



UNL

Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Ingeniería Ambiental

**Cultivo de amebas del género *Acanthamoeba* ATCC 30010 con enfoque
al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño**

**Trabajo de Integración Curricular
previa a la
obtención del título de Ingeniera Ambiental**

AUTOR:

Adamary Carolina Vásquez Tituana

DIRECTOR:

Ing. Daniela Alejandra Román Cáceres., Mg.Sc.

Loja – Ecuador

2024



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Sistema de Información Académico
Administrativo y Financiero - SIAAF

CERTIFICADO DE CULMINACIÓN Y APROBACIÓN DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Yo, **Roman Caceres Daniela Alejandra**, director del Trabajo de Integración Curricular denominado **Cultivo de amebas del género Acanthamoeba ATCC 30010 con enfoque al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño**, perteneciente al estudiante **Adamary Carolina Vasquez Tituana**, con cédula de identidad N° **1150007290**. Certifico que luego de haber dirigido el **Trabajo de Integración Curricular** se encuentra concluido, aprobado y está en condiciones para ser presentado ante las instancias correspondientes.

Es lo que puedo certificar en honor a la verdad, a fin de que, de así considerarlo pertinente, el/la señor/a docente de la asignatura de **Integración Curricular**, proceda al registro del mismo en el Sistema de Gestión Académico como parte de los requisitos de acreditación de la Unidad de Integración Curricular del mencionado estudiante.

Loja, 23 de Agosto de 2023



Firmado electrónicamente por:
DANIELA ALEJANDRA
ROMAN CACERES

F) -----
**DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR**



Certificado TIC/TT.: UNL-2023-000585

Autoría

Yo, **Adamary Carolina Vásquez Tituana**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.



Firma:

Cédula de identidad: 1150007290

Fecha: 07 de febrero de 2024

Correo electrónico: adamary.vasquez@unl.edu.ec

Teléfono: 0980151197

Carta de autorización por parte de la autora para la consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.

Yo **Adamary Carolina Vásquez Tituana**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Cultivo de amebas del género *Acanthamoeba* ATCC 30010 con enfoque al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño**, como requisito para optar por el título de **Ingeniera Ambiental**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja a los siete días del mes de febrero del dos mil veinticuatro.



Firma:

Autora: Adamary Carolina Vásquez Tituana

Cédula: 1150007290

Dirección: Av. Pablo Palacios y Edmundo Samaniego

Correo electrónico: adamary.vasquez@unl.edu.ec

Teléfono: 0980151197

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director del Trabajo de Integración Curricular: Ing. Daniela Román Cáceres Mg.Sc

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a cada persona que ha sido pilar fundamental en todo este camino académico. A mis padres, Luis Vásquez y Martha Tituana, que con su apoyo incondicional y sacrificio han sido un motor para mi vida; cada paso que he emprendido lo he dado con la seguridad de que su amor y confianza me respaldan. A mis hermanos, Rolando Vásquez y Cristian Vásquez, que con su ejemplo y aliento me han ilustrado la importancia de conseguir lo que anhelo. Sus palabras de ánimo en cada momento y su ayuda continua han impulsado mi vida estudiantil.

A mis sobrinos, Ian, Luis Felipe y Zamir, que con sus miradas llenas de amor y curiosidad me recuerdan el motivo por el que deseo perseverar; quiero que sean testigos de que los sueños pueden realizarse con esfuerzo y cariño. A mi cuñada y prima, Anahi López y Ariana Tituana, que con su complicidad y compañía me han llenado de positividad durante todo este proceso. A mi mascota, Toby, que con su lealtad ha sido un compañero inigualable de largas noches de estudio.

A mi novio, Francisco Orozco, que ha estado a mi lado en todo este viaje. Su paciencia y comprensión fueron un refugio en todos los momentos agotadores y llenos de estrés, su amor ha sido una fuerza que me ha incitado a continuar.

A mi tutora de tesis, Daniela Román, por su paciencia, guía y amistad. A mis amigas Katherine y Jackelin, por su constante apoyo, alegría contagiosa y cariño. Las tres lograron que esto sea más llevadero.

Adamary Carolina Vásquez Tituana

Agradecimiento

A Dios por permitirme culminar este proceso. A mis padres por acompañarme siempre y por su lucha constante para que cada sueño de nuestra familia se cumpla. Agradezco a mis hermanos, Rolando y Cristian por no dejarme sola, por animarme y apoyarme durante todos estos años. A mi pareja, Francisco, por sus palabras de aliento, comprensión y motivación en cada uno de mis pasos.

A mi tutora de tesis, Daniela Román, que con su dedicación, orientación y pasión por la investigación ha sido quien ha guiado mi camino con paciencia y cariño en este proceso. A la docente, Ana Claudia Samaniego, quien constantemente me orientó, además de dedicar su tiempo y experiencia a este trabajo. A mi grupo de investigación “Genética y Biología Molecular”; Daniela, Jorge, Ana Claudia, Fernanda y Katherine, mis queridos amigos, fueron parte esencial en la concertación del estudio, la dinámica e intercambio de conocimientos. Al Laboratorio de Análisis Químico por brindarme las herramientas y el apoyo técnico necesario. A los docentes de la carrera de Ingeniería Ambiental, Daniela Román, Lissett Carrión, Aurita Paucar, Carlos Chuncho y Christian Mendoza, quienes han marcado de forma imborrable en mi formación, sus enseñanzas y profundo compromiso fueron cruciales en mi formación tanto personal como profesional.

A mis amigos y compañeros con los cuales se tejió una red de apoyo sólido durante estos años.

Adamary Carolina Vásquez Tituana

Índice de contenidos

| | |
|--|-----|
| Portada | i |
| Certificación | ii |
| Autoría | iii |
| Carta de autorización | iv |
| Dedicatoria | v |
| Agradecimiento | vi |
| Índice de contenidos | vii |
| Índice de tablas | x |
| Índice de figuras | x |
| Índice de anexos | x |
| 1. Título | 1 |
| 2. Resumen | 2 |
| Abstract | 3 |
| 3. Introducción | 4 |
| 4. Marco Teórico | 6 |
| 4.1. Amebas de vida libre (FLA) | 6 |
| 4.1.1. <i>Género Acanthamoeba</i> | 7 |
| 4.1.2. <i>Ciclo de vida de Acanthamoeba</i> | 7 |
| 4.1.3. <i>Participación en los ecosistemas</i> | 8 |
| 4.2. Virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCLDVs)..... | 8 |
| 4.2.1. <i>Virus NCLDs y sus hospederos</i> | 9 |
| 4.2.2. <i>Aislamiento de Virus NCLDs</i> | 10 |
| 4.2.3. <i>Rol ambiental</i> | 11 |
| 5. Metodología | 11 |
| 5.1. Área de estudio | 11 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 5.2. | Diseño de investigación..... | 12 |
| 5.3. | Metodología para la obtención de cultivos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 en condiciones de laboratorio..... | 13 |
| 5.3.1. | <i>Obtención de cepas A. castellanii ATCC 30010</i> | 13 |
| 5.3.2. | <i>Medios de cultivo</i> | 13 |
| 5.3.3. | <i>Cultivo de Escherichia coli ATCC 25922 para los cultivos monoxénicos de Acanthamoeba castellanii ATCC 30010</i> | 13 |
| 5.3.4. | <i>Inactivación de Escherichia coli ATCC 25922 para los cultivos monoxénicos de Acanthamoeba castellanii ATCC 30010</i> | 14 |
| 5.3.5. | <i>Cultivo axénico y monoxénico de Acanthamoeba castellanii ATCC 30010</i> | 14 |
| 5.3.6. | <i>Conteo de células de Acanthamoeba castellanii ATCC 30010</i> | 15 |
| 5.3.7. | <i>Almacenamiento de Acanthamoeba castellanii ATCC 30010</i> | 16 |
| 5.4. | Metodología para desarrollar colecciones de cultivos monoxénicos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 y virus nucleocitoplasmáticos aislados de sistemas lacustres de la ciudad de Loja | 17 |
| 5.4.1. | <i>Obtención de muestras de agua</i> | 17 |
| 5.4.2. | <i>Cocultivo</i> | 17 |
| 5.5. | Metodología para objetivo determinar la presencia física de virus hospederos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 mediante microscopía | 18 |
| 5.5.1. | <i>Observación de efectos citopáticos por microscopía</i> | 18 |
| 6. | Resultados | 19 |
| 6.1. | Obtención de cultivos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 en condiciones de laboratorio | 19 |
| 6.2. | Obtención de colecciones de cultivos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 y virus nucleocitoplasmáticos aislados de sistemas lacustres de la ciudad de Loja..... | 21 |
| 6.3. | Presencia física de virus hospederos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 mediante microscopía..... | 25 |
| 7. | Discusión | 27 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 8. Conclusiones | 32 |
| 9. Recomendaciones | 32 |
| 10. Bibliografía | 33 |
| 11. Anexos | 40 |

Índice de tablas:

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Parámetros obtenidos de las lagunas muestreadas. | 21 |
| Tabla 2. Efectos citopáticos encontrados en las infecciones de <i>A. castellanii</i> ATCC 30010 . | 26 |
| Tabla 3. Reactivos para la preparación de PYG..... | 41 |
| Tabla 4. Reactivos para la preparación de la solución salina amebal | 43 |
| Tabla 5. Reactivos y solución para la preparación del agar no nutritivo | 44 |
| Tabla 6. Antibióticos y solución a emplearse en el cocultivo | 50 |

Índice de figuras:

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sitios de muestreo en la ciudad de Loja | 12 |
| Figura 2. Cámara de Neubauer..... | 16 |
| Figura 3. Configuración de las infecciones y controles en la placa de 96 pocillos..... | 18 |
| Figura 4. A: <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 vista en microscopio invertido en lente 10x. B: <i>A. castellanii</i> ATCC 30010 en las rejillas de la cámara de Neubauer. C: <i>A. castellanii</i> ATCC 30010 vista en microscopio invertido en lente 40x..... | 20 |
| Figura 5. Línea de tiempo (0,24,96 y 120 horas) de la infección de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC 30010 provocada por la posible presencia de virus gigantes contenidos en 4 cuerpos de agua de la ciudad de Loja. | 25 |
| Figura 6. Ejemplo. Configuración de las infecciones y controles en la placa de 96 pocillos . | 51 |

Índice de anexos:

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Protocolo para cultivos de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC30010 | 41 |
| Anexo 2. Protocolo para la infección de <i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC30010 con virus gigantes presentes en cuerpos lacustres: Método de cocultivo | 49 |
| Anexo 3. Cultivos de <i>A. castellanii</i> ATCC 30010 | 52 |
| Anexo 4. Certificado de traducción del resumen | 53 |

1. Título

Cultivo de amebas del género *Acanthamoeba* ATCC 30010 con enfoque al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño

2. Resumen

El género *Acanthamoeba* comprende diferentes especies de amebas de vida libre, se aíslan con frecuencia de distintas fuentes ambientales como agua y suelo; y a menudo son usados en laboratorio para el estudio de otros organismos. Amebas como *Acanthamoeba castellanii* son un importante reservorio de virus, conocidos por proteger a estos organismos de duras condiciones ambientales, considerándose un hospedador viral por excelencia, en particular de virus gigantes, los cuales pueden ser aislados mediante la inoculación directa de cultivos de *A. castellanii* con muestras ambientales. En este estudio, se ha establecido protocolos de cultivo en condiciones de laboratorio para *A. castellanii* ATCC 30010 a fin de comprender la respuesta de estos microorganismos a interacciones de depredación con virus. Se desarrolló y aplicó un enfoque para la viabilidad de este género en medio líquido (PYG) y medio sólido no nutritivo utilizando como sustrato *Escherichia coli* ATCC 25922. Para la identificación de virus gigantes se trabaja por medio de cocultivos, donde se inoculó 100 µl de células de *A. castellanii* en medio PYG enriquecido con antibióticos y muestras de agua de lagunas de la ciudad de Loja, en placas de 96 pocillos. Se establecieron cultivos axénicos de amebas, donde se verificó el estado en trofozoítos de las células, así como la presencia de vacuolas, obteniéndose entre 90-100 % de confluencia celular. En cuanto a los cocultivos, se logró observar efectos citopáticos en las células infectadas por la potencial presencia de virus gigantes en las lagunas muestreadas. Para estudios posteriores se podría llegar a nivel molecular y determinar las cepas aisladas, además de determinar las interacciones virus-hospedero, sus razones evolutivas e implicaciones ambientales.

Palabras claves: *Acanthamoeba castellanii*, virus gigantes, cultivos axénicos, cocultivo.

Abstract

The genus *Acanthamoeba* comprises different species of free-living amoebas, often isolated from various environmental sources such as water and soil. They are frequently used in laboratories for studying other organisms. Amoebas like *Acanthamoeba Castellanii* are reservoirs for viruses, known for protecting these organisms from harsh environmental conditions. They are considered excellent viral hosts, particularly for giant viruses, which can be isolated by directly inoculating *A. Castellanii* cultures with environmental samples. In this study, laboratory cultivation protocols were established for *A. Castellanii* ATCC 30010 to understand the response of these microorganisms to predation interactions with viruses. An approach for the viability of this genus in liquid (PYG) and non-nutrient solid medium using *Escherichia coli* ATCC 25922 as a substrate was developed and applied. For identification of giant viruses, cocultures were conducted by inoculating 100 µl of *A. castellanii* cells in PYG medium enriched with antibiotics and water samples from lagoons in the city of Loja, in 96-well plates. Axenic cultures of amoebas were established, verifying the trophozoite state of cells and the presence of vacuoles, achieving 90-100% cell confluence. Regarding cocultures, cytopathic effects were observed in cells infected by the presence of giant viruses in the sampled lagoons. For further studies, a molecular level examination could be conducted to determine the isolated strains, along with exploring virus-host interactions, their evolutionary reasons, and environmental implications.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*, giant viruses, axenic cultures, coculture.

3. Introducción

Los virus son entes replicantes envueltos en proteínas que se encuentran ampliamente distribuidos en el planeta Tierra (Mateu, 2013). Intervienen en la evolución de sus hospederos y son parte de algunos procesos ecológicos; sin embargo, al ser los virus muy diversos aún rondan en lo desconocido (Rossmann, 2013). Los virus están sujetos a mutaciones muy frecuentes, lo que les confiere resistencia a ciertas condiciones ambientales (Labadie et al., 2020).

Gran parte de la diversidad de virus, se describe sólo para aquellas especies con tamaños menores (≈ 20 nm) (Louten, 2016), con su genoma que se rige a la codificación de las funciones mínimas requeridas para la replicación (Louten, 2016). Pese a ello, existe un extenso grupo que se clasifican como virus gigantes, cuyo primer ejemplar fue descubierto en el 2003, el mismo infectaba a *Acanthamoeba polyphaga* y fue clasificado como un “Mimivirus”, con un diámetro de 500 nm. Tras algunos estudios se ha demostrado que los mimivirus, y otros virus gigantes, son parte de un grupo viral más diverso llamado virus de ADN nucleocitoplasmático de gran tamaño (NCLDVs) (Abrahão et al., 2014; Aherfi et al., 2016).

Los NCLDVs son ubicuos, es decir, se los encuentra en varios ambientes, nichos ecológicos, localizaciones geográficas, muestras humanas; e inclusive en sistemas artificiales como torres de enfriamiento y lentes de contacto (Aherfi et al., 2016; Boratto et al., 2020; Pagnier et al., 2013). En tanto que, la ubicuidad de los virus gigantes indica que los mismos son agentes ecológicos (Aherfi et al., 2016; Boratto et al., 2020; Campos et al., 2014; Pagnier et al., 2013) a los cuales se les atribuye algunas funciones dentro del ambiente como la eliminación de algas en cuerpos de agua, la intervención en ciclos biogeoquímicos y en los ciclos naturales de otros organismos (Brandes y Linial, 2019; Stough et al., 2019; Yamada, 2011).

El interés de los investigadores por los virus gigantes y sus hospederos ha crecido exponencialmente (Brandes y Linial, 2019). Las características de estos organismos son excepcionales, y los estudios respecto a estas singularidades han contribuido a distintos campos de la ciencia como la genética y la biología molecular, pero también a forjar bases acerca de razones evolutivas de los virus y sus más grandes hospederos, las amebas del género *Acanthamoeba* (Abrahão et al., 2014; Yamada, 2011), las cuales pertenecen al reino de los protozoos y se encuentran en grandes cantidades en el suelo y agua. La presencia de protozoos para el estudio de virus de gran tamaño es casi imprescindible, por lo que la importancia de desarrollar métodos de cocultivo para el cultivo de *Acanthamoeba* se ha convertido en una

exigencia en los laboratorios que estudian a diferentes organismos (Axelsson-Olsson et al., 2009). Además, amebas como *Acanthamoeba castellanii* se consideran como un importante reservorio de estos virus, conocida por protegerlos de duras condiciones ambientales, ya que algunos virus tienen una relación parasítica bien establecida (Machado et al., 2022; Oliveira et al., 2019). Es evidente la necesidad de aislar otros virus con sus huéspedes para contribuir a la información sobre sus relaciones ecológicas y evolutivas. Además, no existen protocolos de laboratorio completos que den resultados eficientes como el rápido crecimiento, bajo costo e instrumentos de uso accesible, que abarquen desde la preparación de medios de cultivo, cocultivo, su almacenamiento y los cultivos axénicos.

En los últimos años, se han probado y mejorado técnicas como la de cocultivo acentuando en la infección de amebas (Pagnier et al., 2013); algunas de las metodologías establecidas incluyen la mejora de los procesos a través del uso de antibióticos para minimizar la contaminación bacteriana en medios de cultivo que contienen únicamente amebas, además de estrategias de detección preliminar de las muestras ambientales por medio de métodos moleculares (Khalil, Andreani, et al., 2016; Pagnier et al., 2013). Con lo cual se ha podido aislar virus en distintos ambientes del mundo. Precisamente en Latinoamérica se encontró y secuenció a Sambavirus y Yaravirus, las cuales infectaban a *A. castellanii* (Boratto et al., 2020; Campos et al., 2014); estos descubrimientos reafirman la hipótesis de que dichos virus y sus hospederos son ubicuos, lo cual además permite continuar con el desarrollo de la hipótesis sobre el origen biológico de los virus gigantes enfatizando en el debate acerca de la necesidad de la incorporación de un cuarto dominio de vida (Yamada, 2011; Yutin et al., 2014). Los nuevos aislamientos y estudios sobre sus hospederos (*Acanthamoeba*) ayudará al registro de distribución de virus gigantes en el medio ambiente, sus posibles funciones ecosistémicas y la determinación de su pangenoma.

Ecuador se caracteriza por ser un país que alberga gran diversidad biológica y genética, por lo que se espera que albergue gran cantidad de NCLDV's que no han sido descubiertos ni descritos todavía, pues las investigaciones acerca de cultivos con amebas, aislamiento, identificación y secuenciación de virus gigantes son aún un desafío para los científicos del país. Se conoce que el cocultivo con protozoos es una de las principales herramientas para el aislamiento de virus gigantes (Khalil, Andreani, et al., 2016; Pagnier et al., 2013), lo que lleva a que exista un mayor interés y esfuerzo en mejorar técnicas y estudios sobre protocolos de cultivo utilizando el género de ameba *Acanthamoeba*. En tanto que este proyecto se enfoca en

la siguiente pregunta de investigación, ¿*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 es eficiente en cocultivos para la identificación de virus de ADN de gran tamaño?

En tanto que, en el presente estudio se pretende cultivar *Acanthamoeba* ATCC 30010 dando un enfoque al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño. Por lo que, a su vez se precisa: i) Aplicar la metodología para la obtención de cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en condiciones de laboratorio; ii) Desarrollar colecciones de cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 y virus nucleocitoplasmáticos aislados de sistemas lacustres de la ciudad de Loja; y, determinar la presencia física de virus hospederos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 mediante microscopía.

4. Marco Teórico

4.1. Amebas de vida libre (FLA)

Las amebas de vida libre o FLA por sus siglas en inglés, son protistas unicelulares que pueden vivir en cualquier ambiente sin la necesidad de un huésped para sobrevivir (Gallegos-Neyra et al., 2014). El grupo de las FLA consta de distintos subgrupos de amebas con varios representantes, además son ecológicamente importantes ya que regulan las poblaciones microbianas (Siddiqui y Khan, 2012a) al alimentarse o asociarse con bacterias, cianobacterias, diatomeas y hongos. Además, géneros como *Acanthamoeba* sp., *Balamuthia* sp., *Hartmannella* sp., *Naegleria* sp., y *Sappina* sp., son parásitos de humanos, por lo que las amebas también tienen importancia médica y científica (Gallegos-Neyra et al., 2014).

La manera en que las FLA se propagan en cualquier ambiente y les es posible sobrevivir, en cierta manera depende del alimento disponible, que regirá su tamaño variando de 6 μm a 1 mm, pero además se atribuye su potencial a dos estrategias principales: 1) formar quistes que les confiere resistencia para protegerse y 2) producir mayor cantidad de individuos con un tamaño reducido (Rodríguez-Zaragoza, 2008). Por ejemplo, en ambientes marinos los géneros que mejor se han adaptado son: *Acanthamoeba*, *Cydonella*, *Paramoeba* y *Vexillifera*, pero solamente *Acanthamoeba* es capaz de sobrevivir en medios acuáticos marinos y terrestres y suelos, debido a su tolerancia a cambios bruscos de osmolaridad (Siddiqui y Khan, 2012a) y a su forma de quiste que le otorga resistencia a presiones ambientales (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

4.1.1. Género *Acanthamoeba*

Acanthamoeba viene de la palabra griega “acanto” que quiere decir picos, unida a “ameba” para resaltar la presencia de estructuras en forma de espinas (acanthopodia) en su superficie que la asemeja a una estrella (Gallegos-Neyra et al., 2014). *Acanthamoeba* es un protista oportunista que se distribuye ampliamente en el ambiente (Marciano-Cabral y Cabral, 2003) y contiene una o más vacuolas contráctiles prominentes, cuya función es expulsar agua para la regulación osmótica. Otros tipos de vacuolas en el citoplasma incluyen lisosomas, vacuolas digestivas y una gran cantidad de vacuolas con glucógeno. La membrana plasmática está compuesta en un 33 % de proteínas, 25 % de fosfolípidos, 13 % de esteroides y 29 % de lipofosforoglucanos (Siddiqui y Khan, 2012a).

La forma de movimiento de *Acanthamoeba* es similar tanto en ambientes sólidos como en la interfaz agua-aire. Las fuerzas de adhesión desarrolladas entre *Acanthamoeba* y el medio agua-aire son mayores que la gravedad y, por lo tanto, las amebas también se transportan pasivamente sin despegarse de la superficie del agua (Preston et al., 2001). Los microfilamentos de actina se concentran más justo debajo de la membrana plasmática y son responsables de resistir la tensión y formar protuberancias citoplasmáticas (Svitkina, 2018).

Una de las especies ampliamente estudiadas de este género es *Acanthamoeba castellanii*, la cual se considera como un miembro destacado de las amebas de vida libre, pues en los suelos interviene como un enlace entre el macrocosmos y el microcosmos, donde actúa como uno de los más importantes depredadores de microorganismos como las bacterias (Rodríguez-Zaragoza, 2008). Las bacterias presentes en la rizosfera juegan un papel fundamental al fijar el nitrógeno y favorecer el crecimiento de las raíces de ciertas especies vegetales. En tanto que, cuando las amebas interactúan con estas bacterias, se genera un efecto que estimula el crecimiento de las plantas y promueve el ciclo de nutrientes (Bonkowski, 2004). *A. castellanii* también se encuentra distribuida en agua dulce y ambientes marinos, entre otros nichos en ambientes urbanizados, como lo son los sistemas de saneamiento como alcantarillados (Shabardina et al., 2018).

4.1.2. Ciclo de vida de *Acanthamoeba*

El género *Acanthamoeba* posee dos etapas bien definidas en su ciclo de vida, una de ellas es la de trofozoíto vegetativo en la cual su diámetro puede estar entre 15-45 μm (Pérez et al., 2006); por otro lado, la otra etapa es la de quiste latente con un diámetro de 13-23 μm . A lo largo de la etapa de trofozoíto (griego "tropho" = "nutrir"), *Acanthamoeba* se nutre de microbios u otras partículas orgánicas para de este modo dividirse mitóticamente en

condiciones idóneas: temperatura de 30 °C y un pH neutro. La exhibición a condiciones extremas de este género trae como consecuencia una diferenciación celular en una estructura de quiste de pared doble. Las paredes externas están compuestas por polisacáridos y proteínas, al tiempo que la pared interna consiste en celulosa. Las dos paredes están típicamente distanciadas por un espacio; sin embargo, hay excepciones en ciertos puntos donde constituyen opérculos en el centro de los ostiolas (Siddiqui y Khan, 2012a).

4.1.3. Participación en los ecosistemas

Las amebas tienen un lugar importante en el flujo energético de comunidades microbianas acuáticas y terrestres, ya que se alimentan y asocian con virus, bacterias, cianobacterias, diatomeas y hongos (Rayamajhee et al., 2022). *Acanthamoeba* es un organismo heterótrofo, que puede captar nutrientes al consumir materia orgánica disuelta o fagocitar bacterias, otros microbios y material particulado, lo que las convierte en los reguladores de las poblaciones bacterianas al alimentarse de su biomasa y de partículas de materia orgánica en suspensión (Siddiqui y Khan, 2012b).

Las bacterias degradan sin intermediarios los materiales orgánicos, pero son ineficientes para liberar minerales asimilables de su propia masa. Entonces, las amebas tienen un rol en el ciclo de los nutrientes, ya que consumen a los descomponedores primarios y liberan nutrientes minerales atrapados en su biomasa (Bonkowski, 2004). De esta manera, las amebas contribuyen al aumento en la tasa de transformación y asimilación del fósforo y nitrógeno, nutrientes que de otro modo permanecerían inaccesibles para el ambiente, y pasan a ser aprovechados por suelo y para mejorar la obtención de biomasa vegetal (Bonkowski, 2004; Siddiqui y Khan, 2012a).

Además, los suelos con *Acanthamoeba* y poblaciones de bacterias mostraron una mineralización significativamente mayor de carbono, nitrógeno y fósforo versus suelo que únicamente presenta bacterias. Cuando el carbono era limitante, *Acanthamoeba* era casi enteramente responsable de la mineralización del nitrógeno, con bacterias *Pseudomonas paucimobilis* contribuyendo a este proceso (Siddiqui y Khan, 2012a).

4.2. Virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño (NCLDVs)

Los virus son excepcionalmente diversos y experimentan cambios rápidos, por lo que es imposible construir un árbol de linaje ancestral para el mundo viral completo (Yamada, 2011). Por ello, las familias de virus se clasifican de acuerdo con la naturaleza de su material genético, modo de replicación, patogenicidad y propiedades estructurales (Koonin y Yutin,

2019). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) propone una clasificación taxonómica de 144 familias y 1670 géneros, aunque muchos virus no entren en la clasificación o aún no se hayan aislado.

La inspección de los genomas virales revela que la mayoría de los virus conocidos tienen genomas que codifican sólo unas pocas proteínas, el 69 % de todos los virus conocidos tienen menos de 10 proteínas codificadas en sus genomas (Brandes y Linial, 2019), posiblemente para maximizar su tasa de replicación y otros parámetros que hagan la infección más óptima (Tang, 2020). Pero hay un porcentaje considerable de virus más grandes en el otro extremo de la distribución, con cientos de genes, considerados como virus gigantes (Yamada, 2011). Todos los virus gigantes pertenecen a la superfamilia de virus nucleocitoplasmáticos de ADN grande (NCLDV) (Schulz et al., 2020), que se expandió sustancialmente tras los descubrimientos de los virus gigantes a partir de 2003 (La Scola et al., 2003). La superfamilia NCLDV ha estado tradicionalmente compuesta por 5 familias, para las cuales se ha propuesto un ancestro común (Brandes y Linial, 2019).

Tras la inclusión de nuevos grupos de virus gigantes como Mimiiviradae, Pandoravirus y Marseillevirus en la superfamilia NCLDV, se han propuesto otros modelos para la evolución de virus gigantes. Como el modelo reductivo que menciona que un genoma celular ancestral se redujo de tamaño llevándolo a la dependencia del genoma resultante de las células huésped (Brandes y Linial, 2019; Oliveira et al., 2019). O el modelo de expansión que es más aceptado donde se dice que los virus gigantes actuales se originaron a partir de virus ancestrales más pequeños que transportan solo unas docenas de genes y a través de duplicaciones y transferencia horizontal de genes (HGT), se han expandido y diversificado rápidamente (Brandes y Linial, 2019; Schulz et al., 2020). Otras características específicas de los virus gigantes son las formas y simetrías de los viriones, la participación nuclear, la duración del ciclo de infección y las etapas del ensamblaje del virión (Koonin y Yutin, 2019).

4.2.1. *Virus NCLDs y sus hospederos*

Los huéspedes reservorios de los aislamientos recientes incluyen principalmente protozoos como amebas. El hospedador ameba, es considerado como el recipiente perfecto para el intercambio de ADN entre el huésped y el hospedador (Oliveira et al., 2019). La mayoría de genes en virus gigantes y específicamente Mimiiviridae, se han originado a partir de las células que parasitan como amebas y bacterias. Según los árboles filogenéticos se sugiere que el espectro de huéspedes virales puede ser mayor de lo previsto, incluidas especies aún desconocidas (Abrahão et al., 2014).

Todos los virus gigantes que infectan a las amebas dependen de la fagocitosis específica del hospedador de las amebas (Oliveira et al., 2019). Curiosamente, una condición necesaria para la fagocitosis es un tamaño de partícula mínimo (0,6 μm), ya que las amebas se alimentan naturalmente de bacterias. Es probable que este tamaño mínimo para inducir la fagocitosis se haya convertido en una fuerza impulsora evolutiva para los virus gigantes (Abergel et al., 2015; Claverie y Abergel, 2009). Los virus gigantes no solo comparten el proceso de entrada celular, cuando salen de las células hospedadoras durante la lisis, se liberan hasta 1000 viriones de cada hospedador lisado a través de la fusión de membranas y la exocitosis activa, que son mecanismos de salida relativamente raros en los virus (Abergel et al., 2015).

4.2.2. Aislamiento de Virus NCLDs

Desde el aislamiento de Mimivirus, el primer virus gigante descubierto, que infectaba a *Acanthamoeba polyphaga* (La Scola et al., 2003; Pagnier et al., 2013), se han aislado una serie de grupos de virus gigantes que infectan amebas, entre los que están Marseillevirus, Pandoravirus, Pithovirus, Faustovirus, etc (Andrade et al., 2018; Pagnier et al., 2013; Philippe et al., 2013). Los estudios metagenómicos demuestran una distribución y diversidad de virus gigantes extraordinaria tanto en ambientes como organismos, donde se incluyen muestras de agua, suelo, mamíferos e invertebrados (Andrade et al., 2018). Los estudios realizados y las bases metanogénicas demuestran que los virus gigantes son ubicuos, al igual que sus huéspedes por excelencia, las amebas (Dornas et al., 2015; Schulz et al., 2017).

Las técnicas de alto rendimiento y el uso de distintas especies de amebas en cocultivo para el aislamiento de virus gigantes ha hecho posible el descubrimiento de una gran diversidad de nuevos linajes con el paso de los años (Pagnier et al., 2013). Habitualmente, los virus gigantes presentan un rango de hospederos singularmente estrecho, por lo que casi todos los que han sido descubiertos se han aislado del género *Acanthamoeba*, como *A. polyphaga* o *A. castellanii* (Abrahão et al., 2014; Machado et al., 2022). Pese a ello, *A. castellanii* es una de las especies huésped más generalista de los virus gigantes si se compara con otras especies amebales (Machado et al., 2022).

Los métodos y procedimientos para el aislamiento de virus gigantes suelen ser tediosos, por lo que a lo largo del tiempo se han probado distintas estrategias. El método para el aislamiento de virus gigantes es denominado cocultivo, puesto que se realiza una inoculación con la cepa amebal y la muestra que presuntamente contiene viriones (Pagnier et al., 2013). Entre los cocultivos que se utilizan están: el primario el cual consiste en la propagación de la ameba en medio líquido PYG para ser cultivada con las muestras, una vez que se sospechaba

de la presencia de virus se usan filtros para eliminar bacterias u otros microorganismos no deseados; pese a ello, este procedimiento tuvo algunos inconvenientes por lo que se empezó el método dirigido por antibióticos, donde al cocultivo se le adicionó un coctel de antibióticos como vancomicina. También se suelen hacer cocultivos en medio agar con el uso de agar no nutritivo; otro de los procedimientos más conocidos es el que usa filtros para eliminar de la muestra organismos que no son de interés, el cual parecía ser uno de los más efectivos (Dornas et al., 2015; Khalil, Robert, et al., 2016; Machado et al., 2022; Pagnier et al., 2013). Sin embargo, Machado et al. (2022), menciona en su estudio que el uso de filtros no es tan efectivo para los aislamientos como lo son los métodos que emplean antibióticos.

4.2.3. Rol ambiental

El aislamiento de virus gigantes de varias especies, que se han encontrado en muestras ambientales, como vertebrados, hasta algas verdes eucariotas unicelulares, lo cual da razón a su presencia ubicua en el planeta Tierra. Hasta el momento se han aislado una serie de virus gigantes de sistemas acuáticos en Brasil, particularmente en ríos ácidos y lagunas urbanas, lo que sugiere una correlación entre un elevado grado de materia orgánica y la identificación de virus gigantes (Boratto et al., 2020; Campos et al., 2014). Pese a ello, el descubrimiento de los virus gigantes deja interrogantes sobre sus funcionalidades ecológicas y razones evolutivas (La Scola et al., 2003). Los virus son reguladores clave de procesos como la transferencia de carbono y el reciclaje de nutrientes que involucra a especies de zooplancton y fitoplancton, pero aún el alcance total de sus funciones es desconocido. La identificación de virus gigantes en agua dulce y salada condujo a un intenso debate sobre la ecología de estos virus en los ambientes acuáticos, además de su papel en la estructuración de las poblaciones de protistas y en el intercambio de genes (Abrahão et al., 2014), por lo que resulta esencial aislar virus de estas fuentes hídricas.

5. Metodología

5.1. Área de estudio

El área de estudio abordó cuerpos de agua de la ciudad de Loja, ubicada en la provincia de Loja, al sur del Ecuador. La ciudad de Loja se encuentra rodeada por cadenas montañosas lo cual provoca que se tenga un relieve bastante irregular, conduciendo a tener gran diversidad ecosistémica y biológica (Jaramillo, 2002; Aguirre Z., Aguirre N., y Muñoz J., 2017), por lo que se esperó encontrar la presencia de virus contenidos en fuentes hídricas de la ciudad. Se seleccionaron los puntos de muestreo fijo (Figura 1), bajo dos criterios fundamentales de

selección: (i) que sean cuerpos de agua artificiales o naturales, que no represente grandes movimientos del flujo de agua; y, (ii) que sean cuerpos de agua eutrofizados o con características de este fenómeno, donde se tenga mayor probabilidad de encontrar protozoos.

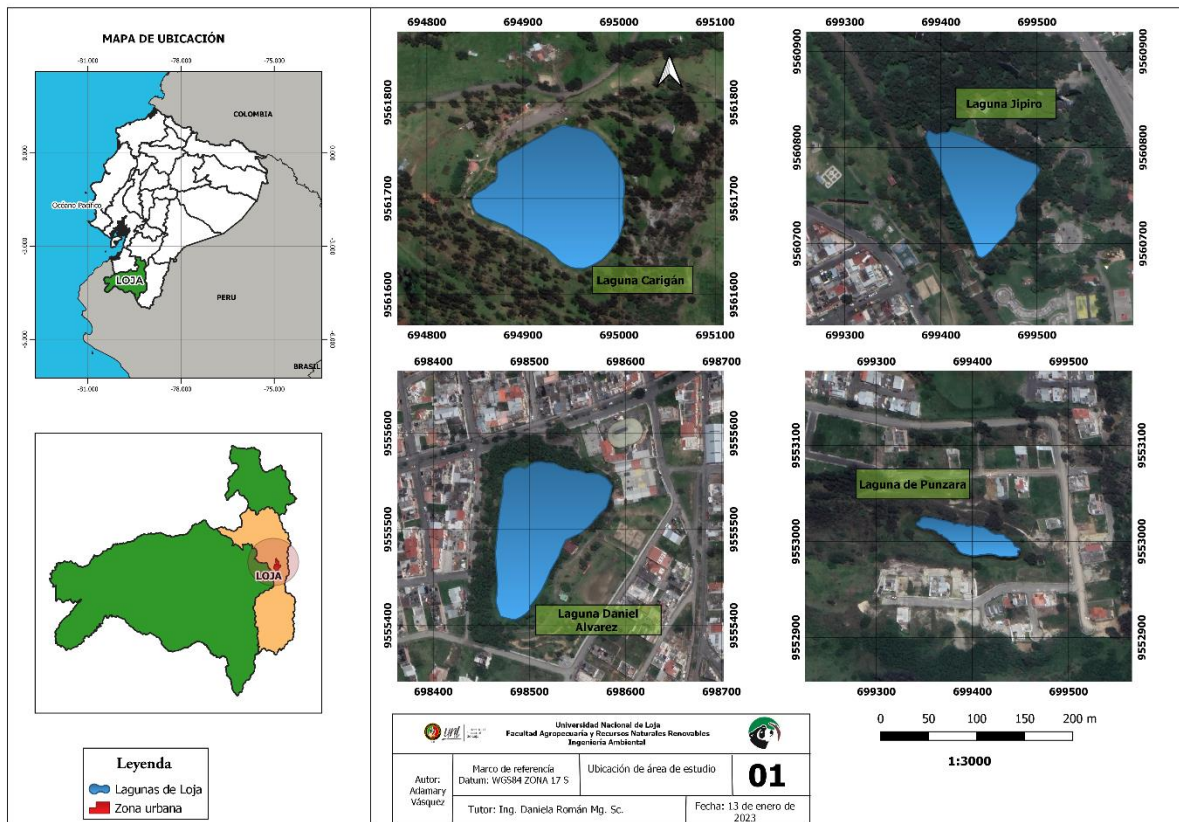


Figura 1. Sitios de muestreo en la ciudad de Loja

Por otra parte, la parte experimental del estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Químico de la Dirección de Investigación, de la Universidad Nacional de Loja.

5.2. Diseño de investigación

La presente investigación se llevó a cabo con el método inductivo porque pretendió aportar al análisis y debate sobre el origen y clasificación de virus; con un enfoque cualitativo de tipo descriptivo, ya que se recolectaron muestras de agua para inocularse en cepas de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, y se conservaron las muestras que contienen virus para su descripción.

El proyecto “Cultivo de amebas del género *Acanthamoeba* ATCC 30010 con enfoque al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño” utiliza conocimientos científicos teóricos y prácticos sobre química, biología celular y molecular, microbiología, bioquímica y biotecnología, con el propósito de evaluar la diversidad específica y ecosistémica de fuentes hídricas, al realizar la identificación de virus de gran tamaño. Con esto se pretende

generar información valiosa para el impulso del uso y conservación de los componentes de la biodiversidad y desarrollo y gestión adecuada de los ecosistemas, aplicando métodos y técnicas actuales de inoculación y aislamiento.

5.3. Metodología para la obtención de cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en condiciones de laboratorio

5.3.1. Obtención de cepas *A. castellanii* ATCC 30010

La cepa Neff, ATCC 30010, fue donada por la Dra. Karin Silva Caumo del grupo de Investigación de Protozoarios Emergentes y Oportunistas y el Laboratorio Didáctico de Parasitología Clínica de la Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil; fueron enviadas en viales de 1,5 ml a temperatura ambiente. Estas cepas se encontraban congeladas y reposando en el laboratorio de microbiología del Laboratorio de Análisis Químico para ser utilizadas posteriormente.

5.3.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son un requisito indispensable que se emplea para propagar las células de microorganismos, de este dependerá el crecimiento y rapidez de reproducción de las mismas. Las cepas de *Acanthamoeba* no son la excepción, y se ha encontrado en la literatura distintos de los medios empleados para su cultivo. Para este estudio se emplearon algunas metodologías como las de Eroğlu et al. (2015), Heredero-Bermejo et al. (2012) y Machado et al. (2022), donde se puede destacar que los medios ampliamente empleados son: el medio líquido de proteasa-peptona-glucosa (PYG) y agar no nutritivo como medio sólido que se vierten en placas Petri. Para lo cual se indica que para la preparación de estos medios se necesitan una serie de reactivos tales como sulfato de magnesio, cloruro de calcio, citrato de sodio, sulfato amónico ferroso, glucosa, extracto de levadura, etc. En el mercado existen fórmulas preparadas de estos medios, en especial del PYG, pese a ello, en su mayoría es para el cultivo de bacterias y cabe recalcar que las cantidades de los reactivos difieren notablemente para la inoculación de amebas según las metodologías antes mencionadas.

5.3.3. Cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 para los cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Acanthamoeba puede interactuar con una serie de microorganismos, no sólo virus, sino también levaduras, algas e inclusive bacterias (Alsam et al., 2006; Yousuf et al., 2013), en cuanto a las bacterias el mecanismo de acción de las amebas es la depredación. Un estudio indica que al poner en contacto a *A. castellanii* en un medio con *E. coli* existirá una invasión

por parte de la cepa amebal (Yousuf et al., 2013). En tanto que, para el presente estudio se decidió trabajar con la metodología de Eroğlu et al. (2015) el cual enriquece el agar no nutritivo con *E. coli* ATCC 25922, cuya cepa ha sido ampliamente utilizada en bioinformática, pruebas de alimentos, pruebas de medios y control de calidad. Pues si bien es cierto para el aislamiento de *Acanthamoeba* es necesario enriquecer el medio en el que se la cultive con cepas de bacterias, ya que éstas servirán como sustrato de la ameba (Attariani et al., 2020).

La Universidad de Santa Catarina de Brasil también realizó la donación de las cepas de *E. coli* ATCC 25922, las mismas se tuvieron que activar para su posterior cultivo. Para el proceso de activación se tomaron los viales con *E. coli*, se vertió el contenido en un tubo de 15 ml con agua de peptona (TITAN BIOTECH) y se llevó a incubar a 30 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó 1 µl del cultivo de *E. coli* en peptona y se colocó en una placa con agar nutritivo a través del método de agotamiento de estrías; y, se dejó incubar a las mismas condiciones antes mencionadas (Elbing y Brent, 2019).

5.3.4. Inactivación de *Escherichia coli* ATCC 25922 para los cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Para que *E. coli* ATCC 25922 sirva como sustrato de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, ésta debía estar inactiva, puesto que así el crecimiento de la bacteria no inhibiría la reproducción de la ameba. Para realizar este proceso se empleó la metodología de Lee y Kaletunç (2002) con las correspondientes modificaciones. En tubos de 15 ml se colocaron 5 ml de agua de peptona, luego con ayuda de un asa de siembra se tomó una colonia de la placa con cultivo *E. coli*, y ubicando el asa en posición vertical se dejó caer la colonia tomada en el tubo. Los tubos se dejaron incubar a 30 °C por aproximadamente 24 horas. Una vez que se comprobó el crecimiento de *E. coli* se transfirió 1 ml del contenido de los tubos en microtubos plásticos estériles de 1,5 ml, los mismos se llevaron a baño María a 56 °C por dos horas; culminado el proceso la cepa estaba inactiva.

5.3.5. Cultivo axénico y monoxénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Para la metodología se consideraron estudios como los de Eroğlu et al. (2015) y Machado et al. (2022). Se activaron las cepas de *Acanthamoeba castellanii* ATCC30010, para lo cual el contenido de amebas enviadas desde la Universidad de Santa Catarina de Brasil se propagó en medio PYG nuevo. Se colocó 5 ml de PYG en tubos de 15 ml, en este mismo se vertió el contenido de un vial que guardaba a *Acanthamoeba castellanii* y se llevó a centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos. De este proceso se obtuvo un sobrenadante que se

desechó, y el pellet, se dejó en los mismos tubos agregando 5 ml de PYG fresco, los mismos se llevaron a incubar a 30 °C durante 72 horas.

Una vez que existió crecimiento, se tomó 3 ml de células amebales del proceso anterior y se transfirió a frascos de cultivo celular (T-75) que contenían 25 ml de PYG fresco, esto se selló y se dejó incubar a 30 °C por aproximadamente 48-72 horas para alcanzar una confluencia celular alta (90 – 100%). Cuando en los frascos de cultivo se observó una monocapa que cubría toda la parte inferior se procedió a cambiar de medio a los cultivos con PYG nuevo, puesto que las células se desprenden de la monocapa y ya no son viables. Además, se obtuvo subcultivos de células, para lo cual se debió separar las amebas adheridas a la pared inferior del frasco de cultivo celular con ayuda de una pipeta, realizando un lavado de las mismas para que se desprendan con mayor facilidad. Una vez que se limpió cerca del 80 % del frasco se tomó 3 ml de células y se inoculó en frascos de cultivo celular estériles con 25 ml de PYG fresco.

Cabe recalcar que por la posible presencia de contaminación bacteriana en cultivos de *Acanthamoeba* se decidió agregar a la preparación de PYG, gentamicina. La presentación fue en líquido inyectable de la casa comercial ACROMAX (Gentamax 160) y la cantidad agregada a 500 ml de medio PYG fue de 1 ml. Este antibiótico tiene la ventaja de soportar altas temperaturas por lo que el medio se llevó a autoclavar con el antibiótico incluido.

Por otro lado, para realizar los cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en medio sólido, se necesitaron las bacterias inactivas, el cultivo de amebas en medio PYG y agar no nutritivo. Empleando una pipeta de 100 µl, se vertió sobre la placa con agar nutritivo 75 µl de cultivo de amebas y 75 µl de *E.coli* inactivas. Las cajas fueron selladas y etiquetadas, se dejaron en la incubadora por 4-5 días a 30 °C, transcurrido este tiempo se observa el crecimiento amebal con ayuda de un microscopio (Anexo 3A).

5.3.6. *Conteo de células de Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Para determinar el número de células amebales por mililitro de cultivo se utilizó una cámara de Neubauer. La observación se hizo en un microscopio invertido en el lente 10x. Para evitar el error de contabilizar células que no estaban viables se usó azul de tripano, la cual tiñería aquellas amebas que ya no estaban vivas. En un vial de 1,5 ml se colocó 100 µl de células amebales y 25 µl de azul de tripano. Finalmente, en la cámara se colocó 5 µl del contenido preparado y se realizó el conteo en las cuatro retículas trazadas en las esquinas (Figura 2).

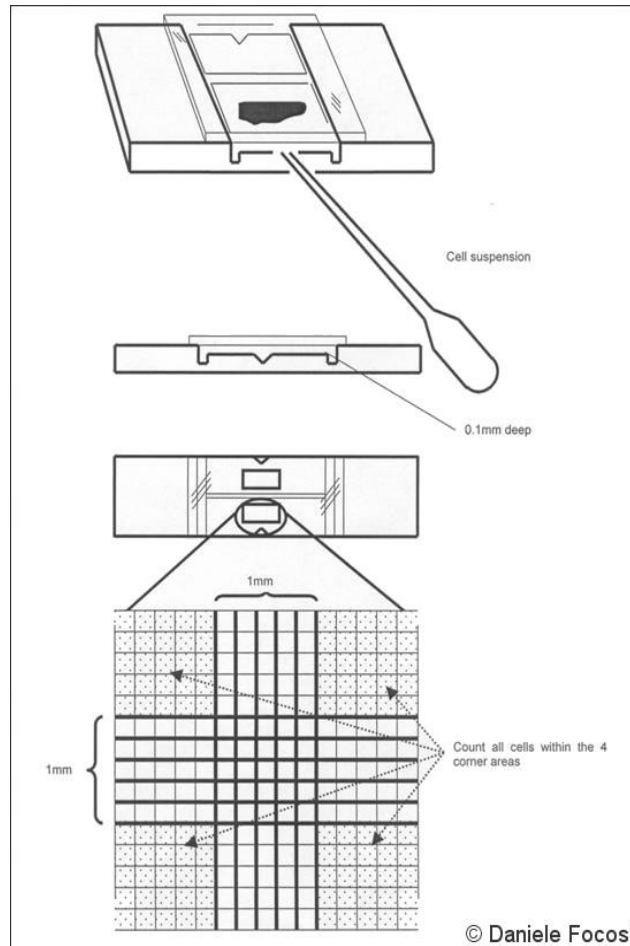


Figura 2. Cámara de Neubauer

Nota. Daniele Focosi, 2014, cámara de Neubauer, imagen tomada de Cell Cultures.

En tanto que se puede determinar la concentración de células por mililitro tal como se indica en la ecuación 1.

$$N \text{ células/ml} = \frac{\text{Total células contadas}}{4 \text{ cuadrantes contados}} \times 10^4 \quad (1)$$

5.3.7. Almacenamiento de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

Se sembró amebas en un frasco de cultivo celular (T-75) en medio PYG y se incubará a 30 °C hasta que se forme una capa en el fondo del frasco. A partir de estos cultivos, se obtendrán muestras para el almacenamiento, separando las amebas por medio del método de congelación. Para ejecutar este último, se deberá reemplazar el medio por 2 ml de PYG fresco, luego el frasco de medio celular se lleva a congelar a -20 °C por 10 minutos, seguido a esto se tomará 1 ml del contenido y se colocará en tubos tapa rosca (1,5 ml) y se almacenarán en el refrigerador a 8 °C (Axelsson-Olsson et al., 2009).

5.4. Metodología para desarrollar colecciones de cultivos monoxénicos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 y virus nucleocitoplasmáticos aislados de sistemas lacustres de la ciudad de Loja

5.4.1. Obtención de muestras de agua

En cuanto a la toma de muestras de agua se siguió el protocolo establecido por Machado et al. (2022). La recolección de muestras se realizó en cuerpos de agua artificiales o naturales y con tendencia a eutrofización más representativos de la ciudad de Loja, y se recolectaron varias muestras en tubos Falcon de 50 ml, llenando dichos recipientes hasta con 10 ml de agua. Posteriormente se realizó el etiquetado de las muestras con ubicación geográfica exacta y se preservaron en congelación.

También se requirió analizar *in situ*, parámetros característicos del agua muestreada como pH, conductividad, temperatura y sólidos suspendidos, se registraron en la base de datos junto con la identificación del muestreo y del responsable de mismo.

5.4.2. Cocultivo

Este proceso se basó en la metodología de Machado et al. (2022) para aislamiento de virus gigantes, considerando que se hicieron las modificaciones necesarias para las condiciones que se dispone en el laboratorio y medio en general. Para esto, se realizó alícuotas de 1 ml de la muestra tomada de los cuerpos de agua (Anexo 3B) las cuales debieron pasar por un proceso de 3 ciclos de congelación y descongelación, con el objetivo de disminuir la carga de microorganismos no deseados. Esta técnica se realiza en base al método de cocultivo, es decir se hará un cultivo que contenga la muestra ambiental y el cultivo de *A. castellanii*. Se empleó microplacas de 96 pocillos para poder procesar al mismo tiempo una serie de muestras, previamente se agregó antibióticos al medio PYG estos fueron: vancomicina, ciprofloxacina y doxiciclina para que la carga contaminante de las muestras de agua minimice.

Se comprobó que existía una confluencia celular alta (90-100 %) de los cultivos de *A. castellanii* en medio PYG y se desechó el sobrenadante, este se reemplazó por PYG fresco enriquecido con los antibióticos antes mencionados y se realizó un lavado para obtener el desprendimiento de las amebas. Se tomó 40 000 células amebales (100 ul) y se depositó en cada pocillo. Se sellaron los pocillos y se incubaron a 30 °C por 24 horas. Para la infección de las amebas se tuvo pocillos con la muestra de agua sin diluir y las otras fueron las muestras resultantes de la dilución 1:10 de las mismas, agregando en cada uno 100 ul de muestra ambiental. Para llevar un control de las amebas se realizó alícuotas de PBS 10x a 1x y se les

agregó a los pocillos tan solo con las células amebales. Una vez completadas las infecciones se sellaron las placas y se dejaron incubar por aproximadamente 4 días a 30 °C. Los cultivos monoxénicos se transfirieron a viales de 1,5 ml, los mismos se guardaron a -20 °C. La configuración de las infecciones y el PBS para las muestras tomadas de las diferentes lagunas se muestra en la Figura 3.

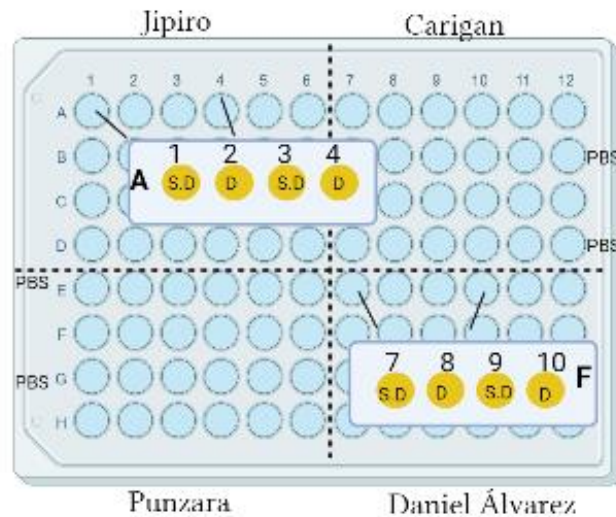


Figura 3. Configuración de las infecciones y controles en la placa de 96 pocillos

Nota. Elaboración propia. Creado en BioRender.com. SD: muestras de agua sin dilución; D: muestras de agua diluidas.

5.5. Metodología para objetivo determinar la presencia física de virus hospederos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 mediante microscopía

5.5.1. Observación de efectos citopáticos por microscopía

Para la identificación de la presencia física de virus gigantes se consideró los pocillos de las placas donde se sospechaba de la presencia de dichos agentes. Haciendo una observación diaria de las placas infectadas para notar cualquier aparición de efectos citopáticos a través de un microscopio invertido, donde se tuvo que observar características morfológicas que difieren de células amebales sanas que se podían observar en los pocillos de control. Como lo es el redondeo celular, el desprendimiento de la monocapa, formación de racimos de las células redondeadas o la eventual lisis celular (Fukaya et al., 2023; Fukaya y Takemura, 2021; Machado et al., 2022). Una vez transcurridos las 96 horas, si no se observó nada se desechó la muestra (Machado et al., 2022).

6. Resultados

6.1. Obtención de cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 en condiciones de laboratorio

Se presentan los resultados de diferentes pruebas para el cultivo de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, donde se selecciona el medio específico para su crecimiento, así como las condiciones ambientales óptimas en laboratorio. Los ensayos para consolidar el protocolo para el cultivo de estos protozoos se muestran en el Anexo 1.

Se cuenta con colecciones de cepas de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, las cuales han sido cultivadas en medio PYG (líquido) y agar no nutritivo (sólido) utilizando como sustrato *Escherichia coli* ATCC 25922 inactiva. En laboratorio, las células de *A. castellanii* ATCC 30010 se han desarrollado adecuadamente en condiciones de pH neutro a 30 °C, mostrando un mayor crecimiento entre las 48 y 72 horas de inoculación.

Las células amebales formaron una monocapa de tono transparente en la parte inferior de los frascos de cultivo celular (T-75). Se han observado en un microscopio invertido en lente 10x comprobando que existe una confluencia del 90-100 % (Figura 4A). Además, en el lente 40x se determinó que las células estaban en su etapa de trofozoíto lo cual indica la viabilidad y buen estado de éstas (Figura 4C). También se observó la presencia de vacuolas prominentes y contráctiles. El conteo de células mostró que en promedio existen $2,8 \times 10^6$ células por mililitro (Figura 4B).

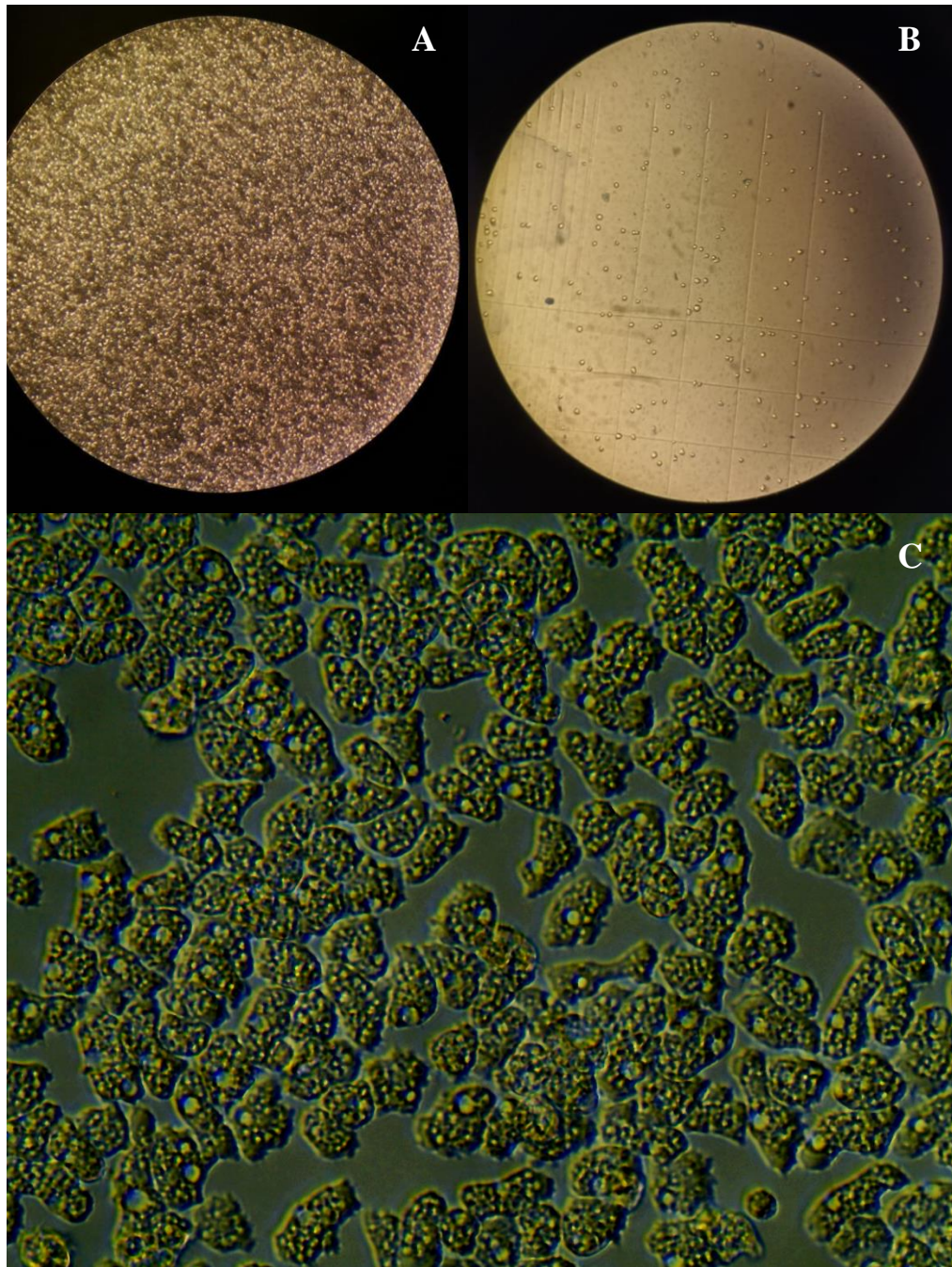


Figura 4. Cultivo *in vitro* de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010. **A)** *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 vista en microscopio invertido en lente 10x donde se muestra la confluencia del 100 % de las células amebales **B)** *A. castellanii* ATCC 30010 en las rejillas de la cámara de Neubauer. **C)** *A. castellanii* ATCC 30010 vista en microscopio invertido en lente 40x - Estructura en estados de trofozoíto, con paredes celulares irregulares y vacuolas contráctiles.

6.2. Obtención de colecciones de cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 y virus nucleocitoplasmáticos aislados de sistemas lacustres de la ciudad de Loja

Las características físico químicas de los cuerpos de agua son datos que sirvieron para caracterizar los sitios de muestreo. Las muestras de agua se recolectaron de un total de 5 puntos por laguna. Los valores de temperatura, pH, conductividad y sólidos suspendidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros obtenidos de las lagunas muestreadas

| Laguna | Punto | pH | Temperatura (°C) | Conductividad (mS) | Sólidos suspendidos (ppm) |
|----------------|-------|-----|------------------|--------------------|---------------------------|
| Punzara | 1 | 7,1 | 19,0 | 0,01 | 15 |
| | 2 | 7,3 | 19,5 | 0,01 | 22 |
| | 3 | 6,7 | 18,5 | 0,00 | 12 |
| | 4 | 6,7 | 18,1 | 0,00 | 11 |
| | 5 | 6,9 | 19,0 | 0,01 | 16 |
| Daniel Álvarez | 1 | 8,2 | 19,6 | 0,15 | 108 |
| | 2 | 9,2 | 19,7 | 0,16 | 110 |
| | 3 | 9,5 | 20,0 | 0,15 | 115 |
| | 4 | 9,3 | 20,1 | 0,15 | 117 |
| | 5 | 9,7 | 20,0 | 0,16 | 115 |
| Jipiro | 1 | 8,3 | 17,0 | 0,03 | 28 |
| | 2 | 8,0 | 15,7 | 0,03 | 26 |
| | 3 | 7,7 | 16,4 | 0,02 | 27 |
| | 4 | 7,3 | 16,5 | 0,02 | 24 |
| | 5 | 7,2 | 16,7 | 0,02 | 22 |
| Carigán | 1 | 8,0 | 20,5 | 0,01 | 18 |
| | 2 | 8,1 | 20,3 | 0,01 | 19 |
| | 3 | 7,5 | 20,7 | 0,01 | 16 |
| | 4 | 7,8 | 20,6 | 0,02 | 22 |
| | 5 | 7,8 | 20,9 | 0,01 | 18 |

El protocolo establecido del cocultivo para el aislamiento de virus gigantes de los cuerpos lacustres de la ciudad de Loja se puede observar en el Anexo 2, del cual se han obtenido colecciones de cultivos monoxénicos, los mismos se encuentran contenidos en microtubos plásticos estériles de 1,5 ml a 4 °C, en el área de Microbiología del Centro de Investigación y Análisis Químico (CISAQ) de la Universidad Nacional de Loja.

Estos cultivos fueron recogidos de los pocillos de cada placa de ensayo (Anexo 3C), en donde se realizó la observación de cambios físicos en la morfología celular que fueran

provocados, probablemente, por la infección de virus gigantes al término de las 120 horas. Se pudo obtener cultivos monoxénicos (virus + amebas) de todas las lagunas muestreadas. La obtención de los cultivos en los tiempos previstos se muestra en la Figura 5. A las 24 horas de infección existe un ligero desprendimiento de la monocapa, donde algunas amebas se despegan de la superficie del frasco, lo que fue más notorio en las muestras de Punzara y Daniel Álvarez. Mientras que en el caso de Jipiro y Carigán se observan más células amebales sanas, es decir, en su estado de trofozoíto. El mayor cambio en la morfología de *A. castellanii* ATCC 30010 se da en las 96 horas, y a las 120 horas existe una disminución del número de células. En el control, las células se observan sanas; sin embargo, al término de las 120 horas la cantidad de amebas disminuye.

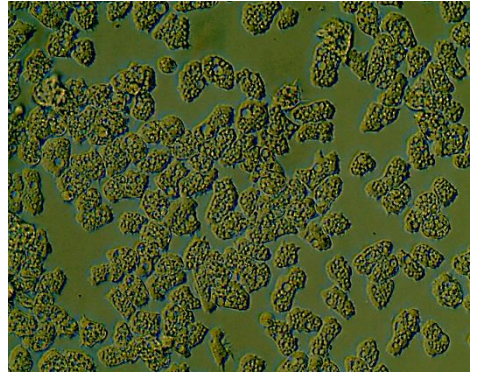
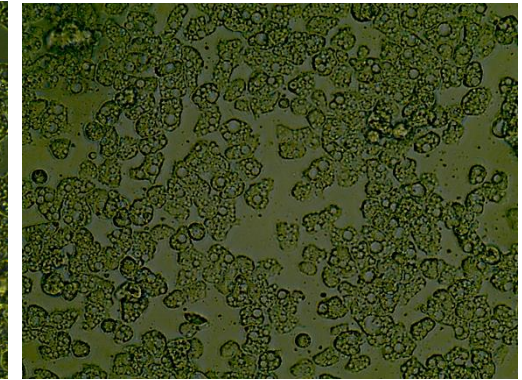
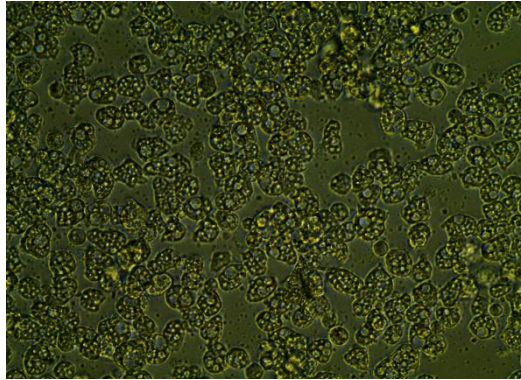
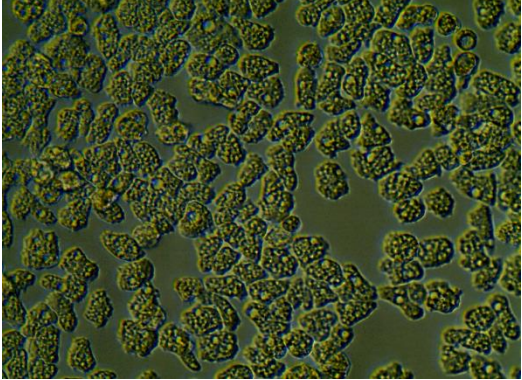
0

24

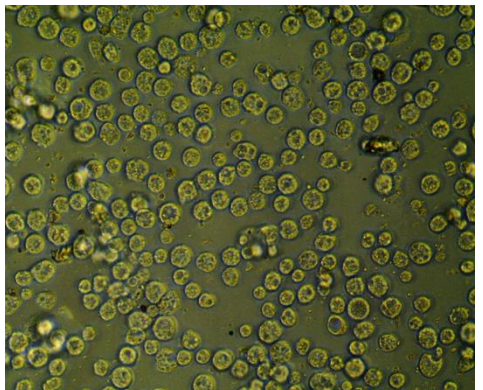
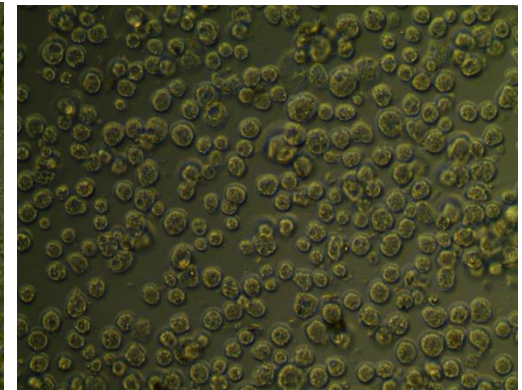
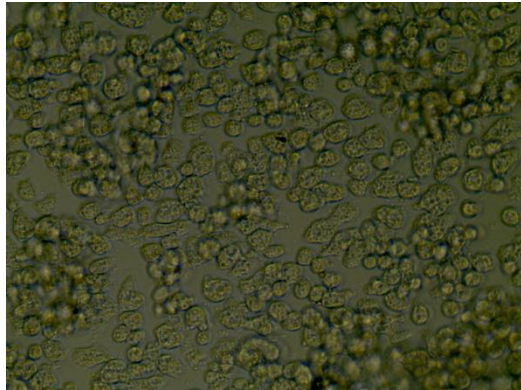
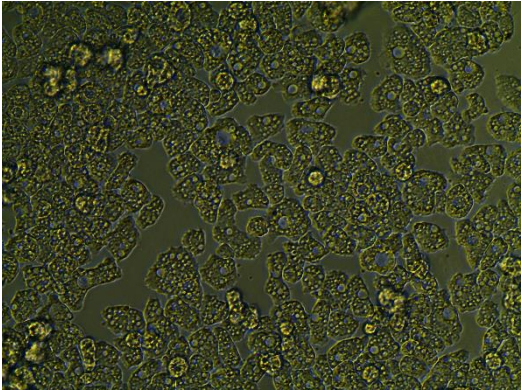
96

120

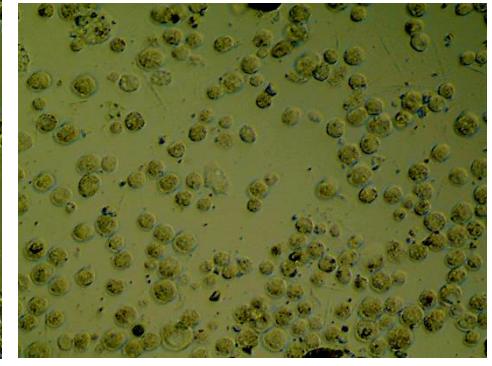
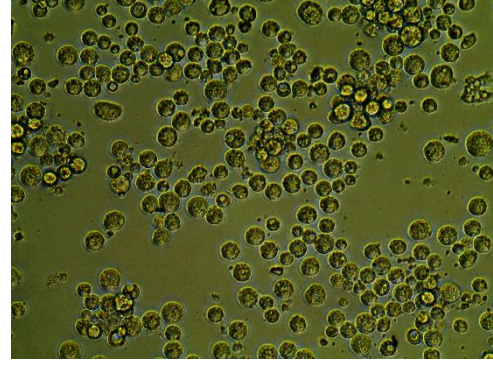
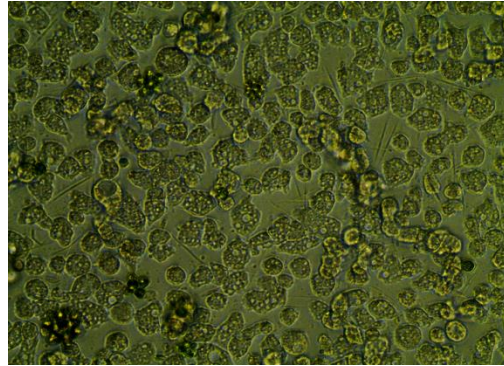
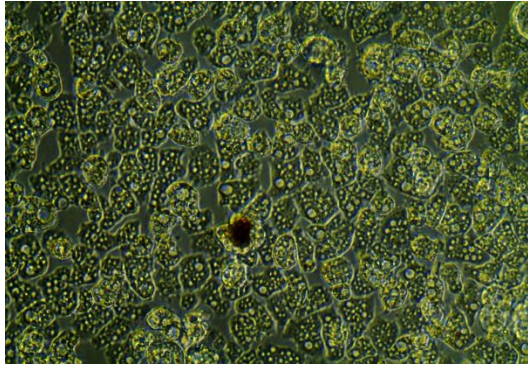
Control



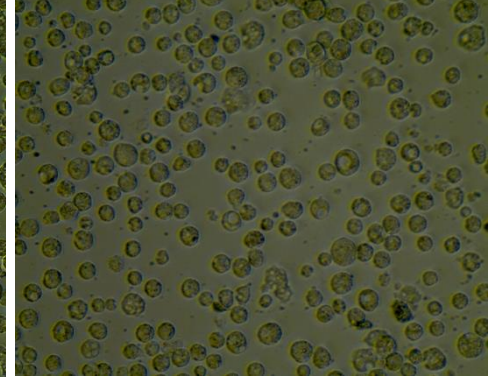
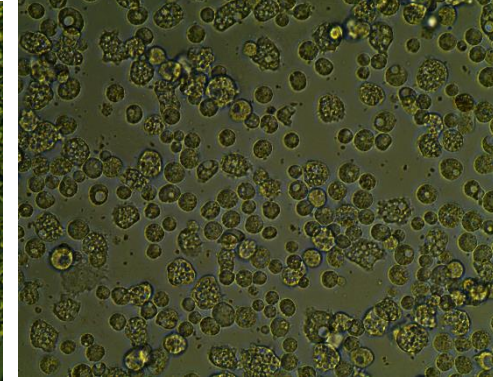
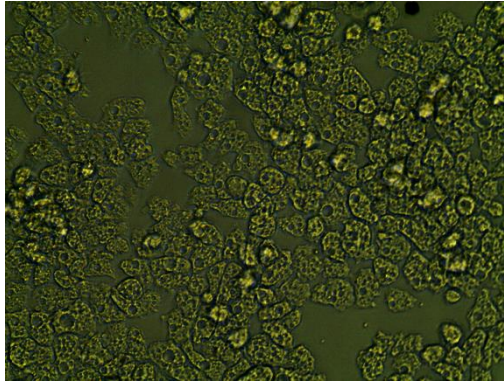
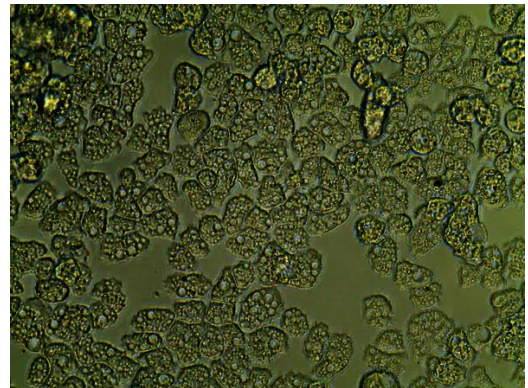
Punzara



**Daniel
Álvarez**



Jipiro



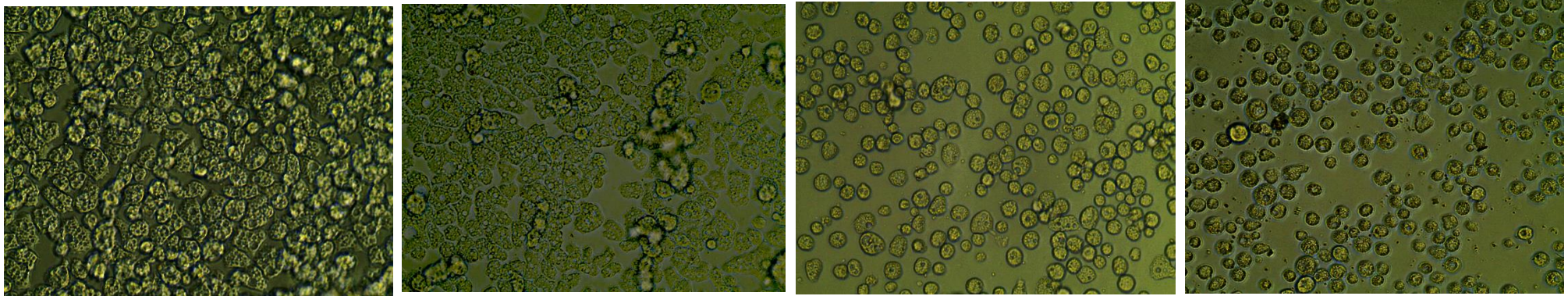
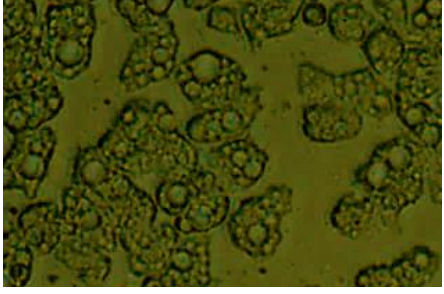
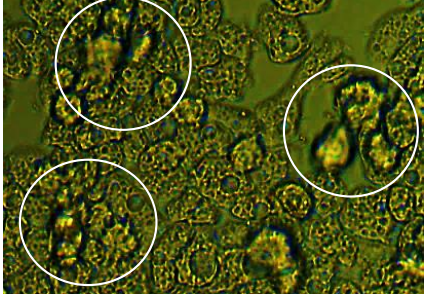
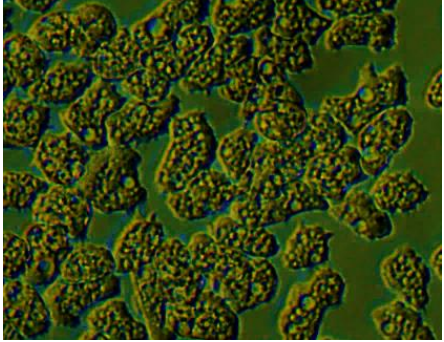
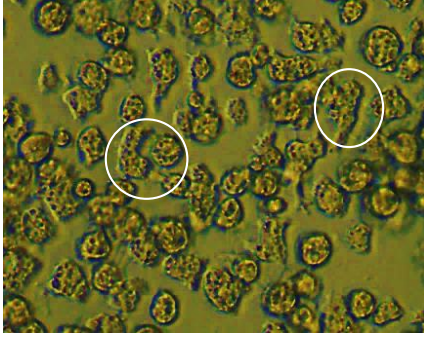
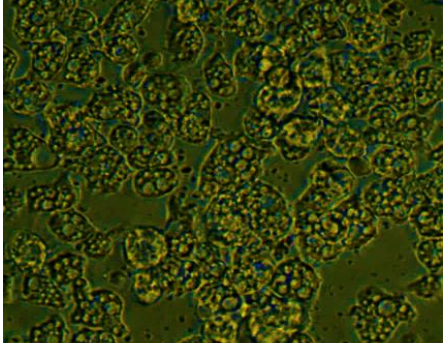
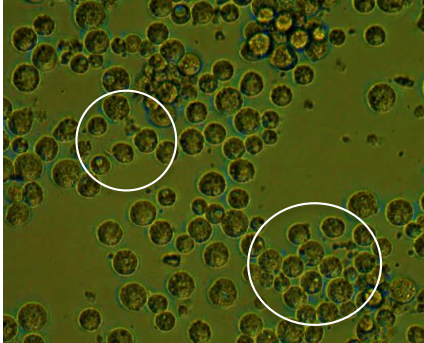
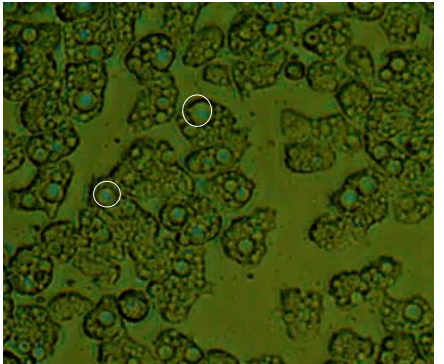
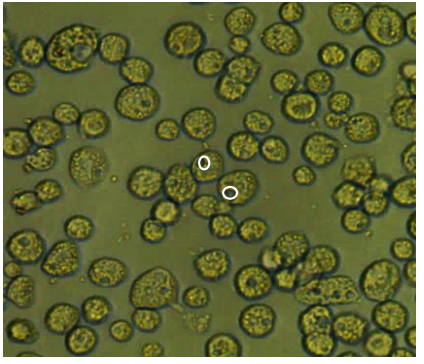


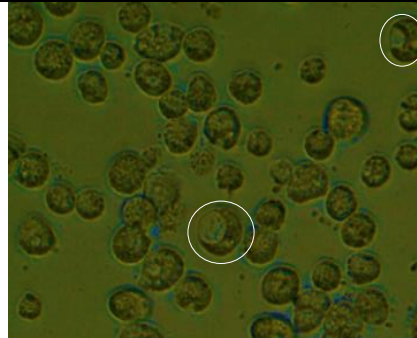
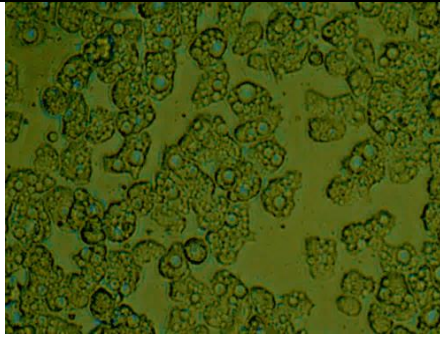
Figura 5. Línea de tiempo (0, 24, 96 y 120 horas) de la infección de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 provocada por la posible presencia de virus gigantes contenidos en 4 cuerpos de agua de la ciudad de Loja.

6.3. Presencia física de virus hospederos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 mediante microscopía

La observación a través de microscopía indicó la existencia de efectos citopáticos potencialmente producidos por virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño, los efectos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos citopáticos encontrados en las infecciones de *A. castellanii* ATCC 30010

| Células sanas | Células infectadas | Efecto citopático |
|---|--|---------------------------------------|
|  |  | Desprendimiento de la monocapa |
|  |  | Disminución del tamaño de las células |
|  |  | Redondeo celular |
|  |  | Reducción o ausencia de vacuolas |



Lisis celular

7. Discusión

Los métodos y técnicas para el cultivo de microorganismos están estrechamente relacionados con la reproductibilidad de resultados de investigación sujetos a una serie de protocolos que aseguren el mantenimiento de los organismos. Existen una serie de factores que condicionarán la proliferación y subsistencia del microorganismo como lo son los requerimientos nutricionales, pH, temperatura, asepsia, etc., los mismos tienen que ser controlados para que no se conduzca a resultados erróneos (Maqbool et al., 2022). En tal sentido, determinar y reproducir los cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 nace como un requerimiento de los laboratorios que trabajan con organismos, como el caso de los virus gigantes (Machado et al., 2022). La reproducción de cultivos de amebas fue ideal para la identificación morfológica de virus gigantes presentes en cuerpos de agua de la ciudad de Loja, a través del método de cocultivo, es decir la inoculación de la muestra de agua en la presencia de antibióticos.

Las amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba* son un modelo de organismo huésped indispensable para poder estudiar otros microorganismos, como hongos, bacterias y sobre todo virus de gran tamaño, ampliando el conocimiento acerca de las interacciones entre dichos organismos y las características biológicas, ambientales, moleculares y biotecnológicas (Alsam et al., 2006; Khan, 2006; Siddiqui y Khan, 2012b, 2012a). Existen diversos estudios acerca de la presencia amplia y en cualquier ambiente de *Acanthamoeba*; sin embargo, son escasos los que mencionan información acerca de los medios de cultivo específicos para su cultivo. En tanto que, en este estudio se utilizaron medios que aseguren la proliferación de las amebas.

Es posible obtener cultivos de *A.castellanii* de manera sencilla en medios axénicos a partir de nutrientes y enriquecimiento con antibióticos para eliminar bacterias que producirán contaminación (Jensen et al., 1970; Niyiyati et al., 2013). Los medios básicos utilizados para

el crecimiento de estos cultivos, por lo general, contienen peptona, extracto de levadura y glucosa en concentraciones altas; y precisamente es el medio PYG el más recomendado para la propagación de *Acanthamoeba* (Axelsson-Olsson et al., 2009; Heredero-Bermejo et al., 2012; Niyyati et al., 2013), por lo que se empleó este medio, obteniéndose cultivos altamente confluentes (90-100 %) en un rango máximo de tiempo de 72 horas; lo cual es ideal, ya que para el estudio de estos microorganismos como hospedadores se necesita una gran cantidad de células en intervalos cortos de tiempo. Igualmente, el cultivo en medio PYG, al ser líquido permite verificar parámetros físicos observables, como la turbidez, potencialmente provocada por una contaminación bacteriana o fúngica y permite el monitoreo del crecimiento de las células amebales como una monocapa blanquecina-transparente adherida a la pared del frasco de cultivo celular (Machado et al., 2022; Niyyati et al., 2013; Penland y Wilhelmus, 1997).

A. castellanii puede ser también altamente sensible, siendo necesario que se realicen otros tipos de cultivos que aseguren tener las colecciones necesarias para los estudios que se realicen con las células (Niehues et al., 2020); además, es conviene trabajar con medios sólidos como el agar sin nutrientes o en agar con bajas concentraciones de nutrientes en presencia de bacterias debido a que éstas son el sustrato con el que se alimentan las amebas (Eroğlu et al., 2015; Heredero-Bermejo et al., 2012; Penland y Wilhelmus, 1997). En esta investigación, se decidió alimentar a las células amebales con *E. coli* ATCC 25922 inactiva, pues estudios como los de Alsam et al. (2006) mencionan que *Acanthamoeba* tiene una mayor preferencia de nutrirse con bacterias gramnegativas. Como se menciona, para el medio de cultivo se requirió que *E. coli* estuviera inactiva, esto nace desde la idea de que la bacteria no debe tener la velocidad de reproducción (Tuttle et al., 2021), que haga imposible que las amebas se alimenten de ellas; es decir, en caso de que el medio tenga un exceso de nutrientes, las bacterias vivas podrán empezar a competir por los recursos presentándose un sobrecrecimiento de éstas (Byers, 1979). A diferencia del medio PYG, el agar sin nutrientes es más lento y el tiempo de incubación fue de 4 a 5 días. Pese a que los resultados fueron exitosos, hay estudios como los de Eroğlu et al. (2015) donde se menciona que se puede trabajar con las bacterias ya sea que estén vivas o muertas, y, de hecho, se ha mostrado que las mismas en su estado activo pueden ser perfectamente sustrato para las amebas, incluso siendo las que mejor resultados han dado en el crecimiento. De igual manera, Eroğlu et al. (2015) y Penland y Wilhelmus (1997) aseguran que se puede emplear como alimento a otras bacterias, obteniéndose incluso mejores resultados que con *E. coli* ATCC 25922, entre las que se mencionan están: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia*

marcescens. Por lo que, en futuros estudios, se podría verificar el crecimiento y permanencia de las células en estado de trofozoíto con el uso de distintos medios de cultivo y otras bacterias como sustrato.

Además, en el presente estudio se determinó que las condiciones óptimas para el crecimiento de estas células amebales es de 30 °C y un pH neutro. Estudios como los de Machado et al. (2022) afianzan la idea de que esta temperatura es la ideal para que se produzca la división celular acelerada de las células. Por otro lado, Eroğlu et al. (2015) y Penland y Wilhelmus (1997) mencionan que la temperatura de incubación podría ser de 27 °C y 35 °C respectivamente, lo cual son valores cercanos a la reproducción del protocolo propuesto. Según Eroğlu et al. (2015), lo importante en la reproducción de cultivos es que las condiciones que se dé a las células deben ser compatibles con las condiciones nutricionales y ambientales de los medios naturales en las que se las encuentra. Khan (2006) menciona que *Acanthamoeba* se puede mantener en la etapa de trofozoíto cuando tiene disponible abundante alimento, a una temperatura de 30 °C, una osmolaridad entre 50 y 80 m Osmol y un pH neutro. Pues si bien es cierto, las condiciones desfavorables como la escasez de alimento, incremento en la osmolaridad y pH y temperaturas extremas conducen a la transformación de los trofozoítos a su etapa de quiste (Khan, 2006; Siddiqui y Khan, 2012a), lo cual sería perjudicial para el estudio de los virus gigantes que utilizan como hospedero a las amebas.

Empleando en conjunto técnicas y métodos de microbiología y biología celular fue posible el desarrollo de un sistema para el aislamiento de virus gigantes que infectan a *A. castellanii* ATCC 30010, de modo que en este estudio se lograron obtener colecciones de cultivos de muestras de agua de 4 lagunas de la ciudad de Loja con la presencia potencial de virus gigantes. Fue posible inocular una serie de muestras ambientales para trabajar con cocultivos de amebas, sin necesidad de tediosas metodologías, esta investigación está basada en un procedimiento trabajado por Machado et al., (2022). En tanto que, los cocultivos con virus gigantes pudieron sobrevivir en protistas en condiciones que se proporciona en laboratorio. Por lo que, se afianza la idea de que los virus gigantes son ubicuos, es decir, que se encuentran distribuidos en distintos ambientes y ecosistemas indiscriminadamente (Brandes y Linial, 2019; Yamada, 2011; Yutin et al., 2014). Pues si bien es cierto, desde el aislamiento del primer virus gigante, el Mimivirus, el cual se encontró en una torre de refrigeración en Bradford (La Scola et al., 2003), se han seguido modificando estrategias para aislar nuevos virus de gran tamaño que demuestran la distribución amplia de los mismos (Khalil et al., 2016; La Scola et al., 2003; Pagnier et al., 2013). Lo cual ha resultado en estudios como el de Pagnier

et al. (2013), donde este grupo de trabajo, ha logrado obtener una colección única y la más grande del mundo de virus gigantes a través del uso de cocteles de antibióticos en los cocultivos para evitar la contaminación bacteriana y otras pruebas moleculares, que se resumen en el aislamiento de 43 cepas de Mimiviridae y 17 cepas de Marseilleviridae, en una serie de ambientes incluidas muestras humanas.

Los resultados de este estudio aportan a la evaluación continua y necesaria de la diversidad genética de los virus gigantes, de modo que se pueda encontrar el valor ecosistémico de las cepas virales en investigaciones futuras. En los hábitats marinos y de agua dulce, existen millones de virus en cada mililitro de agua y se ha encontrado que desempeñan un rol importante como impulsores evolutivos del plancton eucariótico (Fromm et al., 2023; Schulz et al., 2017), además de ser reguladores de los ciclos biogeoquímicos globales (Schulz et al., 2022). Pese a ello, existen algunas complicaciones en el estudio de virus gigantes, como la carencia de conocimiento acerca de los hospedadores nativos de éstos, la complejidad de los trabajos metagenómicos para la determinación de su diversidad y la cantidad de genes huérfanos que contienen en su ADN (Fromm et al., 2023; Ogata y Claverie, 2007). Por lo que, es importante que estos estudios inviertan más recursos en la identificación molecular de los virus encontrados en las muestras, así como su ciclo de acción e infección con sus hospederos.

En este estudio se ha identificado una serie de efectos citopáticos en las células hospedadoras en las que se describió el proceso de infección de los virus de gran tamaño. Ha sido posible realizar una identificación rápida de los virus gigantes a través de la observación de cambios morfológicos empleando un microscopio invertido en el lente 40x. Según Fukaya y Takemura (2021), las diferentes respuestas morfológicas de *A. castellanii* a la infección de los virus puede ser razón de algunas estrategias de propagación de los virus gigantes o bien al sistema antiviral que poseen las células amebales.

Se pudieron identificar algunos efectos citopáticos presentados hasta las 120 horas de infección, donde los cambios más significativos se muestran a las 96 horas de infección. Entre los cambios que se pudieron definir están, el redondeo celular, desprendimiento de la monocapa, desaparición o reducción de las vacuolas, minimización del tamaño de las células y en algunos casos, la lisis celular. Si bien es cierto, los efectos citopáticos pueden variar entre los grupos virales, pese a ello, estudios como los de Fukaya et al. (2023) mencionan que el efecto más común, incluso casi universal, es el redondeo celular y desprendimiento de la monocapa. A las 24 horas de infección se mostró el desprendimiento de la monocapa, además

de que el tamaño de las células pareció reducirse ligeramente. Fukaya et al. (2023) indicaron que en las primeras horas de infección el tamaño de las células amebales aumentó; sin embargo, se consideró que la primera etapa de infección estaba entre las 12 primeras horas, y la reducción del tamaño celular pareció mostrarse después de las 26 horas de infección. Algo que se mantuvo es que, en las últimas etapas de infección, se encontró que las células infectadas eran más pequeñas y redondas.

De igual manera, Fukaya y Takemura (2021) a través de microscopía de contraste de fase de lapso de tiempo y el análisis de imágenes se identificaron una serie de cambios temporales en la morfología intracelular de células infectadas con virus gigantes; donde se indicó que virus gigantes como medusavirus o mimivirus provocaba la disminución del número de vacuolas, además de que la capacidad de *A. castellanii* para realizar división celular se ve reducida. Si bien es cierto, gran parte de las vacuolas de *Acanthamoeba* intervienen en la digestión, absorción y almacenamiento de nutrientes, además de que poseen vacuolas contráctiles que están estrechamente involucradas en la regulación del agua (Wang et al., 2023). En tanto que, cuando *A. castellanii* pasa a su forma redondeada o de quiste por la infección, tiende a excretar todas estas vacuolas (Fukaya et al., 2023). Otros estudios como los de Machado et al. (2022) y Rodrigues et al. (2019) indican que otro posible efecto citopático en las células amebales es la formación de racimos, es decir agregaciones de células redondeadas; sin embargo, esto es provocado tan solo por tupanvirus, de modo que en este estudio se descarta la presencia de este grupo viral.

Se debe mencionar que a menudo se pueden encontrar falsos positivos, esto provocado por un efecto citotóxico que es consecuencia de la presencia de una sustancia tóxica para las amebas en las muestras de agua tomadas, lo cual podría conducir a un cambio morfológico (Khalil et al., 2016; Machado et al., 2022). Debido a esto, es importante que se hagan investigaciones a futuro, donde se amplíe la observación de las células huésped a través del uso de microscopios más potentes como los TEM (microscopio electrónico de transmisión) o SEM (microscopio electrónico de barrido). Además, se podrían realizar pruebas tempranas de detección molecular tal como lo mencionan Khalil et al. (2016) y Pagnier et al. (2013) en sus investigaciones sobre el mejoramiento potencial en el aislamiento de virus gigantes de muestras ambientales y humanas. Por otro lado, se podría optar por herramientas más potentes como lo es la secuenciación, con lo cual se podría llegar a un nivel de identificación muy alto.

8. Conclusiones

Acanthamoeba castellanii es capaz de propagarse en distintas condiciones y en una serie de medios, sean estos líquidos o sólidos. Las investigaciones sobre los cultivos de *Acanthamoeba* son imprescindibles para el estudio de otros organismos como los virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño, y la proyección que se tiene sobre futuros análisis que lleguen a concretarse para conocer el origen de los virus gigantes y sus potenciales funciones en el ambiente. Los resultados brindaron evidencia sólida sobre los medios axénicos y monoxénicos para el desarrollo de *A. castellanii* ATCC 30010, en donde los medios efectivos empleados fue el agar no nutritivo con *E.coli* inactiva y PYG, siendo este último el ideal para la división más rápida de las células amebales, aspecto fundamental para la realización de cocultivos para la identificación de virus gigantes.

Se reveló la potencial presencia de virus gigantes en 4 lagunas de la ciudad de Loja, donde se realizó una identificación morfológica a través de la observación de efectos citopáticos por microscopía. Donde se han descrito y demostrado la diversidad de cambios físicos de las células infectadas; este hallazgo es importante para comprender la interacción de los virus gigantes y sus células hospedadoras, y en un futuro comprender cuáles son las implicaciones del intercambio genético entre estos organismos para el ambiente. Además, los resultados sugieren que es necesario adoptar un enfoque molecular o la observación por microscopía, considerando aquellos más potentes, con los que se pueda obtener imágenes del citoplasma de las amebas, donde se observe con mayor detalle el mecanismo de infección por virus gigantes.

Los virus gigantes son complejos y este estudio confirma que los mismos son agentes ubicuos, se los encuentra, en una variedad de entornos, en este caso acuáticos. Esto debido a que fue posible la observación de efectos citopáticos provocados por virus gigantes en ambientes con diferencias en temperatura, pH, entre otros parámetros; al encontrarse en estos cuerpos de agua se evidencia que se pueden encontrar incluso en zonas inexploradas, donde los virus pueden estar interactuando con una serie de organismos de los cuales aún no se tienen estudios.

9. Recomendaciones

La metodología utilizada fue óptima para el desarrollo de las células amebales, pese a ello existen otros procedimientos donde se emplean distintos medios igual de efectivos, por ejemplo, en el caso del cultivo monoxénico se podría emplear el agar no nutritivo con otras

bacterias como *Pseudomona aeuroginosa* la cual en algunos estudios ha tenido valores bastante altos de crecimiento de *Acanthamoeba*. Además, si bien es cierto el medio líquido PYG es el medio más empleado, clásico y básico que resulta sumamente efectivo para el crecimiento de *Acanthamoeba*, pero pese a ello, se ha encontrado que el medio comercial Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 es excelente para el desarrollo de esta ameba y la puede llegar a mantener en buenas condiciones por largos períodos de tiempo.

Por otro lado, en cuanto a los antibióticos empleados para el control bacteriano y disminución de la contaminación de las muestras de agua podrían mejorarse con un coctél con más variedad de antibióticos que ataquen a agentes específicos o configurar la concentración de los mismos; además de que se podría agregar un antimicótico en el caso de que exista riesgo de contaminación por hongos.

Se debe considerar que tan solo en un mililitro de agua puede existir un sinnúmero de virus gigantes, por lo que es importante continuar con estudios acerca de la diversidad local de éstos, y con ello lograr definir las interacciones de virus-hospedador para determinar la historia de la evolución de los virus gigantes y así poder realizar análisis comparativos entre virus de distintas muestras. En este sentido, también se recomienda ampliar este tipo de estudios a muestras de suelo o sedimentos, de este modo se podrían llegar a definir con mayor exactitud las funciones ambientales y ecosistémicas de los virus. Además, es recomendable llevar el estudio a niveles bioquímicos y moleculares más detallados que ayuden a identificar con qué tipo de cepas se está tratando.

10. Bibliografía

- Abergel, C., Legendre, M., & Claverie, J. M. (2015). The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 779–796. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV037>
- Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C. F., Almeida, G. M., Boratto, P. V. M., Colson, P., La Scola, B., & Kroon, E. G. (2014a). *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus and other giant viruses: an open field to outstanding discoveries. *Virology Journal*, 11(1), 120. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-120>

- Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C. F., Almeida, G. M., Boratto, P. V. M., Colson, P., La Scola, B., & Kroon, E. G. (2014b). Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: An open field to outstanding discoveries. *Virology Journal*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-120/FIGURES/1>
- Abrahão, J. S., Dornas, F. P., Silva, L. C. F., Almeida, G. M., Boratto, P. V. M., Colson, P., La Scola, B., & Kroon, E. G. (2014c). Acanthamoeba polyphaga mimivirus and other giant viruses: An open field to outstanding discoveries. *Virology Journal*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-120/FIGURES/1>
- Aherfi, S., Colson, P., La Scola, B., & Raoult, D. (2016). Giant viruses of amoebas: An update. *Frontiers in Microbiology*, *7*(MAR), 349. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00349/BIBTEX>
- Aguirre Mendoza, Z., Aguirre Mendoza, N., & Muñoz Ch, J. (2017). Biodiversidad de la provincia de Loja, Ecuador. *Arnaldoa*, *24*(2), 523-542.
- Alsam, S., Jeong, S. R., Sissons, J., Dudley, R., Kim, K. S., & Khan, N. A. (2006). Escherichia coli interactions with Acanthamoeba: A symbiosis with environmental and clinical implications. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(6), 689–694. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.46497-0/CITE/REFWORKS>
- Andrade, A. C. D. S. P., Arantes, T. S., Rodrigues, R. A. L., Machado, T. B., Dornas, F. P., Landell, M. F., Furst, C., Borges, L. G. A., Dutra, L. A. L., Almeida, G., Trindade, G. D. S., Bergier, I., Abrahão, W., Borges, I. A., Cortines, J. R., De Oliveira, D. B., Kroon, E. G., & Abrahão, J. S. (2018). Ubiquitous giants: A plethora of giant viruses found in Brazil and Antarctica. *Virology Journal*, *15*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12985-018-0930-X/FIGURES/4>
- Attariani, H., Turki, H., Shoja, S., Salahi-Moghaddam, A., Ghanbarnejad, A., & Shamseddin, J. (2020). Investigating the frequency of free-living amoeba in water resources with emphasis on Acanthamoeba in Bandar Abbas city, Hormozgan province, Iran in 2019-2020. *BMC Research Notes*, *13*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13104-020-05267-Z/TABLES/1>

- Axelsson-Olsson, D., Olofsson, J., Ellström, P., Waldenström, J., & Olsen, B. (2009). A simple method for long-term storage of *Acanthamoeba* species. *Parasitology Research*, *104*(4), 935–937. <https://doi.org/10.1007/S00436-008-1304-X>METRICS
- Bonkowski, M. (2004). Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist*, *162*(3), 617–631. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2004.01066.X>
- Boratto, P. V. M., Oliveira, G. P., Machado, T. B., Andrade, A. C. S. P., Baudoin, J. P., Klose, T., Schulz, F., Azza, S., Decloquement, P., Chabrière, E., Colson, P., Levasseur, A., la Scola, B., & Abrahão, J. S. (2020). Yaravirus: A novel 80-nm virus infecting *Acanthamoeba castellanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(28), 16579–16586. https://doi.org/10.1073/PNAS.2001637117/SUPPL_FILE/PNAS.2001637117.SM03.MP4
- Brandes, N., & Linial, M. (2019a). Giant Viruses—Big Surprises. *Viruses*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/V11050404>
- Brandes, N., & Linial, M. (2019b). Giant Viruses—Big Surprises. *Viruses*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/V11050404>
- Campos, R. K., Boratto, P. V., Assis, F. L., Aguiar, E. R. G. R., Silva, L. C. F., Albarnaz, J. D., Dornas, F. P., Trindade, G. S., Ferreira, P. P., Marques, J. T., Robert, C., Raoult, D., Kroon, E. G., La Scola, B., & Abrahão, J. S. (2014). Samba virus: A novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. *Virology Journal*, *11*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-95/FIGURES/7>
- Claverie, J. M., & Abergel, C. (2009). Mimivirus and its Virophage. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Genet-102108-134255>, *43*, 49–66. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-102108-134255>
- Colson, P., Yutin, N., Shabalina, S. A., Robert, C., Fournous, G., La Scola, B., Raoult, D., & Koonin, E. V. (2011). Viruses with more than 1,000 genes: Mamavirus, a new *Acanthamoeba*

- polyphaga mimivirus strain, and reannotation of Mimivirus genes. *Genome Biology and Evolution*, 3(1), 737–742. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVR048>
- Dornas, F. P., Khalil, J. Y. B., Pagnier, I., Raoult, D., Abrahão, J., & La Scola, B. (2015). Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 1086. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01086/BIBTEX>
- Elbing, K. L., & Brent, R. (2019). Recipes and Tools for Culture of Escherichia coli. *Current Protocols in Molecular Biology*, 125(1), e83. <https://doi.org/10.1002/CPMB.83>
- Eroğlu, F., Evyapan, G., & Koltaş, İ. S. (2015). *Middle Black Sea Journal of Health Science*. 1(3), 13–17. <https://doi.org/10.19127/mbsjohs.71412>
- Gallegos-Neyra, E. M., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Del Rosario Sánchez-Rodríguez, M., & Mayén-Estrada, R. (2014). Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), S10–S25. <https://doi.org/10.7550/RMB.33691>
- Heredero-Bermejo, I., San Juan Martin, C., Soliveri De Carranza, J., Copa-Patiño, J. L., & Pérez-Serrano, J. (2012). Acanthamoeba castellanii: In vitro UAH-T17c3 trophozoite growth study in different culture media. *Parasitology Research*, 110(6), 2563–2567. <https://doi.org/10.1007/S00436-011-2761-1/METRICS>
- Jaramillo, A. (2002). *Historia de Loja y su provincia* (4th ed.).
- Khalil, J. Y. B., Andreani, J., & La Scola, B. (2016). Updating strategies for isolating and discovering giant viruses. *Current Opinion in Microbiology*, 31, 80–87. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2016.03.004>
- Khalil, J. Y. B., Robert, S., Reteno, D. G., Andreani, J., Raoult, D., & La Scola, B. (2016). High-Throughput Isolation of Giant Viruses in Liquid Medium Using Automated Flow Cytometry and Fluorescence Staining. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00026>

- Koonin, E. V., & Yutin, N. (2019). Evolution of the Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses of Eukaryotes and Convergent Origins of Viral Gigantism. *Advances in Virus Research*, *103*, 167–202. <https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2018.09.002>
- La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., De Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J. M., & Raoult, D. (2003). A giant virus in amoebae. *Science*, *299*(5615), 2033. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1081867/SUPPL_FILE/LASCOLA.SOM.PDF
- Lee, J., & Kaletunç, G. (2002). Evaluation of the heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(11), 5379–5386. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5379-5386.2002/ASSET/AF30CE99-E148-49FD-831E-18E80D6AE9BA/ASSETS/GRAPHIC/AM1120302008.JPEG>
- Louten, J. (2016). Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology*, *19*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8>
- Machado, T. B., de Aquino, I. L. M., & Abrahão, J. S. (2022). Isolation of Giant Viruses of *Acanthamoeba castellanii*. *Current Protocols*, *2*(5), e455. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.455>
- Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(2), 273. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>
- Mateu, M. G. (2013). Introduction: The Structural Basis of Virus Function. *Structure and Physics of Viruses*, *68*, 3. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6552-8_1
- Oliveira, G., La Scola, B., & Abrahão, J. (2019). Giant virus vs amoeba: Fight for supremacy. *Virology Journal*, *16*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12985-019-1244-3/METRICS>
- Pagnier, I., Reteno, D. G. I., Saadi, H., Boughalmi, M., Gaia, M., Slimani, M., Ngounga, T., Bekliz, M., Colson, P., Raoult, D., & La Scola, B. (2013a). A Decade of Improvements in Mimiviridae and Marseilleviridae Isolation from Amoeba. *Intervirology*, *56*(6), 354–363. <https://doi.org/10.1159/000354556>

- Pagnier, I., Reteno, D. G. I., Saadi, H., Boughalmi, M., Gaia, M., Slimani, M., Ngounga, T., Bekliz, M., Colson, P., Raoult, D., & La Scola, B. (2013b). A Decade of Improvements in Mimiviridae and Marseilleviridae Isolation from Amoeba. *Intervirology*, 56(6), 354–363. <https://doi.org/10.1159/000354556>
- Philippe, N., Legendre, M., Doutre, G., Couté, Y., Poirot, O., Lescot, M., Arslan, D., Seltzer, V., Bertaux, L., Bruley, C., Garin, J., Claverie, J. M., & Abergel, C. (2013). Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6143), 281–286. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1239181>
- Pirtle, E. C., & Beran, G. W. (1991). Virus survival in the environment. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 10(3), 733–748. <https://doi.org/10.20506/RST.10.3.570>
- Preston, T. M., Richards, H., & Wotton, R. S. (2001). Locomotion and feeding of Acanthamoeba at the water–air interface of ponds. *FEMS Microbiology Letters*, 194(2), 143–147. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2001.TB09459.X>
- Rayamajhee, B., Willcox, M. D. P., Henriquez, F. L., Petsoglou, C., Subedi, D., & Carnt, N. (2022). Acanthamoeba, an environmental phagocyte enhancing survival and transmission of human pathogens. *Trends in Parasitology*, 38(11), 975–990. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2022.08.007>
- Rodríguez-Zaragoza, S. (2008). Ecology of Free-Living Amoebae. *Https://Doi.Org/10.3109/10408419409114556*, 20(3), 225–241. <https://doi.org/10.3109/10408419409114556>
- Rossmann, M. G. (2013). Structure of viruses: a short history. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(2), 133–180. <https://doi.org/10.1017/S0033583513000012>
- Schulz, F., Roux, S., Paez-Espino, D., Jungbluth, S., Walsh, D. A., Deneff, V. J., McMahon, K. D., Konstantinidis, K. T., Eloë-Fadrosch, E. A., Kyrpides, N. C., & Woyke, T. (2020). Giant virus

- diversity and host interactions through global metagenomics. *Nature* 2020 578:7795, 578(7795), 432–436. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1957-x>
- Schulz, F., Yutin, N., Ivanova, N. N., Ortega, D. R., Lee, T. K., Vierheilig, J., Daims, H., Horn, M., Wagner, M., Jensen, G. J., Kyrpides, N. C., Koonin, E. V., & Woyke, T. (2017). Giant viruses with an expanded complement of translation system components. *Science*, 356(6333), 82–85. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL4657/SUPPL_FILE/SCHULZ.SM.PDF
- Shabardina, V., Kischka, T., Kmita, H., Suzuki, Y., & Makałowski, W. (2018). Environmental adaptation of *Acanthamoeba castellanii* and *Entamoeba histolytica* at genome level as seen by comparative genomic analysis. *International Journal of Biological Sciences*, 14(3), 306. <https://doi.org/10.7150/IJBS.23869>
- Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2012a). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-6/FIGURES/6>
- Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2012b). War of the microbial worlds: Who is the beneficiary in *Acanthamoeba*–bacterial interactions? *Experimental Parasitology*, 130(4), 311–313. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2012.01.021>
- Stough, J. M. A., Yutin, N., Chaban, Y. V., Moniruzzaman, M., Gann, E. R., Pound, H. L., Steffen, M. M., Black, J. N., Koonin, E. V., Wilhelm, S. W., & Short, S. M. (2019). Genome and environmental activity of a chrysochromulina parvavirus and its virophages. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 703. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00703/BIBTEX>
- Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018267>
- Tang, L. (2020). Learning the diversity of giant viruses. *Nature Methods* 2020 17:3, 17(3), 253–253. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0778-z>
- Yamada, T. (2011). Giant viruses in the environment: their origins and evolution. *Current Opinion in Virology*, 1(1), 58–62. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2011.05.008>

Yousuf, F. A., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2013). *Acanthamoeba castellanii* of the T4 genotype is a potential environmental host for *Enterobacter aerogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Parasites and Vectors*, *6*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-169/FIGURES/5>

Yutin, N., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2014). Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology*, *466–467*, 38–52. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.06.032>

11. Anexos

Anexo 1. Protocolo para cultivos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC30010

Protocolo 1

Proceso: Medio de proteasa-peptona-glucosa (PYG)

1. Aplicación: El PYG se emplea en el cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

2. Materiales y equipos:

Recipientes plásticos para pesar

Matraz de vidrio de 1000 ml

Matraz de vidrio de 500 ml

Probeta graduada

Balanza analítica

Autoclave

Estufa

Espátula

3. Protocolo de preparación:

- Pesar los reactivos descritos en la Tabla 1 en una balanza analítica, se debe tener cuidado con los límites permitidos del equipo. Para el caso del agua destilada utilizar una probeta graduada de 1000 ml para su medición; y, para la gentamicina emplear una pipeta de 1000 μ l.

Tabla 3. Reactivos para la preparación de PYG

| | |
|--|---------|
| Peptona | 3,75 g |
| Extracto de levadura | 0,37 g |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O) | 0,49 g |
| Cloruro de calcio (CaCl ₂ . 2H ₂ O) | 0,03 g |
| Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O) | 0,50 g |
| Sulfato de amoníaco ferroso [Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 6H ₂ O] | 0,01 g |
| Fosfato dihidrógeno de potasio (KH ₂ PO ₄) | 0,02 g |
| Fosfato de hidrógeno disódico anhidro (Na ₂ HPO ₄) | 0,178 g |
| Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆) | 7,50 g |
| Agua destilada | 500 ml |
| Gentamicina | 1,00 ml |

- Agregar en un matraz el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 200 ml de agua destilada y agitar hasta disolver.
- En un matraz se deberán agregar los otros reactivos en los 300 ml de agua destilada restantes, los reactivos se colocarán en el orden descrito en la Tabla 1, se agitará y se añadirá los 200 ml de agua destilada con el reactivo previamente disuelto.
- El recipiente con la solución se llevará a la estufa para asegurar que se disuelvan correctamente los reactivos, a 80 °C por 10 minutos. Culinado este tiempo, tomar la cantidad de antibiótico indicado y agregarle al medio.
- Luego llevar el medio PYG a la autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Proceso: Solución salina amebal

1. Aplicación: La solución salina amebal es la solución madre que se emplea para la preparación del medio sólido para el cultivo de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, agar no nutritivo.

2. Materiales y equipos:

Recipientes plásticos para pesar

Matraz de vidrio de 1000 ml

Matraz de vidrio de 500 ml

Probeta graduada

Balanza analítica

Autoclave

Estufa

Espátula

3. Protocolo de preparación:

- Pesar los reactivos descritos en la Tabla 2 en una balanza analítica. Para el caso del agua destilada utilizar una probeta graduada de 1000 ml para su medición.

Tabla 4. Reactivos para la preparación de la solución salina amebal

| | |
|---|---------|
| Cloruro de sodio (NaCl) | 0,06 g |
| Sulfato de magnesio (MgSO ₄) | 0,005 g |
| Fosfato de hidrógeno disódico anhidro (Na ₂ HPO ₄) | 0,07 g |
| Fosfato de dihidrógeno de potasio (KH ₂ PO ₄) | 0,07 g |
| Cloruro de calcio (CaCl ₂) | 0,002 g |
| Agua destilada | 500 ml |

- Agregar en un matraz el CaCl₂ · 2H₂O en 200 ml de agua destilada y agitar hasta disolver.
- En un matraz se deberán agregar los otros reactivos en los 300 ml de agua destilada restantes, los reactivos se colocarán en el orden descrito en la Tabla 2, se agitará y se añadirá los 200 ml de agua destilada con el reactivo previamente disuelto.
- El recipiente se llevará a la estufa para asegurar que se disuelvan correctamente los reactivos, a 80 °C por 10 minutos.
- Luego llevar el medio PYG a la autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Proceso: Agar no nutritivo.

- 1. Aplicación:** El agar no nutritivo es un medio sólido para la propagación de cultivos de *Acanthamoeba castellanii* 30010.
- 2. Materiales y equipos:**
 - Recipientes plásticos para pesar
 - Matraz de vidrio de 500 ml
 - Probeta graduada
 - Balanza analítica
 - Autoclave
 - Estufa
 - Espátula
 - Placas petri
- 3. Protocolo de preparación:**

- Pesar los reactivos descritos en la Tabla 3 en una balanza analítica. Para el caso del agua destilada emplear una probeta graduada de 500 ml para su medición.

Tabla 5. Reactivos y solución para la preparación del agar no nutritivo

| | |
|------------------------|--------|
| Agar-agar | 6 g |
| Solución salina amebal | 40 ml |
| Agua destilada | 400 ml |

- En un matraz se deberá agregar el agar-agar y la solución salina amebal en los 400 ml de agua destilada. Culminado este paso, agitar manualmente el contenido.
- El recipiente se llevará a la estufa para asegurar que se disuelvan correctamente los reactivos, a 80 °C por 10 minutos.
- Luego llevar el medio agar no nutritivo a la autoclave a 121 °C por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, sacar del equipo el matraz y dispensar el medio en cajas Petri las cuales se sellarán con parafilm y se podrán mantener en refrigeración.

Proceso: Cultivo e inactivación de *E. coli* ATCC 25922

1. Aplicación: *E. coli* ATCC 25922 se utiliza como sustrato en cultivos con agar no nutritivo de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010.

2. Materiales y equipos:

Matraz de vidrio de 1000 ml

Probeta graduada

Tubos de 15 ml

Cajas Petri

Microtubos plásticos estériles (1.5 ml)

Balanza analítica

Autoclave

Estufa

Espátula

Baño María

Incubadora

3. Protocolo de preparación:

- Preparar medio de cultivo (se puede preparar agar nutritivo) para propagar *E.coli*.
- Con ayuda de la probeta tomar 1000 ml de agua destilada. Colocar poco a poco el agua destilada en un matraz de 1000 ml junto con el medio que se pesó y disolver todo en el agua.
- Colocar el matraz en la plancha caliente y dejar agitar durante 15 min para homogeneizar el medio del cultivo. Llevar a la autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez que sale de la autoclave dispensar el medio en cajas petri en un ambiente estéril.
- Realizado el medio procede la activación de *E. coli* para lo cual se tomará los viales guardados que contienen la cepa bacteriana, se vertirá el contenido en un tubo de 15 ml con agua de peptona y se lleva a incubar a 30 °C por 24 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación se toma una cantidad del agua de peptona con *E. coli* y se coloca en una placa con agar nutritivo a través del método de agotamiento de estría. Se deberá sembrar en varias cajas, para de este modo obtener una cantidad adecuada de *E. coli* que sirva como sustrato para las amebas.
- Para que la cepa bacteriana sirva de sustrato tendrá que estar inactiva, de este modo no inhibirá el crecimiento de la ameba. En tanto que, la inactivación de *E.coli* requiere de tubos falcon de 15 ml donde se deberá colocar 5 ml de agua de peptona.
- Con ayuda de un asa de siembra tomar una colonia de la placa con cultivo de *E.coli* en medio sólido (agar nutritivo).
- Colocar el asa en posición vertical y dejar caer la colonia de *E.coli* en los tubos con peptona.
Nota: Tener cuidado, el asa no deberá tocar las paredes del tubo. En caso de que la colonia no se desprenda con facilidad se puede dar movimientos de agitación dentro del tubo.
- Dejar los tubos en la incubadora a una temperatura de 30 °C por aproximadamente 24 horas (los mismos deben estar sellados con parafilm).
- Comprobar el crecimiento de *E.coli* en los tubos con peptona. Tomar 1 ml de contenido de los tubos y colocar en viales de 1.5 ml, los mismos deben estar sellados con parafilm.
- Estos viales se llevarán al baño María a una temperatura de 56 °C por 2 horas.
- Culminado el proceso, *E. coli* estará inactiva.

Proceso: Cultivo axénico de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

1. **Aplicación:** Se utiliza para la propagación de células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, en medio líquido (PYG).

2. Materiales y equipos:

Tubos de 15 ml

Centrífuga

Incubadora

Frascos de cultivo celular de 75 cm²

Microtubos plásticos estériles (1.5 ml)

3. Protocolo de preparación:

- Colocar 5 ml de medio PYG en tubos de 15 ml y verter el contenido de los microtubos (1 ml).
- Llevar los tubos a la centrífuga a 1500 rpm por 5 min.
- Se obtendrá un sobrenadante el cual se desechará.
- El pallet de amebas se dejará en los mismos tubos y se les agrega 5 ml de PYG fresco. Los tubos se llevarán a incubar a 30°C por 72 horas. Los mismos deberán estar correctamente sellados con parafilm.
- Una vez que se compruebe el crecimiento de las células amebales en un microscopio invertido se tomará 3 ml del contenido de los tubos y se transferirá a frascos de cultivo celular (T-75) que contendrá 25 ml de PYG fresco. Los frascos serán sellados y se dejarán incubar a 30 °C por 48-72 horas para alcanzar una confluencia celular alta.
- Transcurrido el tiempo establecido se observará una monocapa adherida a la parte inferior del frasco de cultivo celular, esta tiene un color blanquecino-transparente. Se puede llevar los frascos a observación en un microscopio invertido 10x, si la confluencia está entre un 90-100% se deberá cambiar de medio por uno fresco.

Nota: Si el cultivo está muy confluente puede que la monocapa se empiece a desprender y las células ya no sean viables.

- Se podrán hacer subcultivos de las células. Por lo cual se debe separar las amebas adheridas a la pared inferior del frasco de cultivo celular con ayuda de una pipeta, realizando un lavado de las mismas para que se desprendan con mayor facilidad, una vez que se haya limpiado cerca del 80% del frasco se tomará 3 ml de células y se inoculará en frascos de cultivo celular estériles con 25 ml de PYG fresco.

Proceso: Cultivo monoxénico de *A. castellanii* ATCC 30010 utilizando *E. coli* ATCC 25922

1. Aplicación: Se utiliza para la propagación de células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, en medio sólido (agar no nutritivo).

2. Materiales y equipos:

Pipeta de 100-1000 ul.

Incubadora

3. Protocolo de preparación:

- Colocar 5 ml de medio PYG en tubos falcon de 15 ml y verter el contenido de los viales Eppendorf (1 ml).
- Llevar los tubos a la centrífuga a 1500 rpm por 5 min.
- Con una pipeta de 100 µl se esparcirá el contenido de los cultivos en cajas petri con agar no nutritivo. La caja deberá contener 75 µl de *A. castellanii* (centrifugadas) y 75 µl de *E.coli* previamente inactiva.
- Se etiqueta las cajas y se sellan con parafilm.
- Se deja en la incubadora a 30° C por 4-5 días aproximadamente donde se podrá observar el crecimiento de las amebas a través de microscopía.

Proceso: Conteo de células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

1. Aplicación: Se utiliza determinar el número de células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, en medio sólido líquido.

2. Materiales y equipos:

Cámara Neubauer

Viales Eppendorf (1,5 ml)

Microscopio invertido

3. Protocolo de preparación:

- Para minimizar el error de contar células que no están viables se utiliza azul de tripano, con el fin de teñir las amebas que no estén vivas.
- Se tomará un vial de 1.5 ml y se colocará 100 µl de contenido de amebas y 25 µl de azul de tripano.
- Con ayuda de una micropipeta se colocará 5 ul del contenido preparado y se realizará el conteo en las cuatro retículas trazadas en las esquinas.

- En tanto que se puede determinar la concentración de células por mililitro tal como se indica en la ecuación 1.

$$N \text{ células/ml} = \frac{\text{Total células contadas}}{4 \text{ cuadrantes contados}} \times 10^4 \quad (1)$$

Protocolo 1

Proceso: Mantenimiento de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010

1. Aplicación: Se utiliza determinar el número de células de *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010, en medio sólido líquido.

2. Materiales y equipos:

Frasco de cultivo celular (T-75)

Incubadora

Congelador

Tubos de 15 ml

3. Protocolo de preparación:

- Sembrar la cepa amebal en un frasco de cultivo celular (T-75) en medio PYG e incubar a 30 °C hasta que se forme una capa en el fondo del frasco.
- A partir de estos cultivos se obtendrán muestras para almacenamiento separando las amebas por medio del método de congelación suave.
- En el método de congelación el medio será reemplazado por 2 ml de medio PYG fresco. El frasco de cultivo celular se llevará a congelar a -20 °C por 10 min (esto permitirá que las amebas se despeguen).
- Seguido a ello se tomarán muestras de 1 ml y se pondrá en tubos con tapa rosca.
- Estas muestras se almacenarán en el refrigerador a 8 °C.

Anexo 2. Protocolo para la infección de *Acanthamoeba castellanii* ATCC30010 con virus gigantes presentes en cuerpos lacustres: Método de cocultivo

Proceso: Obtención y preparación de las muestras de agua

1. Aplicación: Con la preparación de la muestra de agua se espera eliminar organismos de tal manera que se obtenga el enriquecimiento viral para inoculación.

2. Materiales y equipos:

Tubos de 50 ml

Congelador

Multiparámetro

Microtubos plásticos estériles (1.5 ml)

3. Protocolo de preparación:

- Tomar muestras de >10 ml de agua en tubos estériles.
- La toma de muestras se hará sumergiendo el frasco de manera opuesta a la dirección del flujo.
- Registrar a través de GPS la localización del punto de muestreo.
- Registrar los parámetros in situ (temperatura, pH, conductividad y sólidos suspendidos)
- Etiquetar los frascos con los datos necesarios para la identificación de la muestra (fecha de muestreo, persona responsable, punto GPS).
- Para minimizar la carga microbiana presente en las muestras de agua tomadas se deberá pasar las muestras por 3 ciclos de congelación y descongelación. Esto se realizará en 3 días.
- Se realizarán alícuotas de la muestra de agua y se hará una dilución 1:10 para lo que utilizarán los viales, colocando 900 µl de agua destilada y 100 µl de la muestra de agua.

Proceso: Cultivo monoxénico (*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 + Virus)

1. **Aplicación:** El cocultivo sirve para el aislamiento de virus gigantes de muestras ambientales, en este caso de agua, a través de la infección de *A. castellanii* y el uso de antibióticos.
2. **Materiales y equipos:**
 - Placas de 96 pocillos
 - Congelador
 - Pipeta de 100-1000 μ l
 - Tubos de 15 ml
 - Microtubos plásticos estériles (1.5 ml)
3. **Protocolo de preparación:**
 - Para iniciar con este proceso se requieren de algunos antibióticos que se le agregará al medio PYG, los mismos se describen en la Tabla 6. Además de una solución que se le añadirá al cultivo de amebas y que servirá como control, este es el PBS.

Tabla 6. Antibióticos y solución a emplearse en el cocultivo

| | |
|----------------|-------------|
| Vancomicina | 0,04 mg/ml |
| Ciprofloxacino | 0,04 mg/ml |
| Doxiciclina | 0,02 mg/ml |
| PBS 1X | 100 μ l |

- Una vez que se haya verificado que existe una confluencia celular alta en los cultivos de las amebas, se desechará el PYG y será reemplazado por 13 ml de PYG fresco enriquecido con los antibióticos antes mencionados.
- Se agregará el PYG con antibióticos al frasco de cultivo celular y se realizará un lavado de las células para que las mismas se desprendan del frasco, una vez que se haya lavado, se transferirá el contenido a un tubo de 15 ml.
- El PBS en caso de estar en 10x se tendrá que diluir a 1x. Para lo cual se colocará 900 μ l de agua destilada y 45 ml de PBS en viales de 5 ml.
- Se tomará aproximadamente 40 000 células amebales (100 μ l) y se depositará esta cantidad en cada pocillo, la placa se sellará y se llevará a incubar a 30 °C por 24 horas.

- Transcurrido este tiempo agregaremos en cada pocillo 100 μ l de muestra de agua diluida, y en otros 100 μ l de agua sin diluir. Mientras que en otros pocillos agregaremos tan solo 100 μ l de PBS 1x que servirá de control (Figura 1).

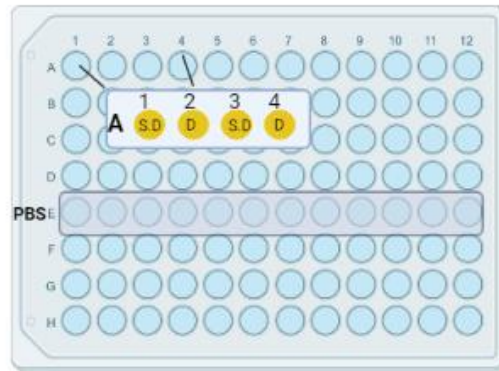
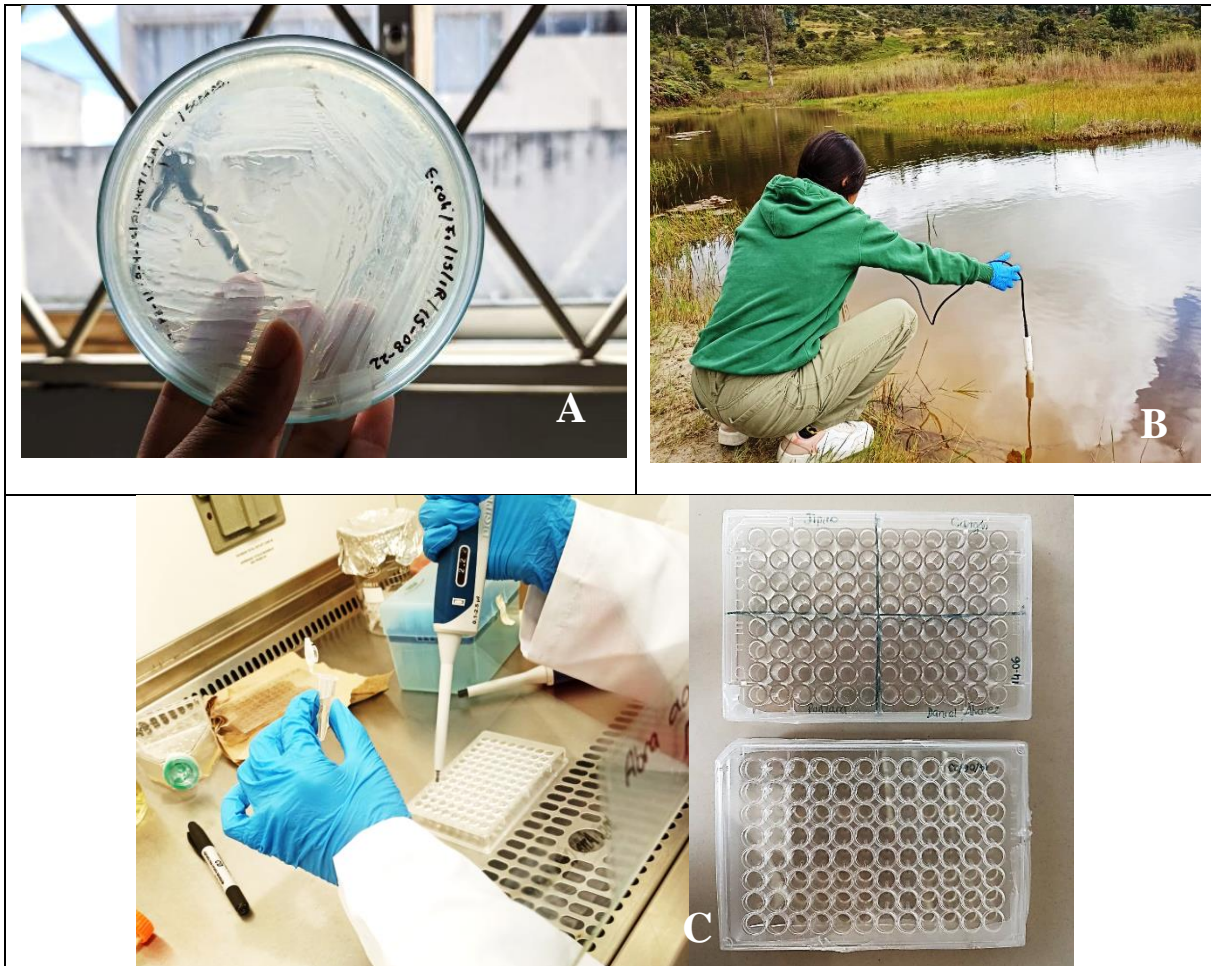


Figura 6. Ejemplo. Configuración de las infecciones y controles en la placa de 96 pocillos

Nota. Elaboración propia. Creado en BioRender.com. SD: muestras de agua sin dilución; D: muestras de agua diluidas.

- Una vez que se termine el proceso de inoculación de las muestras de agua sellaremos la placa y la llevaremos a incubar a 30 °C por 5 días.
- Se realizará una inspección diaria de los cultivos, es decir a las: 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Esto con el objetivo de identificar los efectos citopáticos que puedan estar provocando los virus gigantes en las amebas, esto podría ser: redondeo celular, desprendimiento de la monocapa, lisis celular o formación de racimos.

Anexo 3. Cultivos de *A. castellanii* ATCC 30010





unl

Universidad
Nacional
de Loja



Ingeniería Ambiental



GRUPO DE INVESTIGACION
GENÉTICA Y BIOLÓGÍA MOLECULAR

Anexo 4. Certificado de traducción del resumen



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Loja, 7 de febrero de 2024

Magister

JHIMI BOLTER VIVANCO LOAIZA

**CATEDRÁTICO DE LA CARRERA DE PEDAGOGÍA DE LOS
IDIOMAS NACIONALES Y EXTRANJEROS - UNL**

C E R T I F I C O :

Que el documento aquí expuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés del resumen del Trabajo de Titulación denominado: Cultivo de amebas del género *Acanthamoeba* ATCC 30010 con enfoque al estudio de virus nucleocitoplasmáticos de ADN de gran tamaño, de autoría Adamary Carolina Vásquez Tituana, con cédula de ciudadanía número 1150007290, de la Carrera de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Loja.

Lo certifico y autorizo hacer uso del presente en lo que a sus intereses convenga.



JHIMI BOLTER VIVANCO LOAIZA, M. Ed.

**CATEDRÁTICO DE LA CARRERA DE PEDAGOGÍA
DE LOS IDIOMAS NACIONALES Y EXTRANJEROS - UNL**

Educamos para **Transformar**

