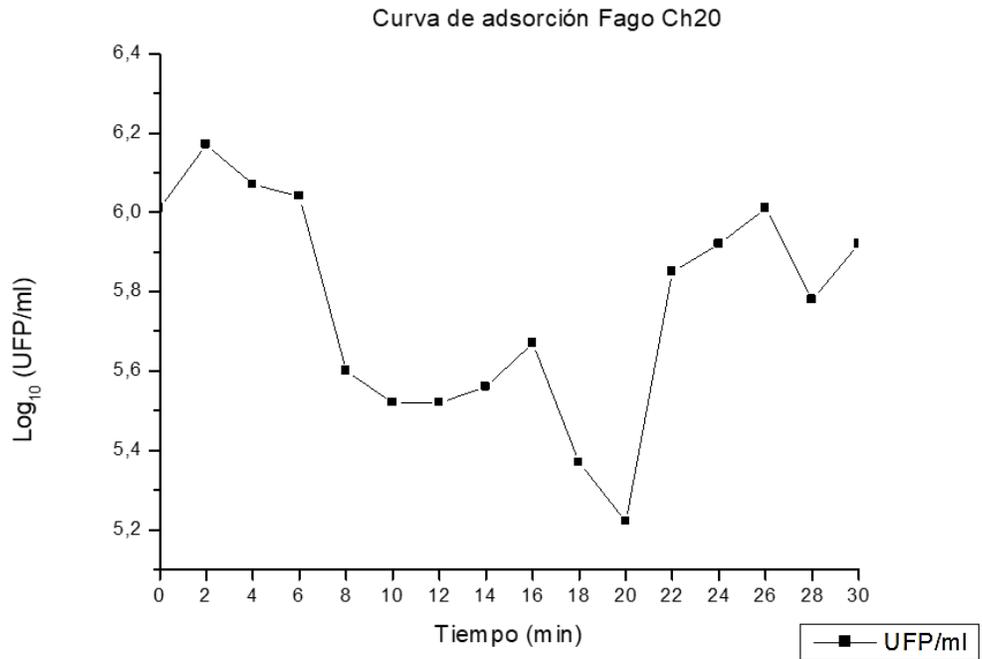
Las endolisinas (despolimerasas) son enzimas características de los bacteriófagos, las cuales degradan las barreras de hidratos de carbono presentes en las superficies de las bacterias Gram negativas, exponiendo a estas a ataques (Wang, 2019).

En la realización de estos experimentos se seleccionaron los fagos Ch20 y Ca8, puesto que además de mostrar un spot de 4 presentan una buena eficiencia de infección.

#### **4.4. Curva de adsorción**

Con la curva de adsorción se determina el tiempo que tarda un fago en unirse a la célula bacteriana antes de iniciar la infección.

Ambos fagos presentan diferencias en sus respectivas rectas en la curva, más no así el tiempo de adsorción, ambos fagos infectan con una rapidez similar a las células bacterianas, presentando un tiempo de adsorción de  $\approx 20$  minutos. Sin embargo, a pesar de que los tiempos de adsorción sean similares, las eficacias de ambos son distintas, el fago Ch20 presentó a un MOI 0,01 una eficacia aproximada a un 48%, mientras que el fago Ca8 presentó a un MOI 0,01 una eficacia aproximada de 40% (Fig 7).



**Figura 7. Curvas de adsorción fago Ch20 y fago Ca8.**

#### 4.5. Curva One Step y Burst Size

Con los resultados de esta curva se establecen el periodo de latencia y el tamaño de explosión, también conocido como *Burst Size*. Tiempos de latencia cortos y *Burst Size* altos son características recomendables para fagos útiles en Fagoterapia.

La figura 8 muestra indica que el periodo de latencia del fago Ch20 y del Ca8 es de 5 minutos, sin embargo, el fago Ch20 presenta un promedio de 42 viriones liberados por célula hospedera infectada. Por el contrario, el fago Ca8 presenta un promedio de 36 viriones liberados por célula hospedera infectada. Los valores promedio de viriones liberados corresponden al cálculo del Burst Size.

Hasta el momento la caracterización de los fagos Ch20 y Ca8 han resultado bastante similares, por lo que la identificación molecular de estos es necesaria para descartar que se esté trabajando con el mismo fago.

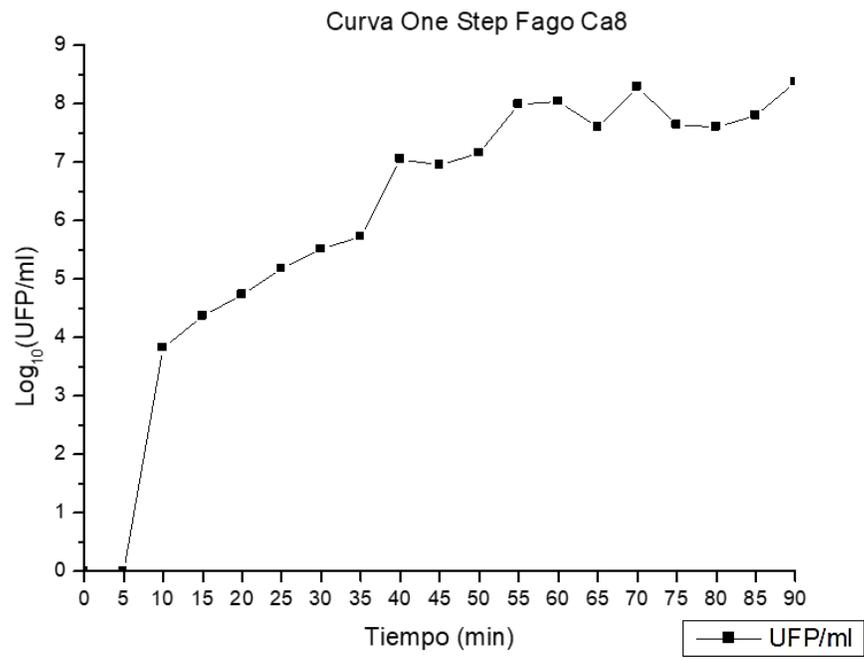
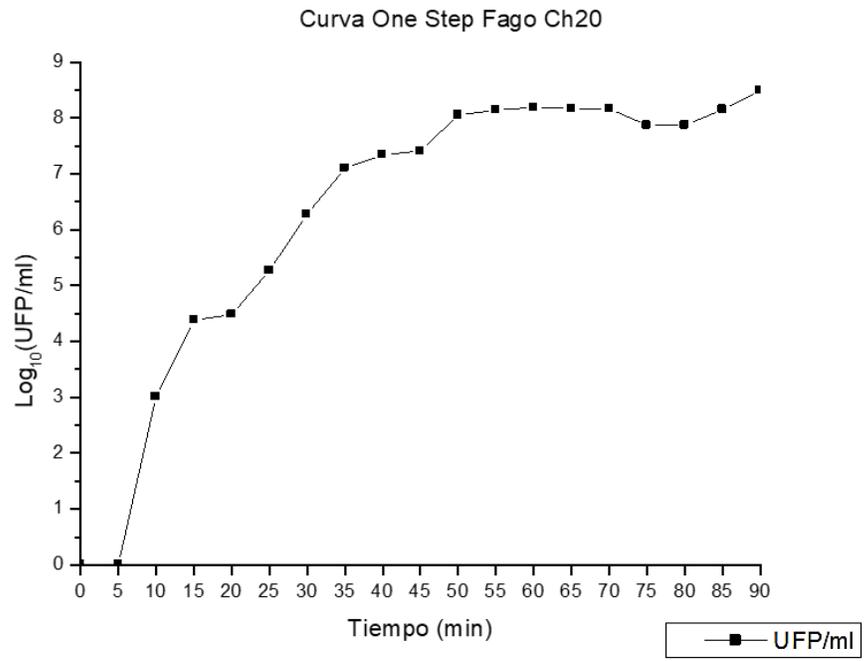


Figura 8. Curva One step del fago Ch20 y fago Ca8

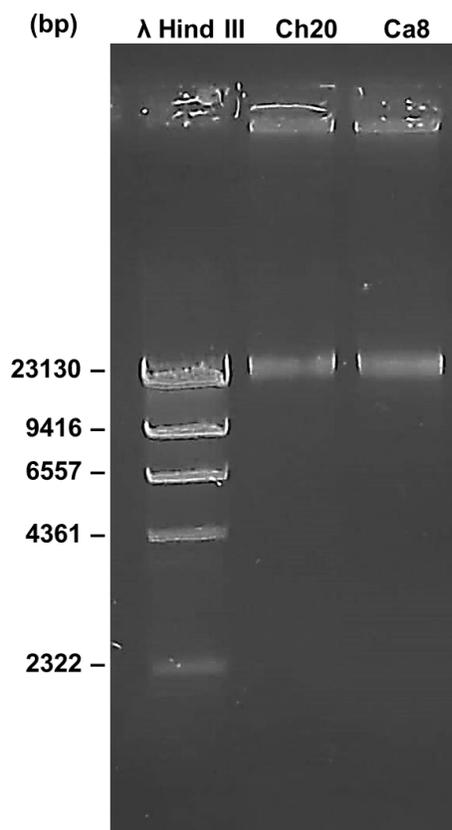
#### 4.6. Extracción de DNA: Cuantificación y cualificación del DNA viral

Posterior a la exitosa extracción del DNA viral de los fagos, se realizó la cuantificación mediante NanoQuant de TECAN (Tabla 7) por triplicado, y la cualificación de este, observando la integridad del DNA por electroforesis en geles de agarosa al 2% (Fig 9).

**Tabla 7. Datos obtenidos de la cuantificación de DNA mediante TECAN spark NanoQuant plate.**

<b>Fago</b>	<b>UFP/ml</b>	<b>Concentración (ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b><i>a Ratio</i></b>
<b>Ch20</b>	$1,3 \times 10^{10}$	332,23	1,81
<b>Ca8</b>	$7 \times 10^9$	410,2	1,80

La cuantificación del DNA en ambos casos señaló una concentración alta (ng/ $\mu$ l), y el lisado con el que se trabajó presentaba un título sobre  $10^9$ , lo que concuerda con estudios anteriores donde se señala que un título óptimo para una exitosa extracción de DNA es sobre  $10^9$  (Jakočiūnė, 2018). La relación de las absorbancias 260/280nm (*a ratio*) también fue obtenida con un valor promedio de 1,8 para ambos casos. Demostrando una pureza del DNA, ya que valores bajo 1,8 señalan una contaminación por fenoles en el proceso de extracción del DNA viral, mientras que valores sobre 2,0 señalan una desintegración del DNA y contaminación con RNA (Lucena-Aguilar G., 2016).



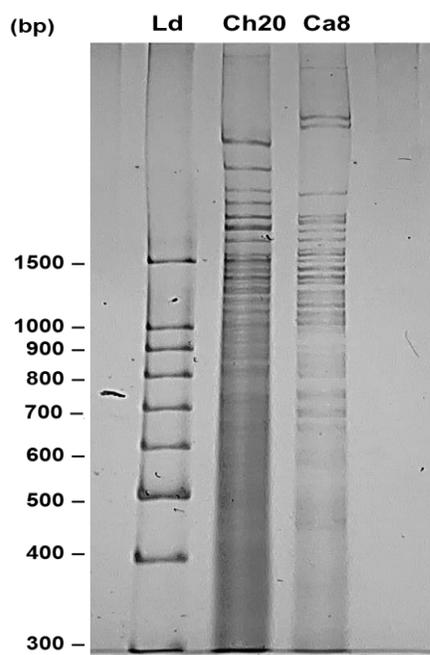
**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los genomas de los fagos Ch20 y Ca8. Marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.

La integridad de DNA de ambos fagos se mantuvo, anteriormente el *a ratio* en ambos casos señaló un valor promedio de 1,8, lo cual es aceptado como DNA puro, por lo que se descartó en primera instancia desintegración del material genético. Por otro lado, no se observó una migración de bandas correspondientes a RNA en el gel de agarosa, ya que una banda intacta sugiere que no hubo desintegración del DNA obtenido de la extracción ni contaminado por RNA. Estimando el tamaño de los genomas se deduce, de acuerdo con el marcador molecular, un tamaño de  $\approx 20$  Kb.

#### 4.7. DGREA: Huella dactilar fagos Ch20 y Ca8

El análisis directo del genoma con enzimas de restricción proporciona una huella genética con los fragmentos de material genético, permitiendo analizar cada bacteriófago y sus similitudes. El patrón de cada bacteriófago se obtuvo mediante la restricción del genoma por digestión enzimática con la *Taq I*, una enzima endonucleasa.

En la figura 10, se pueden apreciar los patrones, ambos genomas fueron susceptibles a la endonucleasa empleada, indicando de esta forma que ambos presentan un DNA bicatenario (DNAbc). Mediante este método de identificación, se determinó que a pesar de que la caracterización anterior señale como similares a ambos, en efecto, se trata de dos bacteriófagos distintos.



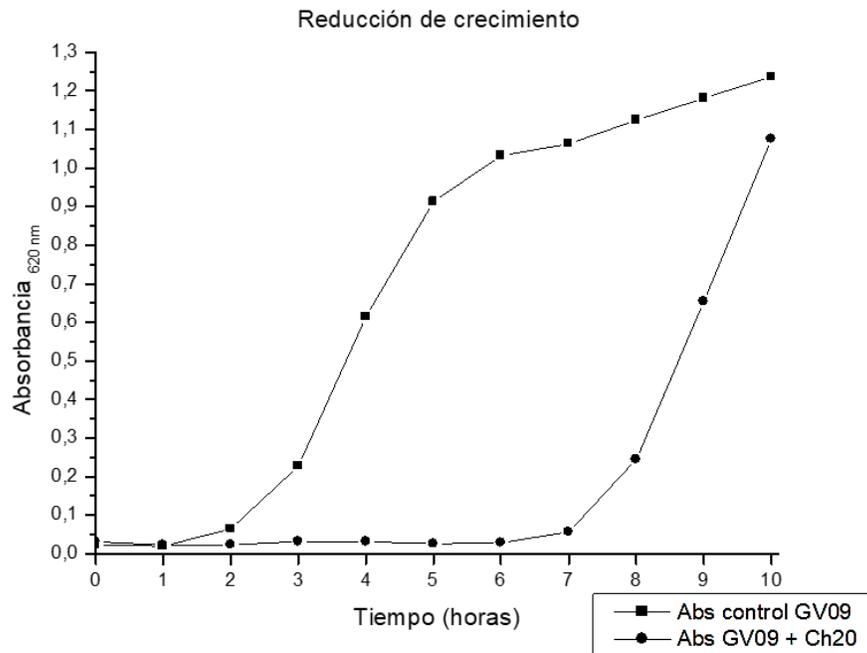
**Figura 10.** Patrones de restricción de los genomas de los bacteriófagos Ch20 y Ca8. Análisis DGREA obtenido con la endonucleasa *Taq I*. Ld corresponde al marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder.

#### **4.8. Curva de infección fago Ch20**

Al identificar que efectivamente los fagos Ch20 y Ca8 no correspondían al mismo, se optó por el fago Ch20 para proceder con la caracterización.

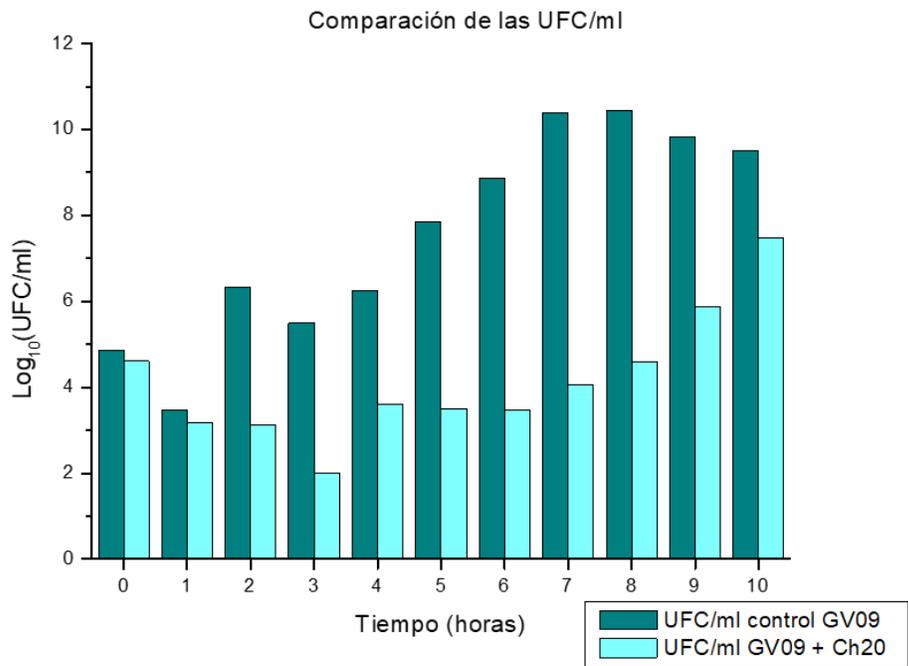
Los resultados de la curva de infección permiten evaluar la dinámica de la infección mediante el monitoreo del crecimiento bacteriano de la cepa GV09, tras determinados tiempos post infección.

El fago Ch20 muestra una dinámica infectiva de alta eficiencia, ya que reduce el crecimiento de su cepa hospedera, se observa en la Figura 11, que las primeras horas tras la infección el cultivo presenta una  $O.D_{620nm}$  muy baja, que corresponde a un cultivo carente de turbidez. Por otro lado, a pesar de tener un periodo de horas de reducción de crecimiento a partir de las 6 horas se puede apreciar que la cepa hospedera desarrolla resistencia a una elevada velocidad.



**Figura 11.** Curva de infección fago Ch20. Relación de las absorbancias del control vs de la cepa infectada con el fago Ch20.

La reducción del crecimiento no solo se midió por turbidez mediante absorbancia, para poder determinar cómo afectaba a la concentración de las bacterias la infección con el fago, se contabilizaron las UFC/ml, como se observa en la figura 12, donde efectivamente se puede observar una notoria disminución de la concentración de las bacterias.



**Figura 12. Representación gráfica de la disminución de concentración representada.**

Los datos obtenidos de la curva de infección corresponden a un MOI de  $\approx 0,1$  (0,07). Es probable obtener un efecto aún más prolongado de reducción de crecimiento cuanto mayor sea el MOI, ya que mayor será la probabilidad de que una misma bacteria sea infectada por un número mayor de fagos de esta forma incrementando el número total de fagos por “centro infectivo” como menciona Fernández espinel (2017).

Se puede observar, además, en la figura 13, la cinética de infección del fago Ch20 para con la cepa GV09. Como en presencia el fago, van disminuyendo las UFC/ml en comparación con el control al absorberse el fago, este ingresa a la célula bacteriana, cumple su ciclo de replicación de DNA en su hospedero, se libera y ocurre lisis, ya que es un fago lítico. La concentración del fago va fluctuando a través del tiempo, esta interacción del fago con la cepa modificando su ciclo de crecimiento, disminuyendo, por

ende, la concentración de la cepa a través del tiempo en el bioensayo, contrastando con un crecimiento sin alteración como es el caso del control.

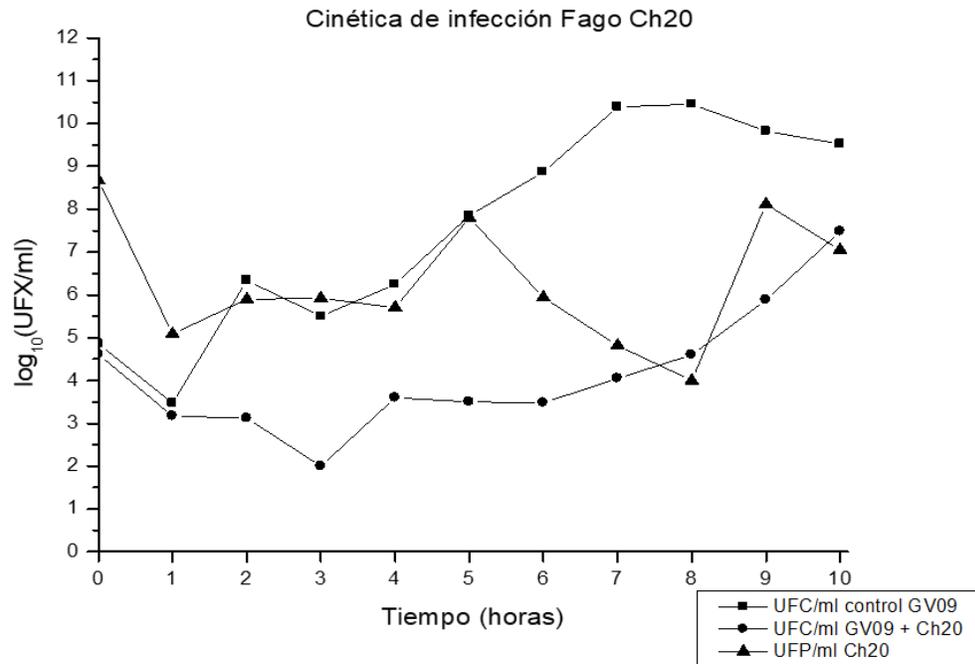


Figura 13. Cinética de infección fago Ch20 para con la cepa GV09.

#### 4.9. Difusión de fagos encapsulados en perlas de alginato

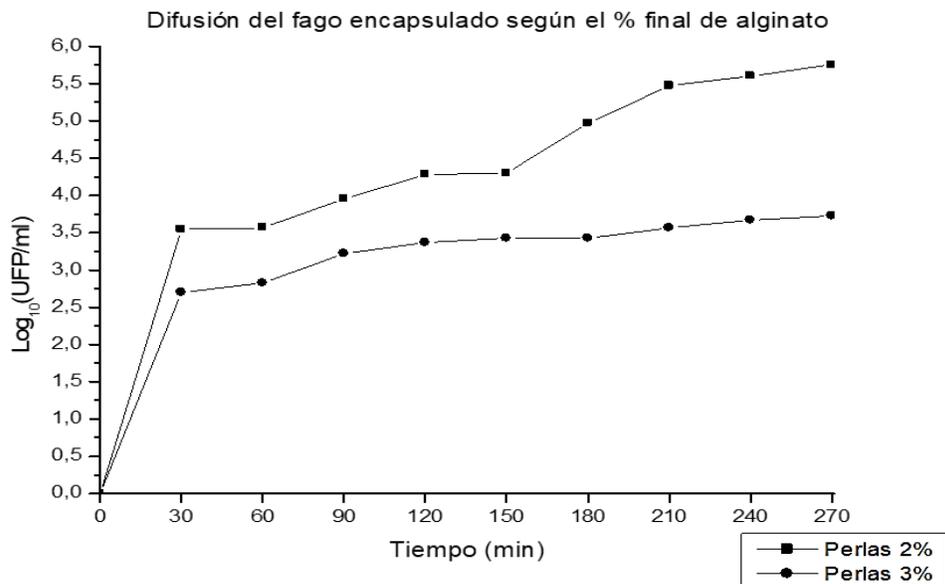
Para determinar a qué concentración final de alginato/fago la tasa de difusión del fago es mayor, se encapsularon a diferentes concentraciones 1%, 2% y 3%.

Se obtuvo una tabla resumen (Tabla 8) con las características de las perlas con respecto a diferentes conceptos. Además de obtenerse la tasa difusión bajo un ensayo de  $\approx 5$  horas (Fig 14).

**Tabla 8. Características físicas de las perlas de alginato a diferentes % finales**

Alginato (%)	1	2	3
<b>Diámetro (mm)</b>	No mantiene su forma	4,8 ≈ 5	4,6
<b>Tasa de Difusión</b>	-	Sí	Sí, pero muy baja
<b>Apariencia física</b>	Delicada, fácil de romper	Suficientemente dura para manipularla	Muy dura
<b>Estabilidad</b>	No estable	Buena estabilidad	Estable pero muy rígida

Lo cual es acorde a la literatura, donde señala que a mayor concentración de alginato el diámetro de las perlas es menor, y, por ende, los poros de este serán de menor tamaño. Por otro lado, la concentración de la solución iónica donde caen las gotas de alginato determinará la disminución del diámetro de los poros; a mayor concentración de iones  $Ca^{2+}$  menor será el tamaño de los poros ( $2NaC_6H_7O_6 + CaCl_2 \rightarrow 2NaCl + C_{12}H_{14}CaO_{12}$ ) (Peretz, 2014).



**Figura 14. Curva de difusión del fago encapsulado a diferentes % de alginato.**

Los geles de alginato al 2% tienden a formar poros de un diámetro en promedio de 148  $\mu\text{m}$ , por lo que los geles a un 3% presenta diámetros mucho más estrechos (Xiao, 2019). Los poros en las perlas permiten a su vez la difusión de los fagos con el medio ya que el tamaño de un fago varía entre los 24 nm a los  $\approx 200$  nm.

Por lo que se concluye que la concentración final a la que las perlas conservan su integridad y permiten la difusión de los fagos con el medio, es de 2% mientras que la solución iónica corresponde a un 1,8% según la literatura.

#### 4.10. Estabilidad de los fagos encapsulados

Al determinarse un 2% como porcentaje final de las perlas de alginato se encapsuló el fago Ch20 y se almacenó a diferentes temperaturas, 4, -20 y  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para posteriormente realizar la prueba de difusión del fago encapsulado en buffer SM, y titular. Se realizó el seguimiento por 1 mes, obteniéndose los siguientes resultados (Fig 15, 16).

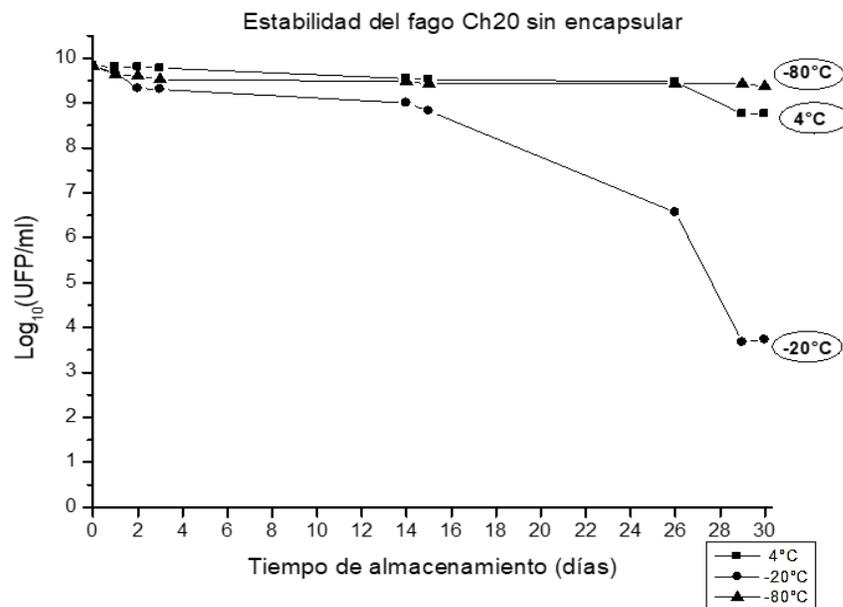
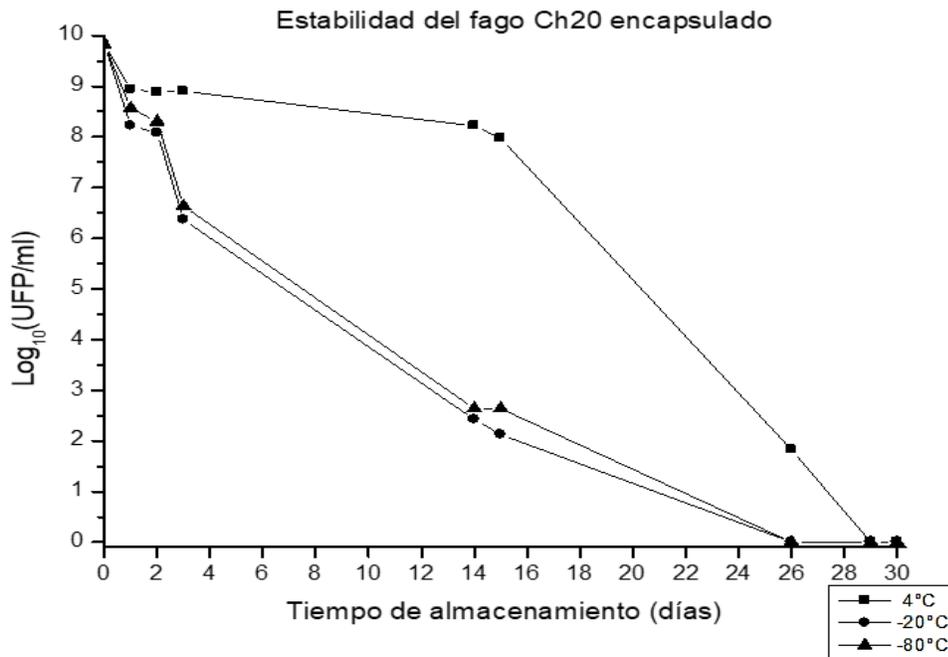


Figura 15. Curva de estabilidad del fago Ch20 sin encapsular a diferentes temperaturas (4, -20,

**-80°C) de almacenamiento.**

En el caso del fago sin encapsular, a 4 y -80°C, la viabilidad del fago se mantuvo bastante estable, sin embargo, a -20°C desde los 15 días de almacenamiento se ve una caída del título bastante notoria, esto debido a la formación de cristales de hielo. Con los resultados se determina que la mejor temperatura para almacenar fagos sin encapsular es a -80°C.



**Figura 16. Curva de estabilidad del fago Ch20 encapsulado a diferentes temperaturas (4, -20, -80°C) de almacenamiento**

Posterior a la agitación de las perlas, no se mostró signo de difusión ni presencia de concentración viral. Contrastando a la idea de brindar protección al fago mediante encapsulación, el fago perdió su viabilidad y poder de infección a los 30 días de almacenamiento en las 3 temperaturas previamente señaladas.

## 5. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

La rapidez y frecuencia con que las bacterias adquieren genes de resistencia frente a antibióticos genera una gran necesidad de desarrollar nuevas estrategias, alternativas innovadoras a los tratamientos convencionales, basados en antibióticos, para controlar y frenar su avance. Todo esto conlleva a que la investigación en terapia con fagos haya aumentado de forma significativa a lo largo de los años. La Fagoterapia ha proporcionado resultados prometedores que suponen un impacto a la biomasa bacteriana en enfermedades (Gordillo & Barr, 2019).

El aumento de interés en el campo de investigación en fagos ha permitido progresivamente el aislamiento, identificación y caracterización de cada vez más números de bacteriófagos específicos para, en este caso, la cepa *V. alginolyticus*. Solo en este trabajo, se contaron inicialmente con 8 fagos aislados; cuanto mayor sea la cantidad de bacteriófagos identificados, por consecuencia, mayores serán las probabilidades de identificar estos para su uso terapéutico de forma segura y eficaz. Es por esto la persistencia de seguir con el campo de investigación centralizada en Fagoterapia, para el entendimiento en la mecánica asociada a las interacciones de infección de los fagos para con las bacterias. En el presente trabajo, se caracterizó un bacteriófago (Ch20) altamente lítico contra la cepa *V. alginolyticus* (GV09), con el fin de estudiar *in vitro* las interacciones entre el fago y la cepa hospedera, evaluando el potencial uso del fago encapsulado en el delivery de Fagoterapia en acuicultura.

La estandarización de la biomasa de la cepa hospedera de un fago candidato para

Fagoterapia es altamente recomendable, para mantener las condiciones equivalentes de biomasa en los ensayos al determinar las fases de crecimiento del patógeno bacteriano y la caracterización del fago. Se ha descrito anteriormente este procedimiento en la caracterización de un fago específico de *Vibrio alginolyticus* por Fernández Espinel (2017) . Trabajando así, con concentraciones lo más homogéneas posibles según la fase de crecimiento que la caracterización de fagos requiera.

Al determinar el rango hospedero de los fagos, previamente aislados en el laboratorio, resultó que los 8 fagos presentaban placas de lisis (spot) de 4 (Tabla 5, Fig 6). Los spots eran traslucidos, lo cual es representativo de un fenotipo conveniente, ya que refleja una lisis eficiente, por lo que los 8 fagos fueron calificados para continuar con su caracterización. Cabe destacar, además, que los 8 fagos presentaron un halo traslucido alrededor de los spots de lisis, estos halos se asocian, como se mencionó anteriormente, con la presencia de despolimerasas. Las endolisinas (despolimerasas) son enzimas codificadas por fagos, las cuales son capaces de degradar exopolisacáridos presentes en las bacterias, estas se pueden encontrar en los fagos como componentes integrales del fago, o como proteínas que son solubles, las cuales son generadas durante la lisis de la bacteria. Es una característica favorecedora para un fago lítico, ya que no todos presentan esta característica fenotípica (Pires, 2016).

La morfología de los spots de lisis, y el diámetro se han descrito anteriormente por Solís (2016), correspondientes a otros fagos con bacterias hospederas dentro del género *Vibrio* (*cholerae* y *parahaemolyticus*). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos, morfologías transparentes con halos traslúcidos alrededor, con diámetros

que rondan los 4 a 6 mm. Por otro lado, la EOP describió a los fagos según su eficiencia de plaqueo, correspondientes para la cepa GV09, donde 2 (Ch20 y Ca8) de los 8 fagos fueron catalogados como altamente virulentos con respecto a la relación del fago con un título más alto, por lo que se procedió con ellos en los siguientes pasos de caracterización.

La curva One Step (figura 8) mostró las etapas implicadas en el ciclo de replicación y multiplicación de los fagos, se determinó además el periodo de latencia y el tamaño de la explosión (Burst Size), los cuales corresponden a parámetros necesarios para comprender las posibles propiedades esenciales de un fago apto para Fagoterapia. Autores como Sung lee (2014) han reportado periodos de latencia de hasta 65 minutos y Burst Size entre 23 a 78 viriones por centro infectivo (bacteria infectada), sin embargo, estas características están estrechamente relacionadas con el MOI empleado en la infección. En este trabajo se obtuvieron tiempos de latencia de 5 minutos para ambos fagos, pero Burst Size para los fagos Ch20 y Ca8 de 42 y 36 viriones, respectivamente. La literatura sugiere que mientras más corto sea el tiempo de latencia y mayor el tamaño del Burst Size, las probabilidades de éxito del fago para ser usado en Fagoterapia son mayores (Middelboe M., 2010). Por lo que ambos bacteriófagos de este trabajo, al presentar periodos de latencia cortos y un tamaño de explosión dentro de los parámetros señalados por Sung lee (2014), presentan las características potenciales para las pruebas de terapia contra el patógeno bacteriano GV09.

Ambos fagos presentaron características similares en varios parámetros de caracterización, por lo que la identificación de ellos fue necesaria, para determinar que efectivamente no se estaba trabajando con el mismo fago. El análisis de patrones de restricción de genomas (Fig 10) estableció que ambos fagos, en efecto, son diferentes, específicamente por las bandas superiores presentes en el perfil del fago Ca8 diferenciándolo del fago Ch20.

El ensayo de la curva de infección (Fig 11) para el fago Ch20 mostró una fuerte actividad lítica del fago para con la cepa hospedera, manteniendo un ralentizamiento del crecimiento bacteriano, observándose una OD sin cambios significativos por hasta 6 horas. No obstante, también se observó la rapidez con que la cepa generó resistencia frente a la infección del fago, mostrando un aumento significativo de su densidad óptica y su concentración (Fig 11, 12) al cabo de las 6 horas post infección. Estos resultados pueden asociarse con el periodo de latencia del fago Ch20 (5 minutos), al ser un periodo corto permite infectar con mayor rapidez a las células bacterianas hospederas presentes en el medio, pero a su vez, presenta un tamaño de explosión reducido, lo que es una ventaja para la bacteria, y por eso la aparición de una pronta resistencia (Shao, 2008; Porter, 2020).

Cabe destacar que la observación del fenómeno de resistencia por parte de la bacteria hospedera no supone un descarte del fago como agente terapéutico. Según Oechslin (2018) esto es característico de las bacterias patogénicas, por lo que el fago puede ser usado dentro de un coctel de fagos para determinar un tipo de sinergia entre ellos, y que de forma grupal erradiquen eficazmente la cepa patógena. Una combinación de

fagos aumenta el número de patógenos potenciales por célula objetivo. A mayor cantidad de fagos, mayor es el número de receptores en la superficie de la célula que se verán afectados, lo que se traduce como una disminución en la resistencia en comparación del tratamiento solo con un fago. Similarmente pasa con fagos y antibióticos, donde una combinación de ambos mejora la actividad antimicrobiana, potenciando la sensibilidad de la bacteria al antibiótico y disminuyendo la aparición de bacterias resistentes a fagos (Blasco, 2019). Con los resultados obtenidos de este ensayo, se puede determinar el fago Ch20 como un buen candidato para una terapia antimicrobiana contra la cepa GV09.

Por otro lado, si bien la Fagoterapia se destaca por ser un recurso innovador y esperanzador contra el control de bacterias patógenas, esta ha sido estudiada hace muchos años, y se ha visto afectada por el escaso interés por parte de las industrias farmacéuticas, ya que presentan comportamientos biológicamente distintos a preparaciones farmacéuticas. En la actualidad varios estudios en modelos animales han demostrado resultados esperanzadores, a pesar de los malos pronósticos por las diferentes problemáticas asociadas (Reina J, 2018).

Una de las problemáticas asociadas a la Fagoterapia, es la estabilidad de los fagos a lo largo del tiempo. La pérdida de actividad de los fagos durante la formulación, almacenamiento e incluso su inactivación por agentes externos donde sean aplicados (PH, actividad enzimática o T°) da como resultados, en varias ocasiones, resultados deficientes (Malik DJ, 2017).

Los fagos no son tolerantes a altas temperatura, y como se mencionó anteriormente, son susceptibles a cambios bruscos de PH y otros factores, por lo que la encapsulación como tecnología para administrar y/o almacenar fagos, es mucho más factible que métodos de procesamiento que puedan disminuir o tajantemente inhibir la actividad infectiva del fago, como la liofilización, secado por aspersión, etc. La encapsulación por extrusión se ha convertido, en una de las primeras opciones al momento de preservar los fagos, por lo económico, inocuo y simple del proceso (Zhou Y, 2022).

Una aplicación de un tratamiento con fagos como principio activo, en experiencias anteriores en el laboratorio, ha presentado altas tasas de mortalidad de los modelos animales *in vitro* por el cambio brusco de las condiciones del agua, por lo que un método donde se permita la difusión de los fagos en el medio, evitando contaminación o alteración de las condiciones idóneas de este es altamente favorable.

El propósito principal de este trabajo fue el encapsular el fago con mejor rendimiento con respecto a la caracterización de este para Fagoterapia, en alginato de sodio por extrusión en una solución iónica de  $\text{CaCl}_2$ , resultando perlas de alginato cálcico. No se realizó ninguna aleación del alginato con algún otro polímero, con el fin de permitir la difusión del fago, manteniendo su actividad lítica, por los poros presentes en las perlas de alginato, para el delivery en acuicultura en general.

La encapsulación por extrusión en solución iónica es una de las más sencillas, lo que permitió construir el sistema de manera artesanal en el laboratorio (Fig 4), ya que solo considera mezclar, homogenizar y gotear la solución (alginato + fago Ch20) en un

medio con cationes divalentes.

Previo al encapsulamiento se realizó una diálisis del lisado del fago enriquecido y filtrado, ya que la presencia de sales, extracto de levadura, y diversos reactivos en el medio LBAMS, interrumpía la formación de enlaces “Cajón de huevo” (Fig 2) del alginato con el medio iónico, impidiendo la formación de perlas de alginato cálcico. El lisado del fago Ch20 dializado fue encapsulado en perlas de alginato, para posteriormente medir distintas variables.

La tasa de difusión del fago por parte de las perlas fue medida a diferentes % de alginato final en la solución con el fago Ch20. Los porcentajes finales fueron 1, 2 y 3 %, donde el 1% no mantuvo la forma, ni pudo obtener una correcta esferificación de la perla de alginato, por lo que se descartó en las pruebas de difusión, las características de cada % están detallados en la tabla 8.

La eficiencia de encapsulación y difusión de los fagos encapsulados son cruciales como sistemas de entrega (delivery) inteligentes, previos estudios detallaron estas características en encapsulaciones de fagos para Fagoterapia en alimentos (Maresca D., 2016). Las perlas de alginato se mantuvieron en constante agitación para permitir con mayor facilidad la difusión del fago, donde el comportamiento de liberación del fago encapsulado por difusión (Fig 14) sugiere que la liberación de fagos se concentró en los primeros 30 minutos. El título inicial del fago encapsulado fue de  $6,8 \times 10^9$  UFP/ml mientras que después de 5 horas aproximadamente las perlas de 2% y 3% llegaron a un total de fago liberado con concentración de  $5,67 \times 10^5$  y de  $5,3 \times 10^3$

UFP/ml respectivamente, determinándose así que las perlas de un 2% final presentaron una eficiencia de liberación del fago encapsulado mayor que la perla de un fago 3%.

Finalmente, al obtener una mejor difusión en las perlas con menos porcentaje de alginato (2%), con esto demostrando la versatilidad que se otorga para el delivery en solución, se procedió a almacenar para determinar la mejor condición que mantuviera la viabilidad del fago a diferentes parámetros como temperatura y tiempo, para una proyección a futuro de la tecnología a aplicar. La concentración inicial del fago Ch20 fue de  $6,8 \times 10^9$  UFP/ml, este se encapsuló y almacenó a 3 temperaturas diferentes, 4, -20 y -80°C. Los resultados (Fig 15, 16) mostraron que a pesar de que la concentración de fagos inicial fue la misma en todos los casos, tanto en los fagos sin encapsular como encapsulados, a las 3 temperaturas correspondientes; las diferencias en la concentración de fagos y su viabilidad en el medio se ven disminuidas por la liberación controlada de fagos desde las perlas de alginato por la tasa de difusión que presentan. Este proceso de liberación está ligado estrechamente con los cambios físicos que puedan presentar las perlas en solución, como hinchamiento, erosión de la superficie, al ser el alginato un polímero (Ma, 2012).

La encapsulación en perlas de alginato reduce la velocidad de difusión, es por esto que, las propiedades funcionales dependen de la composición, y el tamaño molecular del polímero. Soluciones de alginato con mayor presencia de ácido gulurónico (G) presentan estructuras de poros más abiertos y presentan alta velocidad de difusión (Goh, 2012).

En general, para el almacenamiento a largo plazo se congelan las muestras, por su sencillez y porque la pérdida de viabilidad y/o actividad es baja, siendo estable en el tiempo. Es un método menos drástico que la liofilización, pero presenta cristalización del agua. Asegurar la estabilidad de los fagos es una preocupación clave en el diseño de métodos de administración en Fagoterapia, donde la encapsulación se presenta como técnica prometedora para un almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, en este trabajo, a 4 °C, el fago encapsulado presentó un tiempo de vida media de 15 días en almacenamiento (Fig 16). Para el caso de los fagos libres, la conservación de fagos por congelación mostró en general una mayor estabilidad a -80 °C que a -20°C tras 30 días de almacenaje (Fig 15), donde fue más perjudicial la pérdida de título.

Una estabilidad mayor de fagos a -80 °C en comparación a -20°C se ha descrito antes por Yue Xiao (2022), donde no se recomienda almacenar fagos a -20°C porque la estructura cristalina del hielo puede causar su destrucción. Para proteger los fagos de inactivación se recomienda, durante periodos más largos, mantenerse a -80°C. La solución utilizada para conservar el fago encapsulado también es importante para mantener su estabilidad.

A 4°C el fago libre inicialmente se mantuvo más estable los primeros días de almacenamiento, con respecto a -80°C, sin embargo, al día 30 de almacenamiento, se contrastaron los resultados. Resultó que el fago sin encapsular se mantuvo con mejor título a -80°C que, a 4°C, lo que ratifica con resultados de estudios anteriores, con respecto al almacenaje de fagos por periodos largos de tiempo, siendo los fagos más estables a -80°C. Se deduce entonces, que la estabilidad del fago aumento a medida

que disminuyó la temperatura en el caso del almacenaje a 4°C y a -80°C, descartando el almacenar el fago a -20°C por la inestabilidad que implica. Por otro lado, en los 3 casos de almacenaje, el fago encapsulado, pasados los 30 días, perdieron el título, no se mostró difusión ni presencia de concentración viral a pesar del tratamiento de agitación para facilitar la difusión del fago. El fago encapsulado se mantuvo en suspensión en buffer SM. El buffer SM se utiliza normalmente para la suspensión de fagos, donde específicamente la gelatina estabiliza las partículas de fago durante la conservación (Yue Xiao, 2022), por lo que se descartó en primera instancia como factor influyente en la pérdida de título en el almacenaje. Sin embargo, el alginato cálcico sin excipientes genera una red polimérica, que, a pesar de tener la característica de ser poroso, al presentar cambios de temperatura, los poros disminuyen su tamaño, las redes se estrechan y pueden dificultar significativamente la difusión causando un decrecimiento (Aguirre Calvo TR, 2019). En este caso, la integridad y concentración del fago en el medio se vio perjudicada, no siendo la encapsulación, una buena opción el almacenar los fagos encapsulados en ninguna de las 3 condiciones de temperatura. Dhamecha (2019) menciona la amplia gama de aplicaciones terapéuticas que presenta el alginato y la encapsulación de diferentes principios activos útiles para terapias. Las características que aportan a su uso son lo biocompatible, fácil gelificación y la facilidad de derivar a propiedades deseables, que este polímero presenta. Las cadenas M y G (Fig 2) que presentan son esenciales para diseñar geles de alginato estable y compatible con la administración y liberación deseada a la terapia que se destina, en este caso una correcta difusión y protección del fago.

Se requieren estudios de optimización y caracterización para manipular y generar nuevos derivados, aleaciones con propiedades físicas personalizadas para la aplicación específica. De esta forma, fomentando el uso de alginato como un vehículo potencial, en este trabajo, para un delivery correcto como Fagoterapia en acuicultura.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que la encapsulación en perlas de alginato del fago Ch20 puede ser una alternativa para dosificar el fago en medio acuoso, pero muestra además la vida media del fago encapsulado como alternativa para proteger la integridad del fago Ch20 a condiciones de almacenamiento en temperaturas bajo cero.

Todas las características estudiadas y recopiladas en este trabajo son de relevancia para desarrollar estrategias mediante el uso de fagos, determinando adecuadamente los requisitos para su máxima eficiencia.

En base a este trabajo, como proyección se espera que estudios futuros, puedan explorar el encapsulamiento de un coctel de fagos, utilizando una aleación de alginato que permita mayor porosidad, para determinar la posibilidad de aumentar el efecto protector a fagos otorgado por encapsulación para estudios similares en alternativas de aplicación.

## 6. CONCLUSIONES



Los 8 fagos aislados previamente en el laboratorio y caracterizados parcial o completamente en este trabajo son capaces de infectar a *V. alginolyticus* (GV09) según el rango hospedero obtenido.



Solo 2 de los fagos caracterizados en este trabajo con catalogados como altamente virulentos para *V. alginolyticus* (GV09) según su EOP.



Todos los fagos presentan fenotípicamente en sus spots de lisis (halo traslucido alrededor) presencia de Despolimerasas, favorable característica para un fago candidato para Fagoterapia.



A pesar de que los fagos Ch20 y Ca8 en su caracterización fueron bastante similares, su patrón de digestión de genomas revelo que se trata de dos fagos genéticamente diferentes.



El fago Ch20 presenta una actividad lítica frente a la cepa GV09 reduciendo su proliferación y crecimiento en el tiempo, aunque se genera resistencia tras varias horas de infección.



Es posible la encapsulación de fagos líticos en perlas de alginato cálcico



La difusión del fago encapsulado es más factible en una concentración final del 2% de alginato



A pesar de la encapsulación del fago en perlas de alginato, la estabilidad de este a 4, -20 y -80°C posterior a 30 días de almacenamiento, fue nula. Se perdió el título y viabilidad del fago.



La estabilidad del título del fago Ch20 se mantiene dentro de los primeros 15 días de almacenamiento a 4 °C.



El uso de fagos encapsulados como delivery de Fagoterapia contra vibrios en acuicultura es posible gracias a la porosidad de las perlas.



Los resultados dan por cumplido al objetivo general y a los objetivos específicos del presente trabajo.

## 7. REFERENCIAS

- Aguirre Calvo TR, S. P. (2019). Freezing and drying of pink grapefruit-lycopene encapsulated in Ca(II)-alginate beads containing galactomannans. *J Food Sci Technol*, 56(7):3264-3271. doi:doi: 10.1007/s13197-019-03783-w
- APHA, (. A. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21ra ed. United Book Press, Washington, Pp 9–75 a 9–81.
- Atsumi, T. M. (1996). Effect of Viscosity on Swimming gy the Lateral and Polar Flagella of *Vibrio alginolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 178(16): 5024- 5026.
- Bacian, C. V.-L. (2021). Longitudinal Study of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (tdh+and/or trh+) in Two Natural Extraction Areas of *Mytilus chilensis* in Southern Chile. *Frontiers in Microbiology*, 12, 621737.
- Baker-Austin, C. O. (2018). *Vibrio* spp. infections. Nature Reviews Disease Primers. 4(1), 1-19.
- Balebona MC, A. M. (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl Environ Microbiol*, 64(11):4269-75. doi:doi: 10.1128/AEM.64.11.4269-4275.1998
- Banquero F., M. J. (2008). Antibióticos y resistencia a antibióticos en ambientes acuáticos. *actual Opinión Biotecnología*, 19 :260–265. doi:doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- Blasco, L. A.-G. (2019). Combined Use of the Ab105-2φΔCI Lytic Mutant Phage and Different Antibiotics in Clinical Isolates of Multi-Resistant. *Microorganisms*, 7(11). doi:https://doi.org/10.3390/microorganisms7110556
- Buschmann, A. T. (2012). Salmon Aquaculture and Antimicrobial Resistance in the Marine Environment. *PLoS ONE*. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042724
- Champagne, C., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 184-190.
- Citil BE, D. S. (2015). *Vibrio alginolyticus* Associated Chronic Myringitis Acquired in Mediterranean Waters of Turkey. *Case Rep Infect Dis*, doi: 10.1155/2015/187212.

- Concha, C. M. (2021). Characterization of a Novel Variant of the Quinolone-Resistance Gene *qnrB* (*qnrB89*) Carried by a Multi-Drug Resistant *Citrobacter gillenii* Strain Isolated from Farmed Salmon in Chile. *Antibiotics*, 236. doi:<https://doi.org/10.3390/antibiotics10030236>
- Consejo del salmon*. (2022). Obtenido de consejo del salmon: <https://www.consejodelsalmon.cl/informacion-de-la-industria/principales-datos-de-la-industria>
- Costa C, F. G. (2022). Real-Time PCR Protocol for Detection and Quantification of Three Pathogenic Members of the Vibrionaceae Family. *Microorganisms*, 10(10):2060. doi:[doi: 10.3390/microorganisms10102060](https://doi.org/10.3390/microorganisms10102060)
- de la Fuente, M. M. (2015). Bacteriología asociada al cultivo de moluscos en Chile: Avances y perspectivas. *Revista de biología marina y oceanografía*, 50(1), 01-12. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572015000100001>
- Dhamecha D, M. R. (2019). Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: Past, present and future. *Int J Pharm*, 5;569:118627. doi:[doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118627](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118627)
- Diaz, C. (2011). capítulo 5 - Caracterización Microbiológica. En *Microbiología* (págs. 99-116. (103)).
- Doss, J. C. (2017). A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses*, 9(3), 50. doi:<https://doi.org/10.3390/v9030050>
- Estay, M., & Chávez, C. (2015). Decisiones de localización y cambios regulatorios: el caso de la acuicultura en Chile. *Latin american journal of aquatic research*, 43(4), 700-717. doi:<https://dx.doi.org/10.3856/vol43-issue4-fulltext-9>
- FAO. (2022). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Recuperado el 16 de enero de 2022, de «Anuario FAO. Estadísticas de Acuicultura y Pesca 2022» (PDF): <https://www.fao.org/publications/sofia/2022/es/>
- Fernández Espinel, C. F. (2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista peruana de biología*, 24(1), 93-100. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103>
- Fuentes, D. E. (2022). Stress response and virulence factors in bacterial pathogens relevant for Chilean aquaculture: current status and outlook of our knowledge. *Biological Research*, 55, 21. doi:<https://dx.doi.org/10.1186/s40659-022-00391-5>
- Fuenzalida L, H. C. (2006). *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples

- during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile. *Environ Microbiol*, 8(4):675-83. doi:doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00946.x.
- García RL, S. G. (2011). Efficacy of cleaning and disinfection procedures in a zebrafish (*Danio rerio*) facility. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50(6):895-900.
- García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2019). Bacteriophage Production Models: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 1187-. doi:doi:10.3389/fmicb.2019.01187
- Goh, C. H. (2012). Los alginatos como un polímero natural útil para la microencapsulación y aplicaciones terapéuticas. *Polímeros de carbohidratos*, 88 (1), 1-12.
- Gordillo, F., & Barr, J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clin Microbiol Rev*, 32(2):e00066-18. doi:doi: 10.1128/CMR.00066-18
- Gullberg E., C. S. (2011). Selección de bacterias resistentes a concentraciones muy bajas de antibiótico. *Patog de PLoS*, 7 :e1002158. doi:doi: 10.1371/journal.ppat.1002158
- Harper C, L. C. (2011). *The Laboratory Zebrafish*. CRC Press. ISBN-13: 978-1-4398-0744-6.
- Ilomuanya MO, E. N. (2022). Chitosan-Based Microparticle Encapsulated *Acinetobacter baumannii* Phage Cocktail in Hydrogel Matrix for the Management of Multidrug Resistant Chronic Wound Infection. *Turk J Pharm Sci*, 19(2):187-195. doi: doi: 10.4274/tjps.galenos.2021.72547
- J. Colom, M. C.-S.-S. (2017). Microencapsulation with alginate/CaCO<sub>3</sub>: a strategy for improved phage therapy. *Sci. Rep*, 41441.
- Jakočiūnė, D. &. (2018). A Rapid Bacteriophage DNA Extraction Method. *Methods and Protocols*, 1(3), 27. doi:http://dx.doi.org/10.3390/mps1030027
- Kamali moghaddam, M. &. (2014). Fabrication and Properties of Microcapsules and Nanocapsules containing PCM. *Journal of Electrostatics*, http://dx.doi.org/10.1016/j.elstat.2014.10.013.
- Kortright KE, C. B. (2019). Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe*, 25(2):219-23. doi:doi: 10.1016/j.chom.2019.01.014
- Lasa, A. A.-H. (2015). Isolation and identification of *Vibrio toranzoniae* associated with diseased red conger eel (*Genypterus chilensis*) farmed in Chile. *Veterinary Microbiology*, 179(3-4), 327-331.

- Leyton, Y., & Riquelme, C. (2008). Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(3). doi:doi:10.4067/S0718-19572008000300004
- Lozano-Muñoz I, W. J.-M. (January de 2021). Antimicrobial resistance in Chilean marine-farmed salmon: Improving food safety through One Health. *One Health*, 12:100219. doi:doi: 10.1016/j.onehlt.2021.100219
- Lucena-Aguilar G., S.-L. A.-A.-Á.-G.-Q. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and biobanking*, vol 14(4): 264–270. doi:doi: <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Lulijwa R, R. E. (2020). Uso de antibióticos en la acuicultura, políticas y regulaciones, riesgos para la salud y el medio ambiente: una revisión de los 15 principales productores. *Rev Aquac*, 12 :640–663. doi:doi: 10.1111/RAQ.12344
- Ma, Y. &. (2012). Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloids*, 26. 434–440. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.11.017
- Malik DJ, S. I. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv Colloid Interface Sci*, 249:100-133. doi:doi: 10.1016/j.cis.2017.05.014
- Maresca D., D. P. (2016). Microencapsulación de nisina en perlas de alginato mediante tecnología vibratoria: investigación preliminar. *LWT - Ciencia de los alimentos. Tecnología*, 66 436–443.
- Middelboe M., A. C. (2010). Isolation and life cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. *MAVE*, 13:118–133. doi:<https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.118>
- Miranda, C. D. (2018). Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Frontiers in Microbiology. Frontiers in Microbiology*. doi:Miranda, C. D., Godoy, F. A., & Lee, M. R. (2018). Current Status of the Use of An10.3389/fmicb.2018.01284
- Mirzaei, M., & Nilsson, A. (2015). Correction: Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLOS ONE*, 10(5): e0127606. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127606>
- Moreno, a. z. (2005). LA VIDA OBSCURA DE VIBRIO ALGINOLYTICUS. *UNAM*. Obtenido de uam.mx<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art3/art3.htm>
- Muchiutti, G. S. (2019). Cápsulas de alginato para la protección de polifenoles presentes

en el aceite esencial de orégano. *Ciencia, docencia y tecnología*, (59), 297-309. Obtenido de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-17162019000200012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-17162019000200012&lng=es&tlng=es)

- Oechslin, F. (2018). Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*, 10(7). doi:<https://doi.org/10.3390/v10070351>
- O'ryan, r., & pereira, m. (2015). Participatory indicators of sustainability for the salmon industry: the case of chile. *mar. policy*, 51: 322-330.
- Pavón A, R. D.-J.-C. (2022). The High Risk of Bivalve Farming in Coastal Areas With Heavy Metal Pollution and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Chilean Perspective. *Front Cell Infect Microbiol*, 12:867446. doi:doi: 10.3389/fcimb.2022.867446
- Peretz, S. F.-S. (2014). Preparation of Porous Calcium Alginate Beads and Their Use for Adsorption of O-Nitrophenol from Aqueous Solutions.
- Pérez-Reytor D, P. N. (2017). Role of Non-coding Regulatory RNA in the Virulence of Human Pathogenic Vibrios. *Front Microbiol*, 7:2160. doi:doi: 10.3389/fmicb.2016.02160
- Peters, D. L. (2022). Bacteriophage isolation, purification, and characterization techniques against ubiquitous opportunistic pathogens. *Current Protocols*, 2, e594. doi:doi: 10.1002/cpz1.594
- phagesdb.org. (2013). *Phagehunting protocols*. Obtenido de PCI/SDS DNA Extraction: [https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PCI\\_SDS\\_DNA\\_Extraction\\_2.2013.pdf](https://phagesdb.org/media/workflow/protocols/pdfs/PCI_SDS_DNA_Extraction_2.2013.pdf)
- Pires DP, C. S. (2016). Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80(3):523-43. doi:doi: 10.1128/MMBR.00069-15
- Pires, D. P. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2141–2151. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>
- Platt MR, M. R. (1995). The role of chitin in the thermoprotection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Food Protection*, 58(5): 513-514.
- Porcheron, G., & Dozois, C. (2015). Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet Microbiol*, 179(1-2):2-14. doi:doi: 10.1016/j.vetmic.2015.03.024
- Porter, N. T. (2020). Phase-variable capsular polysaccharides and lipoproteins modify bacteriophage susceptibility in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Nature*

*microbiology*, 5(9), 1170-1181. doi:<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0746-5>

- Prada-Peñaranda, C. H.-M.-V.-B.-F.-F.-J. (2014). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. Perspectivas en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 43. doi:[doi:10.11144/javeriana.sc20-1.faci](https://doi.org/10.11144/javeriana.sc20-1.faci)
- Preena PG, S. T. (2020). Resistencia a los antimicrobianos en la acuicultura: una crisis preocupante. *Biología (Bratisl)*, 75 :1497–1517. doi:[doi:10.2478/S11756-020-00456-4](https://doi.org/10.2478/S11756-020-00456-4)
- Ramig RF, G. S. (2019). Constructing and Characterizing Bacteriophage Libraries for Phage Therapy of Human Infections. *Front. Microbiol*, 10:2537. doi:[doi:10.3389/fmicb.2019.02537](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02537)
- Reed B, J. M. (2011). Guidance on the housing and care of Zebrafish (*Danio rerio*). *Research Animals Department, Science Group, RSPCA*. Obtenido de <https://www.aaalac.org/accreditation/refresources/zebrafishreference.pdf>
- Reina J, R. N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? [Phage therapy, an alternative to antibiotic therapy?]. *Rev Esp Quimioter*, 31(2):101-104. doi:[PMID: 29451376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29451376/); [PMCID: PMC6159377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6159377/)
- Remminghorst U., R. B. (2006). Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett*, 28:1701–1712. doi:[doi:10.1007/s10529-006-9156-x](https://doi.org/10.1007/s10529-006-9156-x)
- Rojas, R. M. (2015). Genome sequence of *Vibrio* VPAP30, isolated from an episode of massive mortality of reared larvae of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Genome Announcements*, 3(4), e00745-15.
- Rojas, R., Blanco-Hortas, A., Kehlet-Delgado, H., Lema, A., Miranda, C. D., Romero, J., . . . Dubert., J. (2021). First description outside Europe of the emergent pathogen *Vibrio europaeus* in shellfish aquaculture. *Journal of Invertebrate Pathology*. doi:[doi:10.1016/j.jip.2021.107542](https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107542)
- Saltz, A., & Kandalam, U. (2016). Células madre mesenquimales y microportadores de alginato para la ingeniería de tejido óseo craneofacial: una revisión. *J. Biomédica. Mate. Res. A*, 104 :1276–1284. doi:[doi:10.1002/jbm.a.35647](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35647).
- Schlenk D., G. J. (1998). Eficacia del sulfato de cobre para el tratamiento de la ictioftiriasis en el bagre de canal. *J. Aquat. Animación Salud*, 10 :390–396. doi:[doi:10.1577/1548-8667](https://doi.org/10.1577/1548-8667)
- Sepúlveda, M. I. (2013). Escaped farmed salmon and trout in Chile: incidence, impacts, and the need for an ecosystem view. *Aquacult. Environ. Interact*, 4: 273-283.
- Sernapesca. (2021). *Sernapesca*. Obtenido de

[http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/boletin\\_sectorial\\_region\\_de\\_los\\_lagos\\_-\\_1er\\_trimestre\\_2022.pdf](http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/boletin_sectorial_region_de_los_lagos_-_1er_trimestre_2022.pdf)

- Shao, Y. &. (2008). Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *Genetics*, 180(1), 471-482. doi:<https://doi.org/10.1534/genetics.108.090100>
- Sodhi, M. S. (2021). Research Opportunities in Preparing Supply Chains of Essential Goods for Future Pandemics. doi:[dx.doi.org/10.2139/ssrn.3861207](https://doi.org/10.2139/ssrn.3861207)
- Solís A., U. H. (2016). Genetic characterization of ØVC8 lytic phage for *Vibrio cholerae* O1. *Virology Journal*, 13-47. doi:<https://doi.org/10.1186/s12985-016-0490-x>
- Subpesca. (2022). *Informe sectorial de pesca y acuicultura*. Obtenido de [https://www.subpesca.cl/portal/616/articles-115903\\_documento.pdf](https://www.subpesca.cl/portal/616/articles-115903_documento.pdf)
- Sun R, C. J. (2020). Antibióticos y seguridad alimentaria en acuicultura. *J Química alimentaria agrícola*, 68 :11908–11919. doi:[10.1021/ACS.JAFC.0C03996](https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.0C03996)/ASSET/IMAGES/ACS.JAFC.0C03996.SOCIAL.JPEG\_V03.
- Sung Lee H., C. S. (2014). *Vibrio vulnificus* bacteriophage SSP002 as a possible biocontrol agent. *Appl Environ Microbiol*, 80(2):515-24. doi:[10.1128/AEM.02675-13](https://doi.org/10.1128/AEM.02675-13)
- Svircev, A. R. (2018). Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses*, 10(5). doi:<https://doi.org/10.3390/v10050218>
- Van Twest, R. &. (2009). Bacteriophage Enrichment from Water and Soil. En M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski (Eds.) *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. *Humana Press*, (pp. 15–21). doi:[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_2)
- Wang J, D. Q. (2021). *Vibrio alginolyticus* Triggers Inflammatory Response in Mouse Peritoneal Macrophages via Activation of NLRP3 Inflammasome. *Front Cell Infect Microbiol*, 11:769777. doi:[10.3389/fcimb.2021.769777](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.769777)
- Wang, C. L. (2019). Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN1 genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice. *Research in microbiology*, 170(3), 156- 164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.01.003>
- Wasik, B., & Turner, P. (2013). On the biological success of viruses. *Annu Rev Microbiol*, 67:519-41. doi:[10.1146/annurev-micro-090110-102833](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102833)
- Watts JEM, S. H. (2017). The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Mar Drugs*, 15(6):158. doi:[10.3390/md15060158](https://doi.org/10.3390/md15060158)

10.3390/md15060158

- Xiao, W. &.-m.-H. (2019). An Alginate Hydrogel Modified with a Ligand Interacting with  $\alpha3\beta1$  Integrin Receptor Promotes the Differentiation of 3D Neural Spheroids towards Oligodendrocytes in vitro. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11. doi:11. 10.1021/acsami.8b19438.
- Yang Y, D. H. (2022). Encapsulation and delivery of phage as a novel method for gut flora manipulation in situ: A review. *J Control Release*, 353:634-649. doi:doi: 10.1016/j.jconrel.2022.11.048
- Yue Xiao, P. H. (2022). Influencing factors on the preservation of lytic bacteriophage VP3. *Biosafety and Health, Volume 4, Issue 5*, Pages 314-320, ISSN 2590-0536. doi:https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2022.06.004
- Zheng HY, Y. L. (2021). Population genomics study of *Vibrio alginolyticus*. *Yi Chuan*, 43(4):350-361. doi:doi: 10.16288/j.ycz.21-061
- Zhou Y, X. D. (2022). Encapsulation of Salmonella phage SL01 in alginate/carrageenan microcapsules as a delivery system and its application in vitro. *Front Microbiol*, 13:906103. doi:doi: 10.3389/fmicb.2022.906103