



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Bioprospección de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica*
multirresistente de origen avícola de la provincia de Tungurahua

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieras Biotecnólogas, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTORES: Katheryne Yolanda Morales Cunalata

Paulina Liseth Topa Pila

TUTOR: PhD. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato-Ecuador

Septiembre - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación, ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 21 de Julio del 2023

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 1714344885-9

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Kathyryne Yolanda Morales Cunalata y Paulina Liseth Topa Pila, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieras Biotecnólogas, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Kathyryne Yolanda Morales Cunalata

CI. 1805047758

AUTOR



Paulina Liseth Topa Pila


C.I. 0504320797

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedemos los derechos en línea patrimoniales de nuestro Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Kathyryne Yolanda Morales Cunalata

CI. 1805047758

AUTOR



Paulina Liseth Topa Pila

C.I. 0504320797

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

Presidente del Tribunal

B.F. Irvin Ricardo Tubón Usca, PhD.

C.I. 060425035-7

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 180357158-5

Ambato, 25 de Agosto del 2023

DEDICATORIA

“No hay que temer a nada en la vida, sólo tratar de comprenderlo”

Marie Curie

A Dios y la Virgen María,

Por ser mi fuente de fortaleza en los momentos más felices y difíciles de este proceso

A mis padres, mi hermano y mi novio,

Por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

Los amo.

Katheryne Yolanda Morales Cunalata

DEDICATORIA

“Para ti, que intentas salvar el mundo

a través de la ciencia”.

Paulina Liseth Topa Pila

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen María, por ser luz en mis días más oscuros, quienes sustentan mi caminar y me han permitido poder llegar a culminar este arduo trayecto, con salud y vida.

Agradezco profundamente a mis padres, Nelson Morales y Mónica Cunalata, por ser los mejores acompañantes en mi proceso académico, por ser esa mano que me sostiene cuando voy a caer, por su constante paciencia, amor y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida. Gracias por enseñarme la importancia de la educación, de la familia y sobre todo del trabajo duro. ¡Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible!

A mi hermano, David Morales, por ser quien me ha apoyado en todos mis momentos de debilidad, gracias, por enseñarme el valor de la confianza, por todo el apoyo profesional y económico. Te mereces lo mejor del mundo.

A mi novio, Ronald Castro, por su amor, dedicación y constante paciencia, por ser quien siempre me respaldó y me animó a seguir con mis sueños.

A mi tutor académico, Dr. William Ricardo Calero Cáceres, por ser mi mentor profesional, por la confianza depositada en mí, por la paciencia y la acertada orientación experimental y teórica, que hizo posible la culminación del presente trabajo.

A Pauli, porque juntas hemos superado todos los obstáculos en la realización de este proyecto, por ser mi buena cómplice de aventuras, mi compañera de viaje y mi amiga fiel en este camino de valientes, ¡gracias por todo, que la vida te premie con mucho más!

A mis amigos, Gaby Jerez, Gaby Lagla, Leonardo Barriga, por su tiempo, apoyo y amistad incondicional. ¡Que Dios los bendiga!

A Mica, Ani y Nathy, quienes me acompañaron en la realización ardua de este proyecto, gracias por su apoyo.

Katheryne Yolanda Morales Cunalata

AGRADECIMIENTO

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido”

-Carl Sagan

Al haber culminado mi trabajo de titulación, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis más sinceros agradecimientos.

A mis padres por ser los principales promotores de mis sueños y enseñarme que nada es imposible. Por su paciencia y dedicación al criarme, por la compañía en las largas noches de estudio, por sus consejos y cada palabra de aliento que me ayudó a seguir adelante. Gracias, por confiar y creer en mí.

A mis hermanos, por su amor incondicional. Gracias, por ser mi fuerza y motivación. Son el mejor regalo que la vida me ha dado.

A mi amiga y compañera de aventuras Katheryne Morales, por recorrer este camino a mí lado. El trabajo que realizamos no ha sido fácil y a pesar de ello no me arrepiento de haberlo compartido contigo. Gracias, por estar siempre ahí, por no dejarme caer en los momentos más duros, por ser un refugio en cada crisis de estrés. Disfruté cada momento a tu lado.

A mi tutor PhD. William Calero por su dedicación e infinita paciencia. Por estar presente y aclarar todas mis dudas en la elaboración de este trabajo. Gracias, por su guía y los consejos, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional.

A mis amigos Gabriela J, Gabriela L y Leonardo B, por los buenos y malos momentos compartidos. Su compañía trajo alegría a mi vida. Gracias por ser una luz en la oscuridad, los llevaré siempre en mi corazón.

A nuestras pupilas Mica, Ani y Naty, por su apoyo incondicional, por desarrollar mi paciencia con sus travesuras. Que la vida nos vuelva a juntar.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

¡Gracias!

Paulina Liseth Topa Pila

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DERECHOS DE AUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vii
AGRADECIMIENTO	viii
RESUMEN EJECUTIVO	xv
ABSTRACT	1
CAPÍTULO I	2
MARCO TEÓRICO	2
1.1. Antecedentes investigativos	2
1.1.1. Generalidades	2
1.1.2. Resistencia a los antibióticos	4
1.1.3. Uso de antibióticos en la avicultura	6
1.1.4. <i>Salmonella</i> spp.	7
1.1.5. Rutas de transmisión de <i>Salmonella</i> en pollos	8
1.1.6. Bacteriófagos	9
1.1.6.1. Ciclo de vida de los bacteriófagos	11
1.1.6.2. Bacteriófagos como agentes de control biológico	12
1.1.6.3. Características abióticas requeridas para los bacteriófagos líticos con potencial aplicación en pollos de consumo humano	14
1.2. Objetivos	16
1.2.1. Objetivo general	16
1.2.2. Objetivos específicos	16

CAPÍTULO II	17
METODOLOGÍA	17
2.1. Materiales	17
2.2. Métodos	20
2.2.1. Selección de hospedadores de <i>S. enterica</i> de origen local para la realización de ensayos de bioprospección de bacteriófagos.	20
2.2.1.1. Extracción de ADN por choque térmico	20
2.2.1.2. Identificación de serovares de <i>Salmonella</i> por PCR	20
2.2.1.3. Análisis de Perfiles de resistencia de cepas de <i>S. enterica</i>	21
2.2.1.4. Genotipificación molecular por (GTG) ₅ -PCR	22
2.2.2. Aislamiento de bacteriófagos líticos de <i>S. enterica</i> a partir de fuentes acuáticas contaminadas	23
2.2.2.1. Recolección de muestras de agua para el aislamiento de bacteriófagos	24
2.2.2.2. Aislamiento de bacteriófagos líticos de <i>S. enterica</i>	25
2.2.2.3. Purificación de bacteriófagos líticos de <i>S. enterica</i>	26
2.2.2.4. Conservación de bacteriófagos líticos de <i>S. enterica</i>	26
2.2.3. Evaluación de la colección de bacteriófagos de acuerdo con sus perfiles líticos y estabilidad a bajas temperaturas.	27
2.2.3.1. Evaluación de perfiles líticos	28
2.2.3.2. Evaluación de estabilidad de bacteriófagos a baja temperatura	29
CAPÍTULO III	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1. Análisis y discusión de los resultados	31
3.1.1. Tipificación molecular de cepas de <i>Salmonella</i>	31
3.1.2. Perfiles de resistencia fenotípica de cepas de <i>S. enterica</i> y genotipificación molecular por (GTG) ₅ -PCR	32
3.1.3. Aislamiento de bacteriófagos líticos de <i>S. enterica</i> a partir de fuentes acuáticas contaminadas	36

3.1.4.	Perfiles líticos de los bacteriófagos _____	41
3.1.5.	Estabilidad de los bacteriófagos a baja temperatura y diferente pH ____	44
3.2.	Verificación de hipótesis _____	56
<i>CAPÍTULO IV</i> _____		57
<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i> _____		57
4.1.	Conclusiones _____	57
4.2.	Recomendaciones _____	58
<i>MATERIALES DE REFERENCIA</i> _____		59
Referencias Bibliográficas _____		59
Anexos _____		76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Propagación de ABR desde un enfoque One Health	5
Figura 2 Estructura típica de un bacteriófago	10
Figura 3 Ciclo lítico de los bacteriófagos	11
Figura 4 Protocolo para el aislamiento de bacteriófagos líticos de <i>S. enterica</i>	27
Figura 5 Diagrama del test de la gota	29
Figura 6 Análisis de la tipificación molecular de cepas de <i>Salmonella</i>	32
Figura 7 Cepa S9V23 en agar Mueller-Hinton con fenotipo BLEE positivo	34
Figura 8 Dendrograma obtenido por análisis filogenético de 38 cepas de <i>S. enterica</i> por genotipificación molecular (GTG) ₅ y metadatos complementarios de perfiles de resistencia a antibióticos	35
Figura 9 Controles positivos de la bacteria S2	39
Figura 10 Morfología en placa del fago F8M2	40
Figura 11 Dendrograma obtenido por perfiles líticos de bacteriófagos de <i>Salmonella</i> evaluados en 38 hospedadores y 5 Serovares.	42
Figura 12 Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento A	46
Figura 13 Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento B	48
Figura 14 Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento C	50
Figura 15 Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento D	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Equipos de laboratorio empleados _____	17
Tabla 2 Materiales de laboratorio empleados _____	18
Tabla 3 Reactivos de laboratorio empleados _____	19
Tabla 4 Antibióticos usados en perfiles de resistencia fenotípica _____	22
Tabla 5 Puntos de muestreo de agua _____	24
Tabla 6 Experimentos para evaluación de estabilidad de bacteriófagos _____	29
Tabla 7 Bacteriófagos de <i>S. enterica</i> obtenidos de Cotopaxi y Tungurahua _____	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Oligonucleótidos utilizados en PCR	76
Anexo 2 Electroforesis de los genes <i>bcfC</i> y <i>M.SinI</i> de las 38 cepas de <i>Salmonella</i> ..	77
Anexo 3 Electroforesis (GTG) ₅	77
Anexo 4 Tipificación molecular de cepas de <i>Salmonella</i>	78
Anexo 5 Efecto del experimento, tiempo, fago en el título fágico	79
Anexo 6 Efecto de la temperatura y pH sobre el fago F4M1B.....	80
Anexo 7 Efecto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento A	81
Anexo 8 Efecto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento B.....	81
Anexo 9 Efecto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento C.....	81
Anexo 10 Efecto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento D	82
Anexo 11 Efecto de la Temperatura y pH sobre el fago F6.....	82
Anexo 12 Efecto del tiempo en el fago F6 en el experimento A.....	83
Anexo 13 Efecto del tiempo en el fago F6 en el experimento B	83
Anexo 14 Efecto del tiempo en el fago F6 en el experimento C.....	84
Anexo 15 Efecto del tiempo en el fago F6 en el experimento D.....	84
Anexo 16 Efecto de la temperatura y pH sobre el fago F7M1	84
Anexo 17 Efecto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento A	85
Anexo 18 Efecto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento B	86
Anexo 19 Efecto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento C	86
Anexo 20 Efecto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento D.....	86
Anexo 21 Efecto del experimento, tiempo, fago en el título bacteriano.....	87
Anexo 22 Experimento A: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano	87
Anexo 23 Experimento B: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano	87
Anexo 24 Experimento C: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano	88
Anexo 25 Experimento D: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano	88

RESUMEN EJECUTIVO

El uso de bacteriófagos ha surgido como una alternativa prometedora para abordar la crisis de resistencia antimicrobiana, impulsada por el uso indiscriminado de antibióticos en la industria avícola. Este estudio aisló bacteriófagos líticos específicos de *S. enterica* multirresistente de origen avícola en la provincia de Tungurahua a partir de fuentes de agua contaminada, y los evaluó en base a sus perfiles líticos y estabilidad a baja temperatura.

Bajo la línea de investigación de Microbiología y Biotecnología, se llevó a cabo el aislamiento y purificación de bacteriófagos usando dos cepas de *S. enterica* serovar Infantis, por el método de agar de doble capa. Los perfiles líticos se evaluaron mediante la prueba de la gota. La estabilidad de los bacteriófagos se probó a través de la reducción del título fágico, a temperaturas de refrigeración y congelación, con pH 5.5 y 7.2.

Se aislaron un total de 27 bacteriófagos. La evaluación con 38 cepas de *Salmonella* de aves de corral y cinco serovares diferentes de *S. enterica* reveló siete bacteriófagos con un amplio rango de hospedadores. Las pruebas de estabilidad de los bacteriófagos F6, F7M1 y F4M1B, mostraron que la temperatura y el pH influyeron significativamente en la reducción del título fágico y la lisis bacteriana, resaltando la importancia de comprender las condiciones de estabilidad de los bacteriófagos para una aplicación exitosa. Los resultados destacan el uso potencial de estos bacteriófagos líticos en el diseño de productos de biocontrol para la industria avícola.

Palabras clave: Bioprospección, resistencia a antibióticos, bacteriófagos líticos, *Salmonella*, aves de corral.

ABSTRACT

The use of bacteriophages has emerged as a promising alternative to address the antimicrobial resistance crisis, driven by the indiscriminate use of antibiotics in the poultry industry. This study isolated lytic bacteriophages specific to multi-resistant *S. enterica* of poultry origin in Tungurahua province from contaminated water sources and evaluated them based on their lytic profiles and low-temperature stability.

Under the Microbiology and Biotechnology research line, the isolation and purification of bacteriophages was carried out using two strains of *S. enterica* serovar Infantis, by the double-layer agar method. Lytic profiles were evaluated by the gout test. The stability of the bacteriophages was tested through the reduction of the phage titre, at refrigeration and freezing temperatures, with pH 5.5 and 7.2.

We isolated a total of 27 bacteriophages. Evaluation against 38 *Salmonella* isolates from poultry and five different *S. enterica* serovars revealed seven bacteriophages with a broad host range. Stability tests of bacteriophages F6, F7M1, and F4M1B, showed that temperature and pH significantly influenced phage titer reduction and bacterial lysis, underscoring the importance of understanding bacteriophages stability conditions for successful application. The results highlight the potential use of these lytic bacteriophages in designing biocontrol products for the poultry industry.

Keywords: Bioprospecting, antibiotic resistance, lytic bacteriophages, *Salmonella*, poultry.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Generalidades

En América Latina, la demanda de carne ha presentado un aumento del 2.45 %, siendo la carne de ave la preferida, con un porcentaje del 4.1 % (FAO, 2022). El incremento en la producción mundial de carne se encuentra influenciado principalmente por el aumento en la demanda de carne de aves de corral, consecuencia de su creciente consumo a nivel mundial, debido a la preferencia de las personas por su bajo precio, especialmente en países de bajos y medianos ingresos, en comparación con otras carnes como res y cerdo (Wessels et al., 2021); siendo la carne de ave el 47 % de la proteína consumida desde fuentes cárnicas, estimando un crecimiento en su producción para el año 2031 del 16 % a nivel mundial (OECD/FAO, 2022). La producción de pollos de engorde constituye el 90 % de la producción avícola en todo el mundo (FAO, 2023). En el Ecuador, el sector avícola representa el 2.0 % del producto interno bruto nacional, convirtiéndolo en un sector de gran importancia económica para el país, con una producción anual de 230 y 250 millones de pollos de engorde (Arenas et al., 2021). Según la Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE), el consumo per cápita de carne de pollo al año es de 30.4 Kg, lo que la ha posicionado como uno de los productos más demandados en el país (CONAVE, 2023; Rodríguez et al., 2019).

Por ello, el pollo se destaca como el ave de corral más importante en todo el mundo, por su alto rendimiento para satisfacer la demanda de carne, así como por sus ventajas nutricionales (FAO, 2020). La carne de pollo se caracteriza por tener un alto contenido de proteína (18-25 %), mismo que no puede ser adquirido por las personas en cantidades suficientes a partir de fuentes de origen vegetal (Wessels et al., 2021), así como un contenido rico de ácidos grasos necesarios para un adecuado crecimiento y

desarrollo en humanos (**Baéza et al., 2022**). No obstante, estas aves albergan en su intestino una comunidad diversa de microorganismos que forman parte del microbiota del animal, misma que puede verse afectada por factores internos, como la genética y el sistema inmunitario, así como factores externos que incluyen el clima y la exposición a otros animales (**Marmion et al., 2021**). Esta carga bacteriana constituye la principal fuente de contaminación en los productos cárnicos, al no contar con prácticas higiénicas en los mataderos, específicamente en los procesos de desplumado y evisceración (**Klaharn et al., 2022**). Por lo que, las aves de corral representan una fuente importante de exposición a peligros microbiológicos en todo el mundo, al ser una fuente de microorganismos zoonóticos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* y *Salmonella* spp., principales causantes de intoxicación alimentaria a nivel mundial (**EFSA, 2021**).

Salmonella spp. se caracteriza por ser capaz de prosperar en el tracto intestinal de los animales, de forma particular en el pollo (**Kim et al., 2018; Koh et al., 2022**), provocando a su vez pérdidas considerables en los sectores de producción masiva (**Koutsoumanis et al., 2019**). Además, representa una de las bacterias más comunes involucradas en casos de infecciones e intoxicaciones alimentarias en humanos a nivel global (**Fegan et al., 2022; Pires et al., 2021**). En la actualidad, las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), representan un grave problema de salud pública (**PAHO & WHO, 2022**). Al año, 600 millones de personas se ven afectadas por consumir alimentos contaminados, siendo las infecciones más comunes aquellas de tipo zoonóticas, es decir, enfermedades transmitidas entre animales y humanos, causadas principalmente por *Salmonella* spp., arriesgando de esta manera la seguridad alimentaria, la inocuidad de los alimentos y la salud (**OMS, 2021**).

Entre los procesos preventivos y de control se destacan la vacunación y el uso de antibióticos (**Ruvalcaba-Gómez et al., 2022**). Sin embargo, el extensivo uso de antibióticos en el sector productivo ha dado paso a la aparición de cepas de *Salmonella* multirresistentes que pueden diseminarse a través de la cadena alimentaria, representando un peligro de salud pública y contribuyendo a la actual emergencia de la resistencia antimicrobiana (**Gargano et al., 2021**). Por lo que, el aumento

considerable de estos mecanismos multirresistentes hace que exista la necesidad de encontrar nuevas maneras de prevenir o tratar dichas infecciones ocasionadas por bacterias patógenas entéricas (Gut et al., 2018).

El uso de bacteriófagos líticos ha surgido como una nueva estrategia de biocontrol, al tratarse de virus bacterianos con alta especificidad en hospedadores, cuya capacidad lítica está siendo aplicado para eliminar patógenos en alimentos crudos y listos para consumir (Vikram et al., 2022). Son considerados agentes antimicrobianos naturales al encontrarse ampliamente distribuidos en el ambiente (Huang et al., 2018). A pesar de ello, el desarrollo de bioproductos basados en bacteriófagos, requiere candidatos con propiedades biológicas apropiadas, como estabilidad a condiciones abióticas, así como ausencia de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Kortright et al., 2019). Lo que sugiere la importancia del aislamiento y caracterización de nuevos bacteriófagos específicos para un huésped (Huang et al., 2018).

Por lo tanto, teniendo en cuenta los antecedentes, este proyecto de investigación se centra en aislar bacteriófagos líticos específicos para *S. enterica* multirresistente de origen avícola de la provincia de Tungurahua, y su evaluación de acuerdo con los perfiles líticos y estabilidad a bajas temperaturas. En base a esta colección, se realizarán posteriores evaluaciones genómicas e *in vivo*.

1.1.2. Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos (ABR, del inglés *Antibiotic resistance*) representa una amenaza creciente para la salud humana y animal en todo el mundo (Magnusson, 2021). El uso inadecuado de antibióticos en la medicina, veterinaria y agricultura es la principal causa del desarrollo de ABR (Samreen et al., 2021). Las restricciones para el uso de dosis subterapéuticas como promotores de crecimiento (AGP, del inglés *antibiotic growth promoters*) en pollos de engorde, ha favorecido la presencia de genes de resistencia en el entorno, beneficiando la aparición y propagación de cepas multirresistente (MDR, del inglés *multi-drug resistance*) entre humanos, animales y el medio ambiente, Figura 1 (Aslam et al., 2021; Fathima et al., 2022).

Figura 1

Propagación de ABR desde un enfoque One Health



Nota. Adaptado de Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook, por Aslam et al., 2021, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.

La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias poseen o desarrollan mecanismos para combatir la acción de los fármacos (Christaki et al., 2019). Existen tres tipos de resistencia: intrínseca, adquirida o adaptativa, siendo la segunda la de mayor preocupación, al tratarse de bacterias susceptibles que debido al uso inadecuado de antibióticos generan mecanismos de resistencia (Morrison & Zembower, 2020). Estos mecanismos se dan por mutaciones genéticas o bien por la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos (ARG, del inglés *antibiotic resistance genes*), mediante transferencia genética horizontal, que abarcan la transducción, conjugación y transformación (Berglund et al., 2023; Inda-Díaz et al., 2023). La resistencia que expresan las bacterias se basa en la destrucción o modificación de los antibióticos

(Christaki et al., 2019). De forma general existen 4 mecanismos de resistencia, mediados por la (i) disminución de la acumulación del fármaco debido a la reducida permeabilidad o aumento del flujo de salida de la célula, (ii) inactivación o modificación del fármaco, (iii) alteración de los sitios diana o de unión y (iv) alteración en las vías metabólicas (Morrison & Zembower, 2020).

La aparición de cepas MDR representan un reto para la medicina moderna al no contar con terapias efectivas para el tratamiento de infecciones bacterianas, aumentando la tasa de mortalidad (Huemer et al., 2020). En la actualidad, las infecciones por bacterias MDR causan 700 000 muertes al año y se prevé un aumento a 10 millones para el año 2050 a nivel mundial (IACG/OMS, 2019). Por lo que, es indispensable abordar ABR desde un punto de vista *One Health-One World* con el fin de garantizar la salud de las personas, animales y el medio ambiente (Aslam et al., 2021).

1.1.3. Uso de antibióticos en la avicultura

El uso de antibióticos en aves de corral ha crecido alarmantemente y se estima un aumento del 67 % para el año 2030 en países en desarrollo (Samreen et al., 2021). La avicultura es una de las industrias productoras de alimentos más importantes a nivel mundial, debido a su bajo costo de producción (FAO, 2023), sin embargo, el uso inadecuado y excesivo de antibióticos en esta área, es uno de los principales responsables de ABR (Roth et al., 2019), ya que, dentro de la avicultura, los antibióticos son empleados no solo con fines terapéuticos, sino también como AGP en las aves (Rivera-Gomis et al., 2021).

La exposición prolongada de antibióticos en pollos, sin un fin terapéutico, genera una presión selectiva sobre el microbiota de las aves, lo que favorece la aparición de bacterias MDR, estas cepas intestinales resistentes a los antibióticos pueden entrar en contacto con la carne durante el sacrificio, consiguiendo infectar a los consumidores, siendo uno de los principales patógenos *Salmonella* spp. (Rousham et al., 2018; Samreen et al., 2021). Además, debido al metabolismo incompleto, aproximadamente el 75 % de los antibióticos suministrados a los pollos, son excretados por las heces u

orina, entrando en contacto con el ambiente (suelo, animales y agua) (**de Souza et al., 2023; Torres et al., 2022**), contribuyendo a la propagación y mantenimiento de bacterias resistentes en el entorno (**Gil-Gil et al., 2019**).

En el año 2020 y 2021, aislados de *Salmonella* spp., recuperados de pollos de engorde mostraron un incremento en la resistencia a la ampicilina, las tetraciclinas, las sulfonamidas, las cefalosporinas y las quinolonas (**EFSA & ECDC, 2023**), siendo *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Kentucky* y *S. Infantis* los principales serovares de *Salmonella* hallados (**McMillan et al., 2020**). Es así como las prácticas inadecuadas de cría de pollos han convertido a estos animales en reservorios de bacterias patógenas multirresistentes que colonizan humanos (**Magnusson, 2021**).

1.1.4. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. son un grupo de bacilos gramnegativos móviles, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (**Kim et al., 2018**). Se componen de dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*, la primera conformado por seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, entre ellos, la subespecie *S. enterica* cuenta con alrededor de 1547 serovares, de los cuales, el 99 % son causantes de las infecciones en humanos y animales (**Ferrari et al., 2019**).

S. enterica se divide en dos grupos: específicos, aquellos adaptados al huésped y no específicos, no adaptados al huésped (**Rakov et al., 2020**). Así mismo, se clasifican en tifoidea y no tifoidea (NTS del inglés, *Non-Typhoidal Salmonella*) en base a su capacidad para desarrollar patologías en humanos (**Yan et al., 2022**). Los serovares tifoideos son una subcategoría de los especialistas, entre los que se encuentran *S. Typhi*, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, mientras que los NTS, están compuestos por *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Infantis*, causantes de ETA en todo el mundo (**Sasaki et al., 2021**).

S. enterica subespecie *enterica* es uno de los patógenos más importantes transmitidos por los alimentos, responsable de la mayoría de los brotes de salmonelosis en humanos

(ECDC & EFSA, 2018). La salmonelosis es causada por todos los serotipos no tifoideos aislados de humanos y animales, teniendo un estimado de 200 millones y mil millones de casos en todo el mundo (Chlebicz & Ślizewska, 2018). Su principal reservorio, y fuente de infección en personas, es la carne de ave y huevos (Bescucci et al., 2022), motivo por el cual resulta imprescindible mantener un control en la seguridad microbiana de las aves de corral y sus productos (Poojari et al., 2022).

1.1.5. Rutas de transmisión de *Salmonella* en pollos

La carne de pollo es la principal causante de intoxicación alimentaria por *S. enterica* en humanos a nivel mundial (McMillan et al., 2020). En comparación con otros animales, los casos de *Salmonella* en productos avícola se encuentran bien caracterizados, sin embargo, su prevalencia en pollos se da principalmente por la ausencia de buenas prácticas de higiene en la cadena de producción (Mpundu et al., 2019). La contaminación ocurre cuando los microorganismos ingresan en las aves por transmisión vertical u horizontal, a través del aire o durante el proceso de sacrificio y posteriormente, al área de preparación de alimentos (Bantawa et al., 2019).

Las camas de las aves representan una de las más importantes fuentes de contaminación que, al entrar en contacto con las heces, restos de comida y plumas, forman un ambiente propicio para albergar a un sin número de patógenos como *Salmonella* que, gracias al sistema de ventilación, son esparcidos al aire de las granjas avícola, favoreciendo su diseminación (Gomes et al., 2022). En cuanto a la transmisión horizontal, esta ocurre por la ruta fecal-oral, invadiendo el tracto intestinal de las aves, colonizando el hígado, el bazo y los ciegos del pollo, aumentando el riesgo de contaminación durante la evisceración (Hu et al., 2021). Una vez infectado, la proliferación de la bacteria se da gracias a las temperaturas de almacenamiento inadecuadas y la mala cocción (EFSA & ECDC, 2023).

El monitoreo microbiológico en carne cruda de pollo en las diferentes etapas de procesamiento influiría positivamente en la reducción de casos de infección alimentaria (Mpundu et al., 2019). En la actualidad existen varias estrategias para el

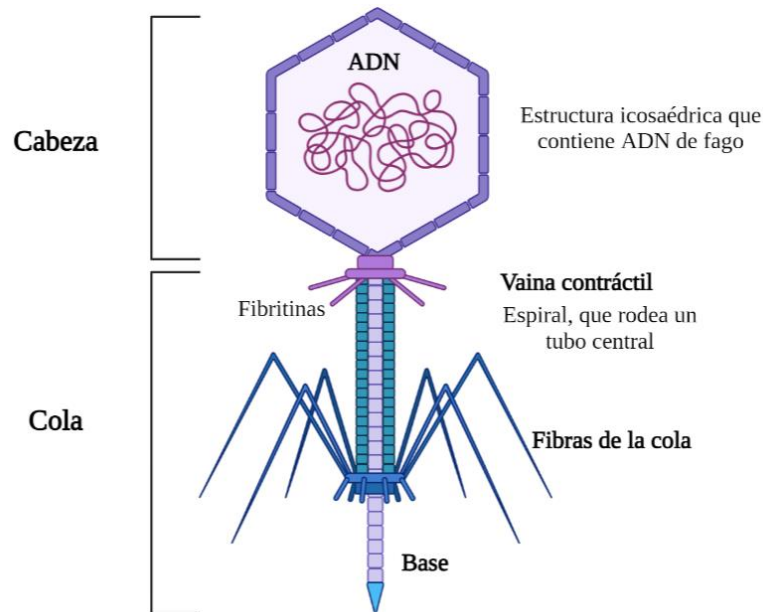
control de bacterias dentro de la cadena de procesamiento del pollo, tales como la inactivación microbiana, la irradiación, el tratamiento térmico, la alta presión hidrostática y la terapia con antibióticos; sin embargo, su eficiencia es baja, afectando negativamente las características organolépticas de los alimentos **(Poojari et al., 2022)**. Por consecuencia, es necesario desarrollar nuevas tecnologías para el control de bacterias patógenas en los alimentos, siendo una alternativa el uso de bacteriófagos **(Ramírez et al., 2018)**.

1.1.6. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus propios del medio ambiente, que infectan y se replican en células bacterianas **(Harada et al., 2018)**. Son los organismos más antiguos y ubicuos de la tierra, hallándose en ambientes muy diversos como heces, suelo, agua, entre otros **(Jamal et al., 2019)**. Su tamaño varía entre 20 a 200 nm, constan de un ácido nucleico (ADN o ARN) contenido por una envoltura tridimensional (cápside o cabeza), rodeada o no por una envoltura de lipoproteínas, una cola y una vaina de contacto en forma de hélice, que contiene las proteínas de unión con el receptor o huésped, **Figura 2 (Elois et al., 2023)**.

Figura 2

Estructura típica de un bacteriófago



Nota. El ADN del bacteriófago está protegido por la cápside (cabeza), unida a la vaina (cola) contráctil. Adaptado de *Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art*, por Harada et al., 2018, *Microbiological Research*.

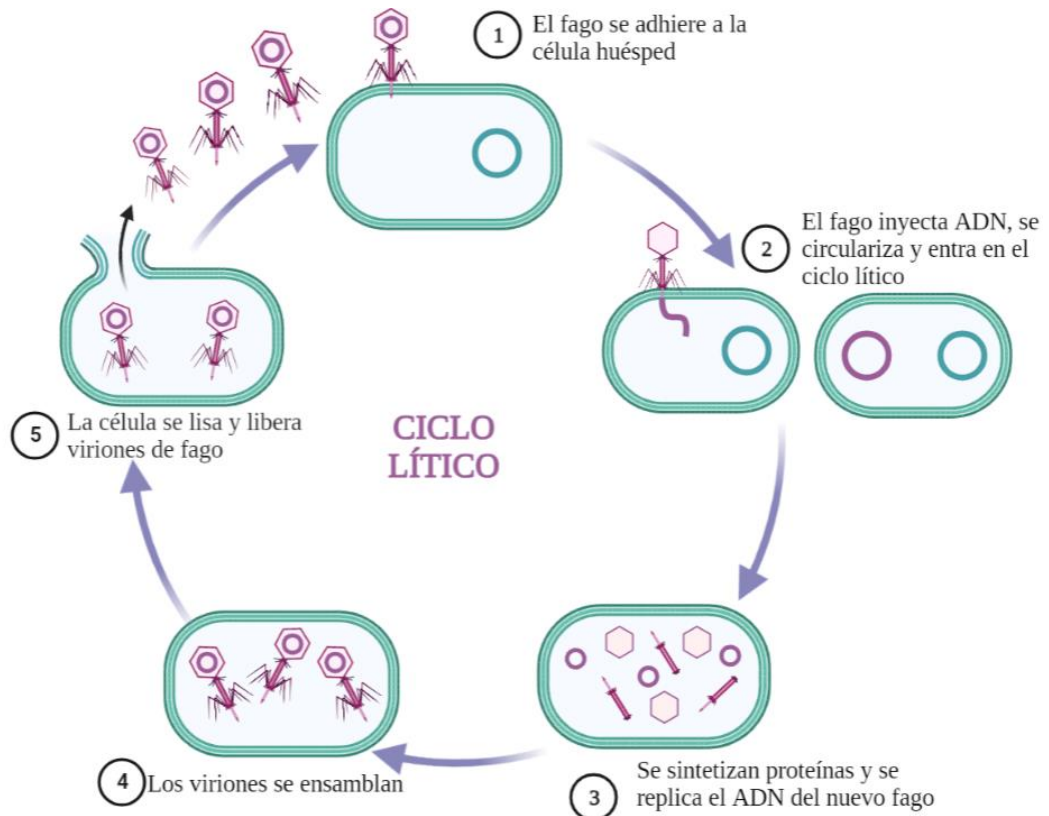
Comúnmente conocidos como parásitos obligados intracelulares, debido a que carecen de una estructura celular, así como de sistemas enzimáticos para la absorción de alimentos, síntesis de proteínas y construcción de nuevas partículas, por lo que necesariamente requieren de un huésped para su replicación, causando la muerte de la bacteria (**Mohammed Alomari et al., 2021**). Los fagos son muy específicos de la especie bacteriana o cepa a la que infectan, exhibiendo una fuerte actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas y gramnegativas (**Kasman & Porter, 2022**). Sin embargo, algunos fagos tienen una amplia gama de huéspedes, esta especificidad y rango de actividad depende de la presencia de receptores ubicados en la superficie de las células bacterianas, entre los que se encuentran fragmentos de lipopolisacáridos (LPS), fimbrias y otras proteínas de superficie (**Wernicki et al., 2017**).

1.1.6.1. Ciclo de vida de los bacteriófagos

Los fagos pueden clasificarse de acuerdo con su virulencia en dos tipos: líticos (virulentos, productivos) y lisogénicos (templados y latentes) (Kasman & Porter, 2022). El ciclo de vida lítico o virulento de los fagos consiste en matar velozmente a la célula huésped por medio de lisis (Mohammed Alomari et al., 2021). Durante este ciclo, los fagos, usan el metabolismo del huésped para generar nuevas progenies de fagos que se liberan en la lisis celular; proceso que incluye la adsorción, penetración (separación de ácidos nucleicos), biosíntesis (expresión y replicación de los ácidos nucleicos), ensamblaje, liberación y transmisión de viriones, con una duración de 20 a 40 minutos o de 1 a 2 horas, **Figura 3** (Jamal et al., 2019).

Figura 3

Ciclo lítico de los bacteriófagos



Nota. (1) Adsorción; (2) Penetración; (3) Biosíntesis; (4) Ensamblaje y (5) Liberación.

En la fase de adsorción el fago se adhiere a la célula bacteriana a través de receptores específicos en la superficie de la célula, como LPS en el caso de bacterias gramnegativas (**Mohammed Alomari et al., 2021**). La penetración consiste en la destrucción de la pared celular por enzimas del fago, permitiendo la incorporación del material genético en el citoplasma bacteriano, la biosíntesis implica la formación de estructuras de cápside para la replicación de ácidos nucleicos y proteínas, seguida de la transcripción del material genético del fago por inhibición de la replicación del ADN bacteriano y su ensamblaje (**Wernicki et al., 2017**).

La culminación del ciclo lítico es la lisis celular, proceso mediado por una proteína del fago llamado holina, que lisa la membrana citoplasmática bacteriana, y la formación de poros causada por la endolisina, proteína codificada por el ADN del fago de doble cadena y las hidrolasas de peptidoglicano, dichos poros permiten la entrada de agua y la posterior expansión de la célula, haciendo que estalle, liberando de esta forma a los viriones para seguir infectando a más células (**Principi et al., 2019**). En base a la capacidad de los fagos líticos de replicarse para destruir de forma rápida y específica a células bacterianas, ha surgido el interés del uso de fagos como una alternativa viable a los antibióticos actuales, con el fin de combatir bacterias patógenas multirresistentes (**Dunstan et al., 2023**).

1.1.6.2. Bacteriófagos como agentes de control biológico

< La utilidad de los fagos se ha probado especialmente en el contexto de la seguridad alimentaria en tres sectores claves: (i) producción primaria, que consiste en la aplicación en animales vivos a través de los alimentos o por aspersión antes del sacrificio, (ii) bioconservación, por aplicación directa en la superficie de los alimentos o en empaques de almacenamiento y (iii) biosanitización, para desinfección de superficies utilizadas en la producción y procesamiento (**Moye et al., 2018**), aprovechando su capacidad de “atacar” a microorganismos patógenos sin modificar las propiedades organolépticas o fisicoquímicas, ni de afectar la microbiota normal de los alimentos, frenando la diseminación de bacterias MDR en la cadena alimentaria (**Han et al., 2022**).

Estudios recientes han demostrado la capacidad de bacteriófagos líticos para lisar cepas MDR de *Salmonella* aislados de aves de corral (**Lopez-Garcia et al., 2023**). Cocteles de bacteriófagos se han diseñado para el control de *Salmonella*, consiguiendo reducir la colonización de esta bacteria en el ciego de pollos, así mismo, cocteles de fagos aplicados después del sacrificio consiguieron reducir *S. Enteritidis* en la piel de pollo en 1,0 log UFC/cm² al administrar los fagos a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 000 (**Nale et al., 2021**). Sin embargo, a pesar de que los estudios han destacado el uso de cócteles de fagos para reducir *Salmonella*, tanto antes como después del sacrificio en aves, existen pocos productos de fagos disponibles en el mercado para controlar la infección en los pollos (**Żbikowska et al., 2020**). Actualmente los bioproductos de fagos contra *Salmonella* en aves de corral, reconocidos como seguros, aprobados por la FDA y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) son dos, SalmoFresh™ y Salmonalex™ (**Toprak & Şanlıbaba, 2020**).

Aunque se ha informado que los cocteles compuestos por varios fagos promueven de mejor forma la lisis de *Salmonella* (**Żbikowska et al., 2020**), para que el tratamiento *in vivo* aplicado a pollos de engorde sea efectivo, debe contarse con una actividad óptima de amplio rango de huésped para conseguir eliminar de forma efectiva los diferentes serotipos de *Salmonella* (**Nale et al., 2021**). Así mismo, los bacteriófagos deben contar con algunas características importantes, como una eliminación bacteriana veloz, sin niveles significativos de supervivencia bacteriana (**Hyman, 2019**), fáciles de propagar, de producir títulos altos y de purificar, de igual forma, deben ser estables en diferentes concentraciones de tal manera que su almacenamiento por largos períodos a temperaturas de refrigeración no supongan una pérdida de infectividad, además, las preparaciones de fagos deben ser estériles y libres de toxinas; y finalmente, el fago no debe poder actuar como transductores generalizados o especializados (**Hatfull et al., 2022**).

Aun así, la eficiencia de la terapia de fagos representa un desafío por superar, ya que, si bien los niveles de bacterias disminuyen inicialmente, no siempre son eliminados por completo, por lo que es necesario combinar el tratamiento con antibióticos (**Moye et al., 2018**). Sin embargo, estudios recientes han revelado que, a pesar de la eventual

resistencia a los fagos, los fenotipos bacterianos resistentes se asociaron con una mayor sensibilidad a los antibióticos al administrar simultáneamente fagos y antibióticos (Schooley et al., 2017). Es decir, cepas resistentes a los fagos se volvieron a sensibilizar al complemento humano, antibióticos betalactámicos y a los fagos alternativos, lo que podría suponer una ventaja frente a la actual emergencia de la resistencia antimicrobiana (Gordillo Altamirano et al., 2021). Es así como los fagos pueden proporcionar una tecnología natural, no tóxica y económica para el control de *Salmonella* en pollos (Clavijo et al., 2019), teniendo varios enfoques de aplicación dentro de la cadena de suministro hasta la conservación (Moon et al., 2020).

1.1.6.3. Características abióticas requeridas para los bacteriófagos líticos con potencial aplicación en pollos de consumo humano

La terapia de fagos se ha aplicado con éxito para el control de microorganismos patógenos en carne cruda (Mohammed Alomari et al., 2021). Sin embargo, a pesar de que los fagos son capaces de permanecer de forma autónoma fuera del huésped en una variedad de entornos, existen varios factores que afectan su estabilidad (Almutairi et al., 2022). Factores fisicoquímicos como la temperatura, pH, fuerza iónica y efectos interfaciales pueden inactivar los fagos al dañar los elementos estructurales de los mismos (cabeza, cola, envoltura) (Malik et al., 2017), por lo que es fundamental estudiar las condiciones de estabilidad de los bacteriófagos para su aplicación exitosa como agentes de biocontrol de microorganismos patógenos en alimentos.

La temperatura cumple un rol fundamental en la supervivencia de los fagos, específicamente en la fase de unión, penetración y multiplicación, es así que, a temperaturas inferiores a las óptimas menos ADN ingresa a la célula huésped, por lo que menor cantidad de fagos se involucran en la fase de replicación; por otro lado, las temperaturas muy altas hacen que el período latente se prolongue, aumentando el tiempo desde la adsorción hasta la liberación de viriones (Kering et al., 2020; Lázaro et al., 2018). Aun así, bacteriófagos aplicados a las mismas condiciones que el tratamiento térmico en el procesamiento de carne de pollo han permanecido activos, logrando reducir la carga bacteriana en el alimento (Park et al., 2021). Sin embargo,

el almacenamiento a bajas temperaturas es fundamental para prolongar la vida útil del alimento, generalmente a temperaturas de refrigeración (0 a 7 °C) o congelación (-18 °C), siendo esta última la técnica más segura y viable, garantizando una vida útil de la carne de 7 a 18 meses (**Kaewthong et al., 2019**). Por lo que los bacteriófagos deberían mantener su actividad lítica a bajas temperaturas y largos períodos de tiempo para su aplicación en carne de pollo.

La acidez es otro factor de gran significancia al hablar de bacteriófagos; estudios han comprobado que son bastante estables a pH muy bajos (**Huang et al., 2018; Touret et al., 2018**). Con respecto al pH de la carne de pollos de engorde jóvenes y mayores, específicamente de la pechuga y muslos, éste varía entre 5.6-6.3 respectivamente (**Untea et al., 2023**), aunque se reportan varios estudios en los que a las 24 h *post-mortem* la carne del pollo, disminuye mínimamente su pH; sin embargo, son valores que se encuentran dentro del rango normal aceptable (**Mueller et al., 2023**). A partir de esto, muy probablemente los bacteriófagos líticos usados como biocontrol *in vivo* de diferentes serovares de *Salmonella* en carne de pollo, son estables a esos rangos de pH (**Aguilera et al., 2022; Almutairi et al., 2022; Wessels et al., 2021**). En contraste, las concentraciones de sal o sacarosa en un ambiente específico hacen que la presencia de bacteriófagos disminuya (**Whitman & Marshall, 1971**), aunque los iones presentes en soluciones salinas a concentraciones bajas posiblemente eviten su inactivación (**Jończyk et al., 2011**).

En general, los fagos son capaces de permanecer activos o de inactivarse frente a diferentes factores físicos y químicos como temperatura, pH, salinidad e iones. Y, su aplicación como agentes de biocontrol dentro de la industria alimentaria y avícola sigue siendo importante, concretamente en la aplicación *in vivo* de pollos de engorde como los principales conductores de bacterias patógenas en todo el mundo.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Desarrollar una bioprospección de bacteriófagos líticos de *S. enterica* utilizando aislamientos locales.

1.2.2. Objetivos específicos

- Seleccionar hospedadores de *S. enterica* de origen local para la realización de ensayos de bioprospección de bacteriófagos.
- Aislar bacteriófagos líticos de *S. enterica* a partir de fuentes acuáticas contaminadas.
- Evaluar la colección de bacteriófagos de acuerdo a sus perfiles líticos y estabilidad a bajas temperaturas.

Hipótesis

- **Hipótesis nula**

No es posible realizar una bioprospección de bacteriófagos líticos de *S. enterica* multirresistente de origen avícola aislados a partir de fuentes acuáticas contaminadas de la provincia de Cotopaxi y Tungurahua.

- **Hipótesis alternativa**

Es posible realizar una bioprospección de bacteriófagos líticos de *S. enterica* multirresistente de origen avícola aislados a partir de fuentes acuáticas contaminadas de la provincia de Cotopaxi y Tungurahua.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

En el presente proyecto de investigación, se utilizaron los materiales, equipos y reactivos presentados en las Tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1

Equipos de laboratorio empleados

EQUIPOS	CANTIDAD
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Estufa	1
Microondas	1
Mechero Bunsen	2
Fuente de poder	1
Nevera	1
Congelador	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad II	1
Microcentrífuga	1
Vortex	1

Tabla 2*Materiales de laboratorio empleados*

MATERIALES	CANTIDAD
Botellas de autoclave (100 – 500 mL)	5
Espátula	2
Asa de inoculación	2
Cajas mono Petri plásticas	1000
Pipetas x 10 mL	5
Gradilla	3
Frascos plásticos estériles	50
Juego de micropipetas	1
Puntas para micropipetas	1 de cada tipo
Fundas Ziploc	10
Tubos de ensayo con tapa	50
Pera de succión	1
Filtros Syringe Filters de 0.22 µm	50
Jeringuas	100
Eppendorfs de 1.5 mL	1000
Eppendorfs de 200 µL	150
Hisopos	100
Parafilm	1m
Guantes de nitrilo	4 cajas
Mascarillas	4 cajas

Tabla 3*Reactivos de laboratorio empleados*

REACTIVOS	CANTIDAD
Agar Mac Conkey	500 g
Agar Mueller-Hinton	300 g
Caldo TSB	300 g
Agua oxigenada	15 mL
Caldo Luria Bertani (LB)	100 mL
Agua Peptonada	250 g
Extracto de levadura	100 g
Cloruro Sódico (NaCl ₂)	25 g
Extracto de carne	200 g
Carbonato Sódico (Na ₂ CO ₃)	50 g
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	30 mL
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	150 mL
Agar-agar	500 g
Agua bidestilada	50 mL
Buffer fosfato salino (PBS) 1x	1000 mL
Glicerol	200 mL
Discos de antibióticos	17 tipos
Agua destilada	20 L
Etanol 70 %	3 L
Cloro	4 L
Agarosa	15 g
Agua destilada libre de nucleasas (ddH ₂ O)	50 mL
Loading Buffer	400 µL
DNA SYBR Safe	400 µL
TBE 1X	1 L
DreamTaq Green	200 µL
Primers	100 µL

2.2. Métodos

2.2.1. Selección de hospedadores de *S. enterica* de origen local para la realización de ensayos de bioprospección de bacteriófagos.

A partir del banco de microorganismos del grupo de investigación UTA RAM *One Health*, se seleccionaron aislamientos de *Salmonella* en base a sus fenotipos de resistencia a antibióticos y a su diversidad clonal, mediante un análisis de tipificación molecular de serovares y genotipificación por la técnica (GTG)₅-PCR y de sus perfiles de resistencia fenotípica.

2.2.1.1. Extracción de ADN por choque térmico

En primer lugar, se llevó a cabo la extracción de ADN de las 38 cepas de *Salmonella*, siguiendo el protocolo expuesto por (Sánchez-Salazar et al., 2020). Para lo cual, se generó biomasa de todas las cepas en caldo TSB. Al siguiente día se tomó 1 mL de la biomasa en un eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 200 µL de ddH₂O. Posteriormente se colocó los eppendorfs en el termobloque a 90°C por 10 minutos y al instante, se colocó en hielo (0 °C) por 10 minutos, procediendo a centrifugar nuevamente por 5 minutos a 5000 rpm. Finalmente, se descartó el pellet y se guardó el sobrenadante en eppendorf rotulado adecuadamente.

2.2.1.2. Identificación de serovares de *Salmonella* por PCR

Para la identificación de los serovares de *Salmonella*, se evaluaron dos genes de virulencia: *bcfC* y *M.SinI* (Anexo 1). Para ello, todos los materiales, a excepción de los reactivos, fueron esterilizados por luz UV dentro de la cabina de flujo; se realizó la mezcla de 12.5 µL de Dream Taq PCR Master Mix (2X), 0.25 µL del primer *bcfC* y *M.SinI* según corresponda, a una concentración de 10 µM y 10.75 µL de agua libre de nucleasas, seguidamente se agregó en cada eppendorf 1.25 µL del ADN de las cepas de *Salmonella*, para finalmente colocar 20 µL de aceite mineral en cada uno. Se

colocaron los eppendorfs con la mezcla lista en el termociclador a las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineamiento a 56 °C por 30 segundos, elongación a 72 °C por 1 minuto y la elongación final a 72 °C por 1 minuto y de ser el caso, su almacenamiento a 4 °C para su próximo uso.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. Para ello, al gel atemperado, se añadió el tinte de gel de DNA SYBR® Safe mezclando ligeramente y colocándolo en el molde junto con el peine. Una vez solidificado, se colocó en la cámara de electroforesis con TBE 1X. Se preparó una dilución del Ladder (100 pb) con 4 µL del Ladder, 2 µL de Loading Buffer y 4 µL de ddH₂O. Después se realizó la mezcla de 4 µL Loading Buffer junto con 8 µL del producto de PCR para cargar 12 µL de cada muestra en los pocillos. Finalmente se conectaron los electrodos y se corrió el gel a 90 V por 5 horas, para posteriormente visualizar el gel en el programa ENDURO.

2.2.1.3. Análisis de Perfiles de resistencia de cepas de *S. enterica*

El análisis de los perfiles de resistencia se basó en el método descrito por Kirby y Bauer, por difusión de discos en agar Mueller Hinton (**Hudzicki, 2009**). Para ello, los serovares se sembraron en agar MacConkey, al día siguiente se generó biomasa en tubos con 5 mL de medio TSB (Tryptic Soy Broth), inoculando cada tubo con una colonia de las cepas a analizar, incubando a 37 °C por 2 horas o hasta alcanzar una escala de 0.5 McFarland.

En placas de agar Mueller-Hinton se realizó una siembra masiva o en césped de la biomasa utilizando un hisopo estéril, e inmediatamente se colocaron los discos de antibióticos (**Tabla 4**) con ayuda de una pinza, incubando las placas a 37 °C toda la noche. Al día siguiente se midieron los halos de inhibición para clasificarlas como sensibles (S), intermedias (I), o resistentes (R), de acuerdo con lo expuesto por el CLSI, determinando adicionalmente aquellas cepas BLEE positivas o productoras de β-lactamasas de espectro extendido.

Tabla 4*Antibióticos usados en perfiles de resistencia fenotípica*

Familia de antibióticos	Antibióticos	Abreviatura
Penicilinas	Ampicilina	AM 10
	Amoxicilina/ácido clavulánico	AMC 30
	Piperacilina/Tazobactam	TPZ 110
Cefalosporinas	Cefotaxima	CTX 30
	Cefepime	FEP 30
	Ceftazidima	CAZ 30
	Cefuroxima	CXM
	Ceftriaxona	CRO 30
	Aztreonam	ATM 30
Carbapenems	Meropenem	MEM 10
	Ertapenem	ETP 10
Aminoglicósidos	Gentamicina	CN 10
	Amikacina	AK 30
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	F 300
Fosfonatos	Fosfomicina	FF 200
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP 5
Sulfonamidas y diaminopiridinas	Trimetoprima/Sulfametoxazol	SXT 25

2.2.1.4. Genotipificación molecular por (GTG)₅-PCR

(GTG)₅-PCR es un tipo de PCR palindrómica extragénica repetitiva que se basa en la amplificación del elemento repetitivo (GTG)₅ presente en todos los genomas bacterianos (**Babazadeh & Ranjbar, 2021**). Para realizar esta técnica, se usó 12.5 µL de Dream Taq PCR Master Mix (2X), 0.25 µL del primer (GTG)₅ a una concentración de 25 µM y 11 µL de agua libre de nucleasas, la mezcla se agregó a cada uno de los eppendorfs de PCR rotulados, se añadió 1.25 µL del ADN de las cepas de *Salmonella*

y 20 µL de aceite mineral como protector. Se colocaron los eppendorfs con la mezcla lista en el termociclador a las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 45 °C por 1 minuto, elongación a 65 °C por 8 minutos y la elongación final a 65 °C por 16 minutos y de ser el caso, su almacenamiento a 4 °C para su próximo uso.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para (GTG)₅ al 2 %, una vez temperado el gel, se añadió el tinte de gel de DNA SYBR® Safe mezclando ligeramente y colocándolo en el molde junto con el peine. Una vez solidificado, se colocó en la cámara de electroforesis que contiene TBE 1X. Se preparó la dilución del Ladder (1 kb) con 4 µL del Ladder, 2 µL de Loading Buffer y 4 µL de ddH₂O. Después se realizó la mezcla de 4 µL Loading Buffer junto con 2 µL de ddH₂O y 6 µL del producto de PCR para cargar 12 µL de cada muestra en los pocillos. Finalmente se conectaron los electrodos, se corrió el gel a 90 V por 5 horas, para posteriormente visualizar el gel en el programa ENDURO.

Los resultados fueron analizados mediante el uso del programa GelJ, donde la similitud entre las distintas cepas se procesó usando el índice Dice, por el Método de Pares no Ponderados y algoritmo UPGMA (de promedios aritméticos), finalmente el archivo Newick obtenido se editó en el programa iTOL.

2.2.2. Aislamiento de bacteriófagos líticos de *S. enterica* a partir de fuentes acuáticas contaminadas

Con la finalidad de aislar bacteriófagos, se procedió con la recolección de muestras de agua de fuentes contaminadas, procedentes de las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, posterior a lo cual, se llevó a cabo procesos de purificación y conservación de los fagos.

2.2.2.1. Recolección de muestras de agua para el aislamiento de bacteriófagos

La toma de muestras de agua para el aislamiento de bacteriófagos líticos se realizó en 8 puntos estratégicos dispuestos por las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, como se muestra en la **Tabla 5**. El volumen de muestra fue de aproximadamente 100 mL y se recogió en frascos de plástico estériles, mismos que se etiquetaron con los datos correspondientes. La muestra se mantuvo a una temperatura de 2-4 °C y se llevó al laboratorio en un lapso no mayor a 24 horas para el procesamiento de ésta.

Tabla 5

Puntos de muestreo de agua

Nº	Código	Coordenadas	Localidad	Cantón/Provincia
1	P1SF	0°55'57"S 78°37'35"O Latitud: -0.932372 Longitud: -78.626392	San Felipe: Río Pumacunchi	Latacunga/Cotopaxi
2	P2HGL	0°56'15"S 78°37'5"O Latitud: -0.937438 Longitud: -78.617975	Hospital General Latacunga: Río Cutuchi	Latacunga/Cotopaxi
3	P3PJ	0°57'34.9"S 78°41'58.2"O Latitud: -0.9597 Longitud: -78.6995	Chimbacalle: Río Pujilí	Pujilí/Cotopaxi
4	P4CC	0°56'4.87"S 78°37'8.69"O Latitud: -0.934687 Longitud: -78.619081	Casa de la Cultura: Río Yanayacu	Latacunga/Cotopaxi
5	P5CS	1°2'44.085"S 78°35'49.47"O Latitud: -1.45579 Longitud: -78.597077	Camal Salcedo: Río Cutuchi	Salcedo/Cotopaxi
6	P6HRA	1°13'44.3"S 78°37'02.9"O Latitud: -1.228312	Hospital Regional	Ambato/Tungurahua

N°	Código	Coordenadas	Localidad	Cantón/Provincia
		Longitud: -78.617587	Ambato: Río Ambato	
7	P7FGT	1°19'26.3"S 78°35'47.4"O Latitud: -1.323974 Longitud: -78.596512	GELCO: Río Pachanlica	Ambato/Tungurahua
8	P8RPT	1°18'40.68"S 78°35'33.298"O Latitud: -1.311300 Longitud: -78.592583	Río Pachanlica	Ambato/Tungurahua

2.2.2.2. Aislamiento de bacteriófagos líticos de *S. enterica*

La metodología para el aislamiento, purificación y conservación de bacteriófagos se basó en una modificación de la norma ISO 10705-2:2000 (ISO, 2002), **Figura 4**. En primera instancia, los serovares de *S. enterica* se cultivaron en agar MacConkey para la generación de biomasa con 10 mL de caldo MSB, inoculando cada tubo con una colonia de *Salmonella* e incubando a 37 °C por 2 horas o hasta alcanzar una escala de 0.5 McFarland. Se realizó un pre-enriquecimiento de las muestras, para lo cual, en tubos Falcon de 50 mL estériles, se colocaron 44.5 mL de la muestra de agua, junto con 5 mL de agua peptonada a una concentración 10X y 0.5 mL de la biomasa del huésped, incubándolo a 37 °C toda la noche.

Posteriormente se preparó agar MSA y se vertió en placas, así mismo agar semisólido MSA's, suplementado con CaCl₂ (50 g/L). Se dispensó 2.5 mL del semisólido en tubos de ensayo con tapa y se dejó reposar en un baño de agua a 55°C con el fin de evitar la solidificación del medio. El pre-enriquecimiento se tomó con una jeringa y se filtró por una membrana de filtración PES de 0.22 µm; 1 mL del filtrado junto con 1 mL de biomasa del huésped se colocaron en un tubo de ensayo con 2.5 mL de MSAs, se agitó suavemente y se vertió sobre una placa de agar MSA, pasando a incubar a 37 °C toda la noche.

2.2.2.3. Purificación de bacteriófagos líticos de *S. enterica*

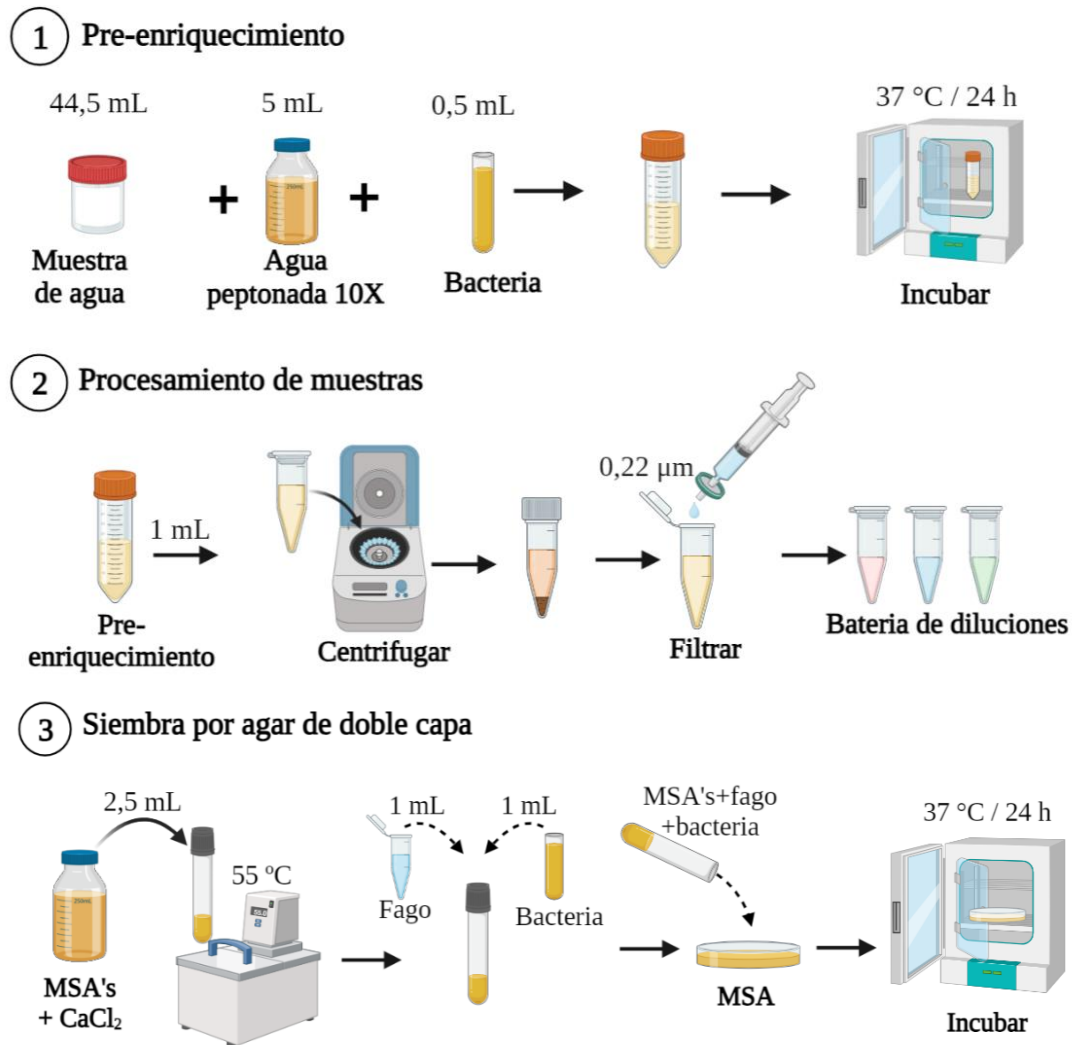
Las calvas de lisis se clasificaron según su morfología. Con un asa estéril se tomaron las calvas similares y se colocaron en un tubo eppendorf con 1 mL de MSB, se centrifugó a 3000 rpm por 4 min y con ayuda de una jeringa se recuperó el sobrenadante para filtrarlo por una membrana de filtración PES de 0.22 μm , repitiendo la siembra en placa con 1 mL del filtrado, hasta obtener bacteriófagos purificados.

2.2.2.4. Conservación de bacteriófagos líticos de *S. enterica*

Se colocó 1 mL del sobrenadante filtrado en un tubo de biomasa de la bacteria huésped, incubándola a 37 °C por 24 a 48 horas, posteriormente, se filtró el contenido por una membrana de filtración PES de 0.22 μm , para criopreservarla con 30 % de glicerol a -80 °C.

Figura 4

Protocolo para el aislamiento de bacteriófagos líticos de S. enterica



2.2.3. Evaluación de la colección de bacteriófagos de acuerdo con sus perfiles líticos y estabilidad a bajas temperaturas.

Con este fin, se realizaron ensayos de evaluación de los perfiles líticos de los fagos aislados utilizando diferentes huéspedes, de los cuales, se procedió a determinar su estabilidad a diferentes condiciones de temperatura y de pH.

2.2.3.1. Evaluación de perfiles líticos

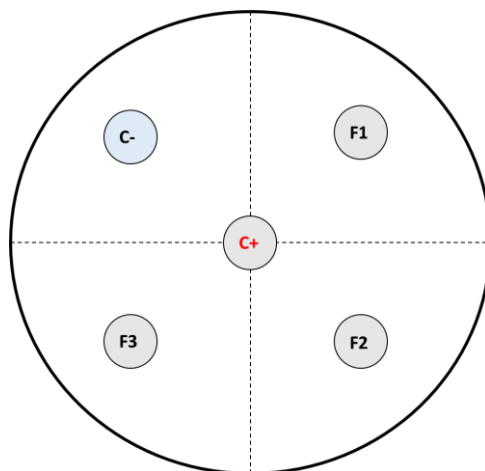
Se recuperaron las bacterias huésped pertenecientes a otros serovares de *S. enterica* (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Kentucky* y *S. Infantis*) y otros aislamientos de *S. enterica* pertenecientes al banco de microorganismos del grupo de investigación UTA RAM *One Health*, en agar XLD, por estría escocesa, incubándolos a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, se generó biomasa en 10 ml de caldo MSB a 37 °C hasta llegar a escala 0.5 MacFarland. Posteriormente, se activaron los bacteriófagos, para ello, se colocó 500 µL del fago en 10 mL de biomasa del huésped, incubándolos a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, se filtraron los fagos usando una membrana de filtración PES de 0.22 µm, con el fin de retener las bacterias.

La evaluación de los perfiles líticos se realizó mediante la prueba de la gota descrito por **Seo et al. (2018)**, para ello, en tubos con 2.5 mL de MSA's suplementado con CaCl₂ se añadió 1 mL de biomasa de la bacteria huésped, agitando el tubo suavemente y se vertió en una placa con agar MSA. Una vez solidificado se dividió la placa en cuadrantes, en uno de los cuadrantes se añadió 5 µL de agua destilada estéril como control negativo y en el resto de los cuadrantes el mismo volumen de cada fago. Se dejó secar por 30 min y se incubó a 37 °C toda la noche.

Los datos se analizaron en base al número de cepas susceptibles que dieron positivo para la infección del fago del número total de cepas analizadas, y se procesaron en un mapa de calor haciendo uso del programa MultiExperiment Viewer (MeV) versión 4.9.0.

Figura 5

Diagrama de la prueba de la gota



Nota. C+, representa el control positivo (antibiótico); C-, representa el control negativo (agua bidestilada); F1, F2 y F3, representan los fagos a evaluar.

2.2.3.2. Evaluación de estabilidad de bacteriófagos a baja temperatura

La estabilidad de los bacteriófagos se evaluó a una temperatura de refrigeración (4 °C) y de congelación (-18 °C), según lo establecido por el RTE INEN 056:2011 para carne y productos cárnicos, y a un pH de 5.5 y 7.2 (INEN, 2011; Soler Sanchis et al., 2011). Teniendo un total de 4 tratamientos (A, B, C, D) para cada fago, mismos que se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6

Experimentos para evaluación de estabilidad de bacteriófagos

Experimento	Temperatura (°C)	pH
A	4	5.5
B	4	7.2
C	-18	5.5
D	-18	7.2

En primer lugar, se determinó la concentración inicial de los fagos en UFP/mL (Ecuación 1), por el método de doble capa, y la concentración de la bacteria huésped en UFC/mL (Ecuación 2) por el método de Miles y Misra. Para el método de Miles y Misra se realizaron diluciones seriadas de la bacteria y en una placa de agar nutritivo dividida en secciones, se colocaron 20 µL de cada dilución, incubando la placa a 37 °C toda la noche, para al día siguiente cuantificar la bacteria por recuento en placa (**Miles et al., 1938**).

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{\text{número de UFP} * \text{Factor de dilución}}{\text{volumen de la alícuota (mL)}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{número de UFC} * \text{Factor de dilución}}{\text{volumen de la alícuota (mL)}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

La concentración de la bacteria y de los fagos se ajustó a 1×10^6 UFC/mL o UFP/mL respectivamente, con el fin de obtener un MOI de 1. La bacteria huésped junto con el fago se mezclaron en un tubo Falcon de 50 ml y se diluyeron con caldo MSB a pH 5.5 o 7.2 para alcanzar la concentración deseada, incubándolos a 4 °C y -18 °C, según el tratamiento. Se tomaron muestras de 5 mL de cada tratamiento a las 0, 24, 48, 72, 144, 216 y 312 horas, para evaluar la viabilidad de los bacteriófagos por siembra en agar de doble capa y de la bacteria por el método de Miles y Misra.

Análisis de datos

Todos los experimentos se repitieron tres veces. Los recuentos viables se expresaron como media y desviación estándar. Las estadísticas analíticas del efecto de la temperatura y el pH en función del tiempo se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de medias de Tukey, con un nivel de confianza del 95 % usando el software InfoStat versión 2020I. En todos los casos analizados, se consideró a un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

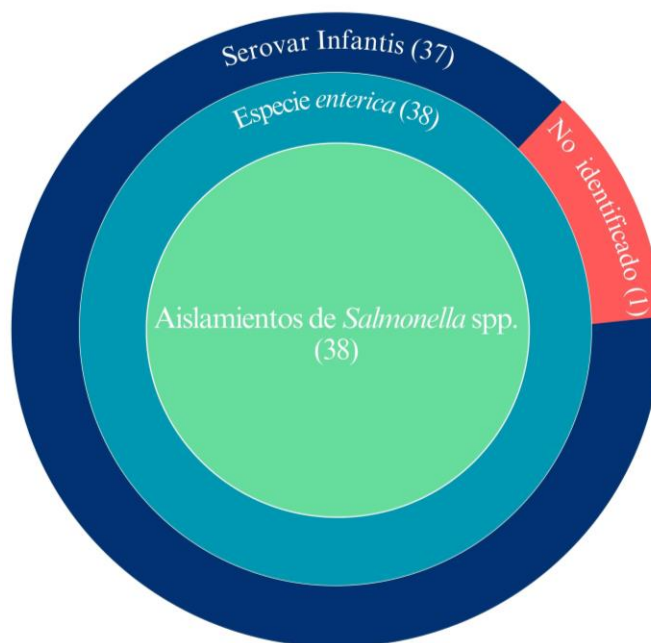
En el presente estudio se trabajó con dos colecciones de *Salmonella* obtenidas de los proyectos de vinculación “Caracterización de microorganismos patógenos en alimentos comercializados en mercados populares de la ciudad de Ambato. Fase 1: *Salmonella* en carcasas de pollos” y “Caracterización de microorganismos patógenos en alimentos comercializados en mercados populares de la ciudad de Ambato. Fase 2: *Salmonella* spp. en carcasas y menudencias de pollo”, el primero compuesto por 26 cepas (S1-S28) aisladas en el año 2022 y el segundo formado por 12 cepas (S1V23-S13V23) aisladas en el año 2023, además de 5 serovares de *S. enterica* (*S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum* y *S. Kentucky*), provenientes del banco de microorganismos del grupo de investigación UTA RAM *One Health*.

3.1.1. Tipificación molecular de cepas de *Salmonella*

Para la identificación de la especie *S. enterica* se evaluó el gen de virulencia relacionado con el grupo de fimbrias (*bcfC*), que representa regiones altamente conservadas dentro de la especie *S. enterica* (Joaquim et al., 2021); encontrando que el gen *bcfC* fimbrial estuvo presente en el 100 % de las cepas evaluadas (38/38), de modo que todas corresponden a cepas de *S. enterica*. El gen *M.SinI* se empleó para la identificación de serovares, mismo que corresponde a una modificación del gen de la metilasa, específica del serovar *S. Infantis* (Ranjbar et al., 2017); hallando que el 97.37 % de las cepas (37/38) son *Infantis*, a excepción de la S8V23 (Figura 6, Anexo 4). Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Salazar et al. (2019) y Mejia et al. (2021), en el que se detectó una incidencia de este serotipo en aislamientos de *Salmonella* de origen avícola del Ecuador, siendo el serovar *Infantis* el de mayor importancia en el país.

Figura 6

Análisis de la tipificación molecular de cepas de Salmonella



Nota. **Color verde:** total de 38 aislamientos de *Salmonella* spp.; **Color celeste:** Total de 38 cepas pertenecientes a especie *enterica*; **Color azul:** total de 37 cepas pertenecientes a serovar *Infantis*; **color rojo:** total de 1 cepa (S8V23) con serovar no identificado.

3.1.2. Perfiles de resistencia fenotípica de cepas de *S. enterica* y genotipificación molecular por (GTG)₅-PCR

Se evaluó la resistencia fenotípica de las dos colecciones de *Salmonella* frente a 17 antibióticos, descritos en la **Tabla 4**, la mayoría de importancia crítica para la medicina humana según la OMS (**WHO, 2019**). Hallando que todas las cepas fueron resistentes al menos a 1 de los antibióticos ensayados. El 73.68 % de las cepas (28/38) presentaron multirresistencia (MDR), es decir, que fueron resistentes a 3 o más familias de antibióticos. Este resultado indica un aumento en la proporción de MDR en aislamientos de *S. enterica* obtenidos en el centro de Ecuador, en comparación a los resultados detectados en 2017 en donde se detectó que el 58 % de los aislamientos de origen avícola presentaban el mencionado fenotipo (**Salazar et al., 2019; Sánchez-Salazar et al., 2020**). Adicionalmente, estos datos se relacionan con un estudio

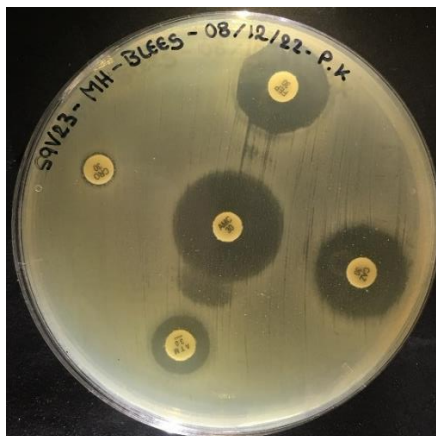
realizado en 2021 en el que cepas de *S. enterica*, aislados de carne fresca de pollo en Quito, mostraron altos niveles de resistencia a múltiples fármacos (Mejia et al., 2021). Según Rousham et al. (2018), la existencia de cepas de *Salmonella* MDR en la carne de pollo se debe a que, en países de bajos y medianos ingresos, las aves se sacrifican, procesan y venden sin regulación, y al no contar con buenas prácticas de higiene, las bacterias MDR presentes en el intestino de las aves tienen contacto con la carne durante el sacrificio y evisceración, consiguiendo contaminar el alimento.

Además, se destaca que el 94.73 % de las cepas (36/38) mostraron resistencia a la nitrofurantoina (F 300), un dato preocupante teniendo en cuenta que en el año 2016 en Ecuador se prohibió el uso de nitrofurantoina en animales productores de alimento (AGROCALIDAD, 2016), lo que supondría su uso no regulado dentro de la industria avícola o bien que las cepas aisladas conservan la resistencia al tratarse de un antibiótico antiguo (Gardiner et al., 2019).

Se identificaron las bacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), mediante la prueba de sinergia de doble disco usando amoxicilina / ácido clavulánico (AMC), cefalosporinas de tercera generación, ceftriaxona (CRO), cefepime (FEP), ceftazidima (CAZ) y el monobactámico aztreonam (ATM), tomando como positivos aquellas bacterias que exhibieron una distorsión en los halos de inhibición (Figura 7). Obteniendo que tan solo el 31.57 % de las cepas (12/38) fueron BLEE positivo, de las cuales 7 pertenecían a la primera colección y 5 a la segunda, siendo todas bacterias MDR. Un estudio llevado a cabo en las Galápagos en el año 2021 reportan cepas de *S. Infantis* aisladas de gallineros en la isla Santa Cruz, mismas que presentaron un fenotipo MDR y BLEE, lo que concuerda con los datos obtenidos en este apartado (Burnett et al., 2021); asimismo, investigaciones realizadas en el centro de Ecuador en el año 2020 evaluaron la resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella* de granjas avícolas, obteniendo que las cepas identificadas como *Infantis* tuvieron un fenotipo MDR en un total del 94.4 % de las mismas, de las cuales 15 de ellas presentaron el fenotipo BLEE (Sánchez-Salazar et al., 2020).

Figura 7

Cepa S9V23 en agar Mueller-Hinton con fenotipo BLEE positivo



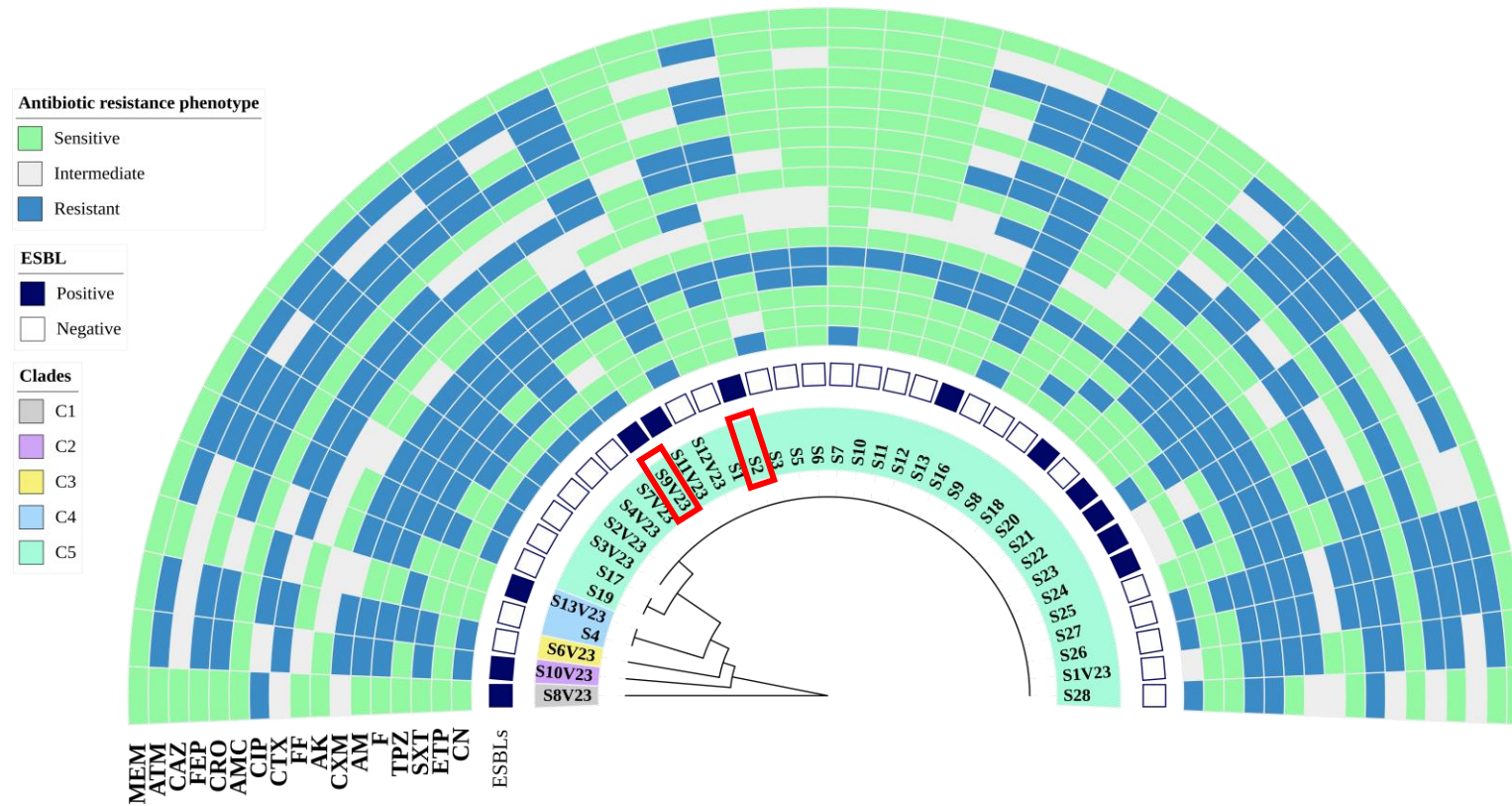
Nota. Se observa una distorsión en el halo de inhibición de los antibióticos ATM y FEP con el disco central AMC.

Los perfiles de resistencia fenotípicos de las cepas se evaluaron en conjunto con el análisis filogenético mediante la amplificación del gen (GTG)₅, presentados en la **Figura 8**, la imagen muestra un dendograma generado con el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA, en el que se presenta la similitud genética entre los aislados de *S. enterica* de origen avícola. (GTG)₅-PCR permitió estudiar las 38 cepas y junto con la electroforesis se obtuvo los perfiles de huellas genéticas de cada cepa (**Anexo 2**), consiguiendo agrupar los aislamientos en 5 clados, mostrando muy poca variedad genética (**Kaboré et al., 2022**).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto, se escogieron dos cepas (S2 y S9V23), una de cada colección de *Salmonella* respectivamente, para el aislamiento de bacteriófagos líticos, ya que ambas presentaron multirresistencia y producción de BLEE, además forman parte del clado (C5), que exhibe la mayor variabilidad genética con respecto a las otras cepas.

Figura 8

Dendrograma obtenido por análisis filogenético de 38 cepas de S. enterica por genotipificación molecular (GTG)₅ y metadatos complementarios de perfiles de resistencia a antibióticos



Nota. (-1) Sensible, color verde; (0) Intermedio, color gris; (1) Resistente, color celeste; (Azul) ESBLs positivo; (Blanco) ESBLs negativo. Los recuadros de color rojo representan las cepas seleccionadas

3.1.3. Aislamiento de bacteriófagos líticos de *S. enterica* a partir de fuentes acuáticas contaminadas

Se recolectaron un total de 8 muestras compuestas de agua de ríos contaminados provenientes de las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, descritos en la **Tabla 5**, en el mes de mayo del 2023, empleando como hospedadores las cepas S2 y S9V23. La purificación de placa única se llevó a cabo al menos 5 veces para obtener *stocks* de fagos puros, aislando un total de 27 bacteriófagos para *S. enterica*. Las placas de los bacteriófagos se clasificaron de acuerdo con su morfología como circulares o irregulares, en base a la turbidez como claras o semi claras y por el diámetro como pequeñas (< 1 mm), medianas (1 a 2 mm) y grandes (> 2mm), resultados que se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7

Bacteriófagos de Salmonella enterica obtenidos de Cotopaxi y Tungurahua

Bacteriófago	Punto muestreo	Hospedador	Características
F1M1	P1SF	S9V23	Circulares, claras, pequeñas
F2M1	P2HGL	S9V23	Circulares, semi claras, pequeñas
F3M1	P3PJ	S9V23	Irregulares, semi claras, pequeñas
F3M2	P3PJ	S9V24	Circulares, claras, pequeñas
F4M1A	P4CC	S9V23	Circulares, claras, pequeñas, presencia de un halo
F4M1B	P4CC	S9V23	Circulares, claras, pequeñas
F4M2	P4CC	S9V23	Circulares, claras, pequeñas

Bacteriófago	Punto muestreo	Hospedador	Características
F5M1A	P4CC	S2	Irregulares, claras, medianas
F5M1B	P4CC	S2	Circulares, claras, medianas
F5M2	P4CC	S2	Circulares, claras, medianas
F6	P5CS	S9V23	Irregulares, claras, grandes
F7M1	P5CS	S9V23	Irregulares, claras, medianas
F7M2	P5CS	S9V23	Irregulares, semi claras, grandes
F8M1	P5CS	S9V23	Circulares, semi claras, medianas
F8M2	P5CS	S9V23	Irregulares, claras, grandes, presencia de halo
F9	P5CS	S9V23	Circulares, semi claras, pequeñas
F10M1	P6HRA	S9V23	Circulares, semi claras, medianas
F10M2	P6HRA	S9V23	Irregulares, claras, medianas
F11	P6HRA	S9V23	Circulares, semi claras, medianas
F12	P6HRA	S9V23	Circulares, claras, pequeñas
F13	P7FGT	S9V23	Circulares, semi claras, medianas
F14	P7FGT	S9V23	Circulares, claras, pequeñas
F15	P7FGT	S9V23	Circulares, claras, pequeñas
F16M1	P8RPT	S9V23	Circulares, semi claras, medianas

Bacteriófago	Punto muestreo	Hospedador	Características
F16M2	P8RPT	S9V23	Irregulares, semi claras, grandes
F17	P8RPT	S9V23	Calvas claras de, circulares, medianas
F18	P8RPT	S9V23	Calvas claras, circulares, pequeñas

El 88.89 % de los bacteriófagos (24/27) fueron aislados con la cepa S9V23, consiguiendo aislar al menos un bacteriófago por cada punto de muestreo, mientras que, tan solo el 11.11 % de los bacteriófagos (3/27) se aislaron con la cepa S2, todos provenientes del punto 4, correspondiente al Río Yanayacu (sector Casa de la Cultura de Latacunga, provincia de Cotopaxi). En el río Yanayacu se descargan los residuos de los sistemas de alcantarillado y sector industrial de la ciudad de Latacunga, que a su vez desemboca en el río Cutuchi, ya conocido por su grave problema de contaminación (MAE, 2023). Varias investigaciones informan la presencia de fagos líticos en muestras de aguas residuales, siendo estas las fuentes más ricas para el aislamiento de bacteriófagos (Khalatbari-Limaki et al., 2020). Sin embargo, no se obtuvieron bacteriófagos de los puntos 1, 2 y 3 para S2, ya que, la interacción fago-huésped depende de la especificidad de adsorción, que a su vez viene acompañada por la naturaleza y la particularidad estructural de los receptores de la célula bacteriana (Wardani et al., 2023). Por lo que, se presume que los bacteriófagos presentes en estos puntos no pudieron infectar de forma eficaz a la bacteria, debido a que los receptores se encontraban inaccesibles o bien no eran complementarios a la proteína de unión al receptor del fago.

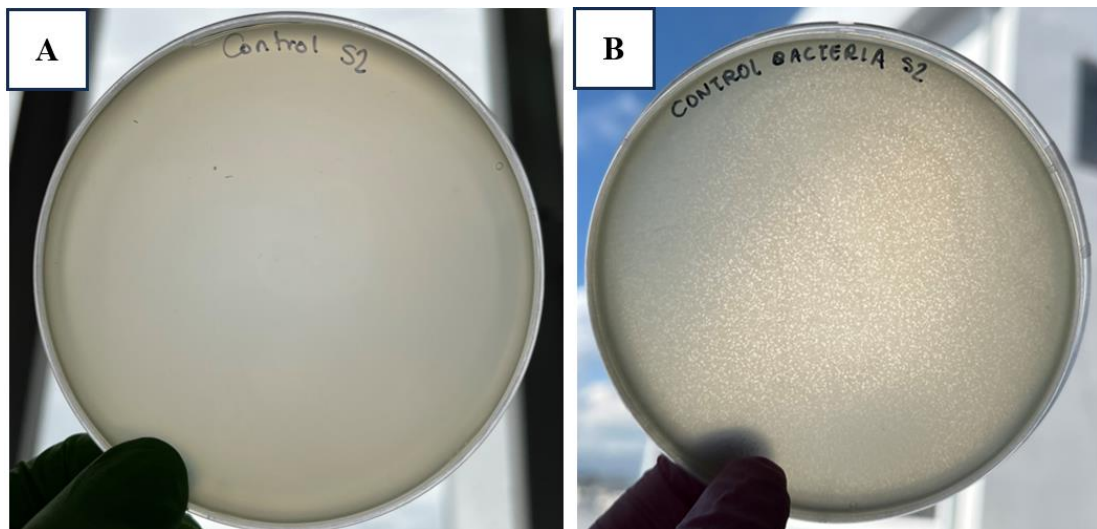
A partir del punto 4, se observó la formación de calvas de lisis en los controles positivos de la bacteria S2 (Figura 9), lo que supone que la bacteria indujo la producción de profagos. De acuerdo con Owen et al. (2021), los profagos tienen la capacidad de codificar proteínas que inhiben la formación de partículas de fagos viables, aumentando significativamente la resistencia de las bacterias a infecciones por bacteriófagos, lo que posiblemente influyó de forma negativa en el aislamiento de más bacteriófagos para S2. Estudios recientes han demostrado que algunos profagos en *Salmonella* son inducidos por antibióticos empleados en la agricultura, tales como las

fluoroquinolonas y el carbadox o bien por condiciones estresantes en los intestinos de los animales (Wahl et al., 2019). En la **Figura 8** se observa que, en el caso de la cepa S2, aislada de menudencia de pollo, fue resistente a ciprofloxacina (CIP), antibiótico perteneciente a las fluoroquinolonas.

Un estudio realizado en el año 2016 evaluó la influencia de una población de profagos en la resistencia a los bacteriófagos, hallando que el profago M2 (JBD44) y H (MP29) mostraron resistencia completa a todos los fagos ensayados y que la formación de placas se redujo de 10 a 100 veces en otros casos, demostrando que la presencia de profagos en el genoma de las bacterias influye en la inmunidad bacteriana frente a otros fagos (Bondy-Denomy et al., 2016). En base a estas observaciones, se descartó los bacteriófagos aislados de S2 (F5M1A, F5M1B y F5M2) para posteriores evaluaciones de estabilidad.

Figura 9

Controles positivos de la bacteria S2

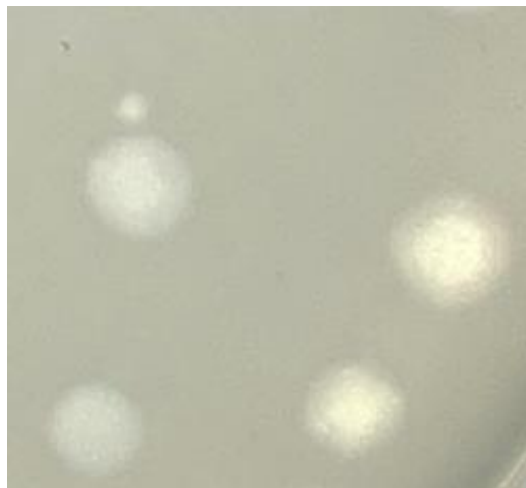


Nota. **A:** Control positivo de S2 en el mes de abril. **B:** Control positivo de S2 en el mes de mayo.

El 62,96 % de los bacteriófagos (17/27) presentaron calvas claras, un indicador típico de los fagos líticos, caracterizada por la destrucción celular total de la bacteria (Kasman & Porter, 2022). Mientras que el 37.04 % restante (10/27) formaron calvas semi claras, posible indicador de capacidad lisogénica. Lo obtenido en el presente proyecto, concuerda con Jurczak-Kurek et al. (2016), quienes caracterizaron las propiedades morfológicas y biológicas de una colección de bacteriófagos aislados de aguas residuales urbanas, donde la mayoría de los fagos aislados formaron placas claras, pero también hubo presencia de fagos con placas turbias. Además, dos de los fagos obtenidos (F4MIA y F8M2) produjeron calvas con presencia de halo (Figura 10), esto es, la presencia de una zona semi transparente en torno a las calvas, lo cual supone que hubo una difusión y una posible acción de las enzimas solubles producidas por los mismos fagos, lo que ocasiona la destrucción de la envoltura celular.

Figura 10

Morfología en placa del fago F8M2



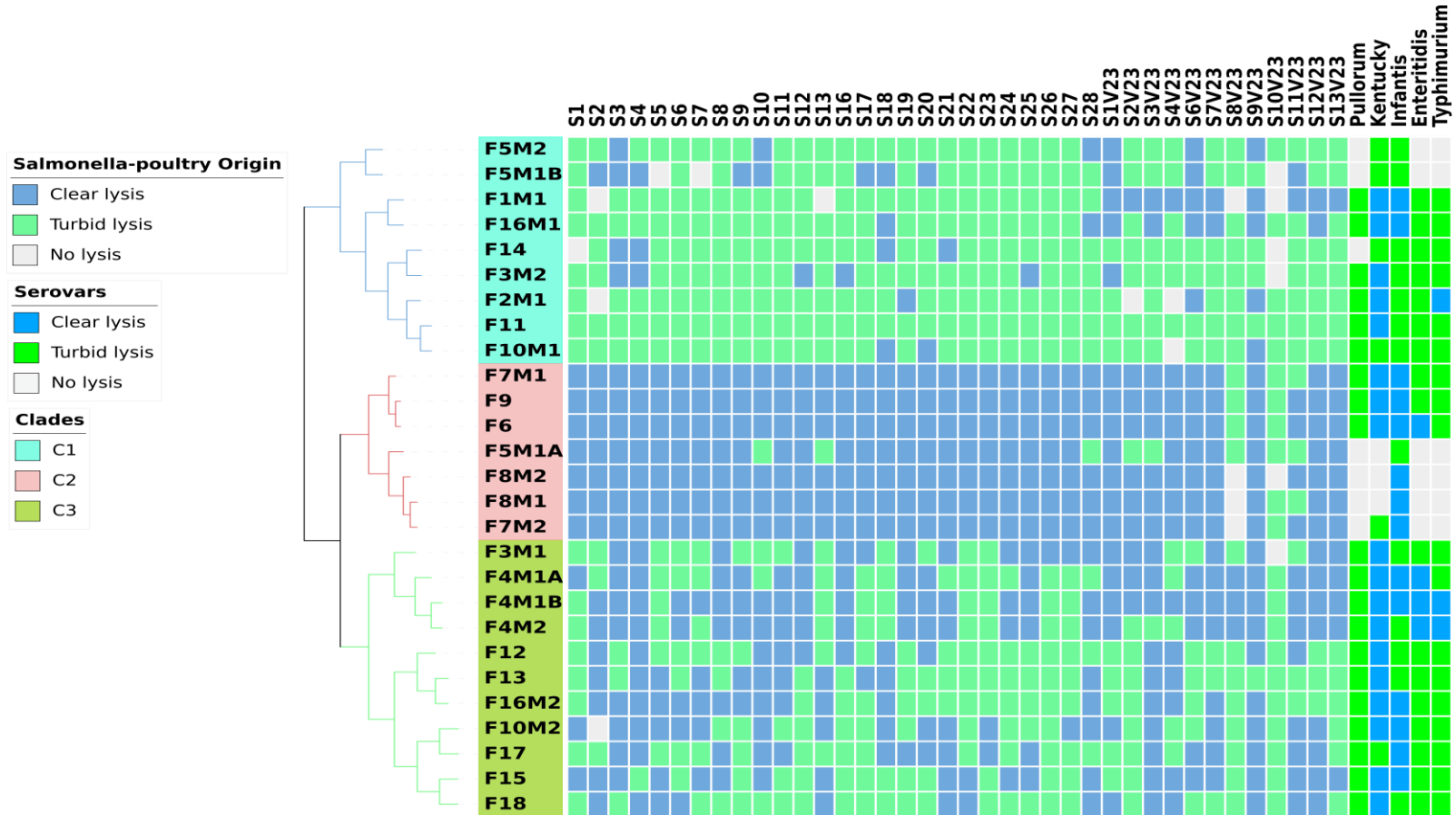
Nota. Ejemplo de la morfología en placa del fago F8M2 con presencia de halo: borde semi transparente alrededor de la calva.

3.1.4. Perfiles líticos de los bacteriófagos

Se evaluó el perfil lítico de los 27 bacteriófagos frente a las dos colecciones de *Salmonella* y 5 serovares de *S. enterica* (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Kentucky* y *S. Infantis*) responsables de enfermedades en las aves y causantes de ETA en todo el mundo (**Sasaki et al., 2021**), por la prueba de la gota. La interacción de los fagos con los huéspedes se reveló como la presencia/ausencia de calvas y según su turbidez, los resultados se clasificaron como: claras (1), semi claras (0) o sin lisis (-1). Consiguiendo agrupar los fagos en 3 clados (**Figura 11**).

Figura 11

Dendrograma obtenido por perfiles líticos de bacteriófagos de Salmonella evaluados en 38 hospedadores y 5 Serovares.



Nota. (-1) Sin lisis, color gris; (0) Semi claros, color verde; (1) Claros, color azul.

El clado 1 con un total de 9 fagos, se caracterizó por una predominancia de calvas semi claras frente a 38 aislados de *S. enterica* de origen aviar y 5 serovares, exhibiendo un bajo rango de hospedadores para esta especie, por lo que su actividad lítica sería limitada para su uso en terapia fágica *in vivo*. Sin embargo, se observa cierta actividad lítica del fago F1M1 y F16M1 para la colección 2, lo que supone que su uso como biocontrol enfocado a la aplicación en carne de pollo para consumo, puede ser más viable que su administración directa en la menudencia.

El clado 2 compuesto por 7 bacteriófagos (F7M1, F9, F6, F5M1A, F8M2, F8M1 y F7M2), mostró una gama de hospedadores más amplia, consiguiendo infectar a aproximadamente el 94.74 % de cepas de *S. enterica*, es decir, que estas presentaron una alta susceptibilidad a la infección por los fagos. Aunque todos los fagos muestran un perfil lítico similar, el fago F6 infectó a 3 de los 5 serovares (Infantis, Kentucky y Enteritidis), mientras que, los fagos F7M1 y F9 fueron efectivos para 2 de éstos (Infantis y Kentucky). Dichos resultados concuerdan con el estudio realizado por **Petsong et al. (2019)**, en el que se evaluó 36 bacteriófagos de *Salmonella* con 47 cepas de *Salmonella* aisladas de diferentes fuentes, estos fagos mostraron mayor capacidad lítica a las cepas aisladas de granjas y mataderos de animales. De modo que, los fagos F6 y F7M1 fueron seleccionados para estudios posteriores de estabilidad.

Los bacteriófagos del clado 3 presentaron un perfil lítico variado por lo que no fue posible encontrar una correlación entre ellos, sin embargo, el fago F4M1B a pesar de no contar con un rango de hospedadores amplio, a diferencia de los otros fagos, fue capaz de lisar 4 de los 5 serovares evaluados, siendo estos Kentucky, Infantis, Enteritidis y Typhimurium, motivo por el cual se lo incluyó para posteriores evaluaciones de estabilidad. Además, se destaca que ninguno de los fagos presentó una actividad lítica para el serovar Pullorum en ninguno de los clados. *S. Pullorum* es un serovar de *S. enterica* que infecta gravemente a aves de corral, es más común en granjas avícolas de África y Asia, por lo que, los estudios sobre el aislamiento de bacteriófagos líticos de *S. Pullorum* son mínimos a comparación de otros serovares (**Bao et al., 2019**), en base a esto, la ausencia de fagos para este serovar pudo deberse a la poca concurrencia de infecciones por esta bacteria en granjas avícolas de Ecuador.

Además, los bacteriófagos aislados en el presente proyecto se obtuvieron a partir de muestras de ríos contaminados, lo que posiblemente influyó en la ausencia de bacteriófagos líticos específicos de *S. Pullorum*, ya que, de acuerdo con un estudio realizado en China, en el que se aisló, caracterizó y evaluó el rango de hospedadores de un grupo de fagos, 78 de los fagos capaces de infectar a *S. Pullorum*, fueron aislados y purificados a partir de aguas residuales recolectadas de granjas avícolas (**Tao et al., 2021**). Por lo que, con la finalidad de obtener bacteriófagos líticos del serovar *Pullorum*, es requerido utilizarlo como hospedador para futuras investigaciones.

3.1.5. Estabilidad de los bacteriófagos a baja temperatura y diferente pH

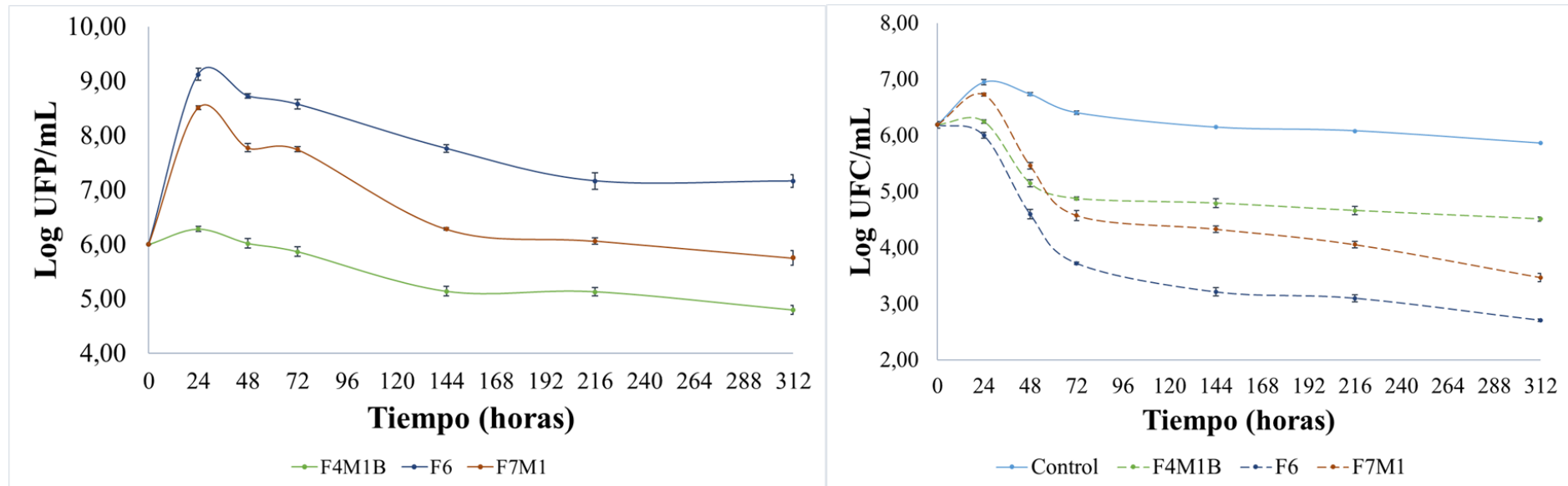
La estabilidad de los bacteriófagos varía en función de la temperatura, lo que determina su viabilidad y almacenamiento, además, su capacidad de soportar un rango de pH afecta su aplicabilidad y por lo tanto su eficacia sobre los títulos fágicos (**Jończyk et al., 2011; Xu et al., 2023**). Para probar si los fagos F4M1B, F6 y F7M1 podían reducir la carga bacteriana de *Salmonella* a bajas temperaturas, se probó su actividad lítica a 4 °C y -18 °C, esto según lo establecido por el RTE INEN 056:2011 para carne y productos cárnicos (**INEN, 2011**), y a pH de 5.5 y 7.2, tomando como referencia lo expuesto por **Soler Sanchis et al. (2011)**, quienes mencionan que el pH final alcanzado en los canales en mataderos avícola es de 5.5, esto durante un período de 312 horas.

La influencia de la temperatura y el pH en la estabilidad de los bacteriófagos F4M1B, F6 y F7M1, se evaluó a través de la reducción del título fágico y título bacteriano en función del tiempo. La influencia del experimento, el tiempo y el fago ($p= 0,0001$), tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el título fágico (Log UFP/mL); sin embargo, como se observa en el **Anexo 5**, el valor p asociado a la interacción experimento x fago ($p= 0,0001$) es significativo, mostrando que los factores evaluados no actúan solo de forma independiente, motivo por el cual, se procedió a comparar las medias de los niveles de cada experimento para cada fago en función del tiempo.

El análisis de varianza reveló que el efecto de los factores temperatura, pH y tiempo sobre el título fágico del fago F4M1B, F6 y F7M1 es estadísticamente significativo ($p= 0,0001$) (**Anexo 6, 11, 18**). La prueba de Tukey demostró que una temperatura de 4 y -18 °C, así como un pH de 5.5 y 7.2 afecta de forma considerable la concentración de los bacteriófagos, de modo que, todos los factores evaluados influyen en la reducción del título fágico a lo largo del tiempo (**Figura 12,13, 14 y 15**).

Figura 12

Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento A



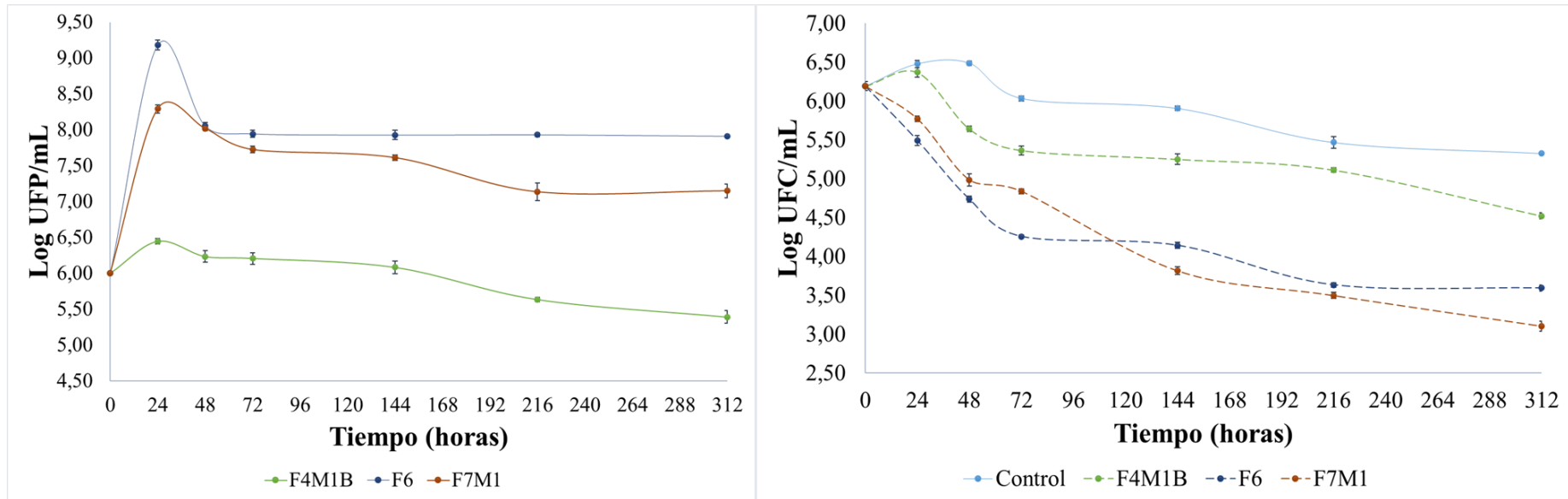
Nota. La imagen de la izquierda muestra la reducción del título de los fagos F4M1B (verde), F6 (azul), F7M1B (naranja) después del experimento A (4 °C; pH 5.5) en función del tiempo (0, 24, 48, 72, 144, 216, 312 horas). Las líneas continuas son las medias y las barras de error representan la desviación estándar (n=3). La imagen de la derecha muestra la reducción de la bacteria S9V23, la línea continua refleja el control negativo y las líneas puntuadas la media de las UFC/mL de la bacteria en presencia de cada fago.

La estabilidad de los bacteriófagos F4M1B, F6 y F7M1 en el experimento A (4 °C y pH 5.5) se evaluó durante un periodo de 312 horas (**Figura 12, izquierda**). La concentración inicial del título fágico fue de 1×10^6 UFP/mL para todos los casos, en este contexto se puede observar que a las 24 horas existió un aumento considerable de 3.13, 2.51 y 0.28 Log UFP/mL para el fago F6, F7M1 y F4M1B respectivamente, alcanzando el punto más alto. Sin embargo, a partir de las 48 horas se observa una disminución significativa en los tres fagos, posible influencia de la temperatura y pH. De acuerdo con la prueba de medias de Tukey (**Anexo 6**), la concentración final muestra una diferencia estadísticamente alta con respecto a las 24 horas, disminuyendo 1.97, 2.76, y 1.48 Log UFP/mL en el fago F6, F7M1 y F4M1B respectivamente.

La cinética bacteriana (**Figura 12, derecha**), muestra que existen diferencias significativas ($p=0,0001$) entre las medias de la concentración bacteriana en presencia de fago, en relación con la bacteria control (ausencia de fago) a las mismas condiciones, demostrando que la reducción de la bacteria es consecuencia de la acción del fago (**Anexo 22**). En presencia del fago F6, la bacteria se redujo 3.16 Log UFC/mL a las 312 horas en comparación con el control, siendo este el que presentó la mayor lisis, seguido del fago F7M1 y F4M1B con una reducción de 2.4 y 1.36 Log UFC/mL.

Figura 13

Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento B



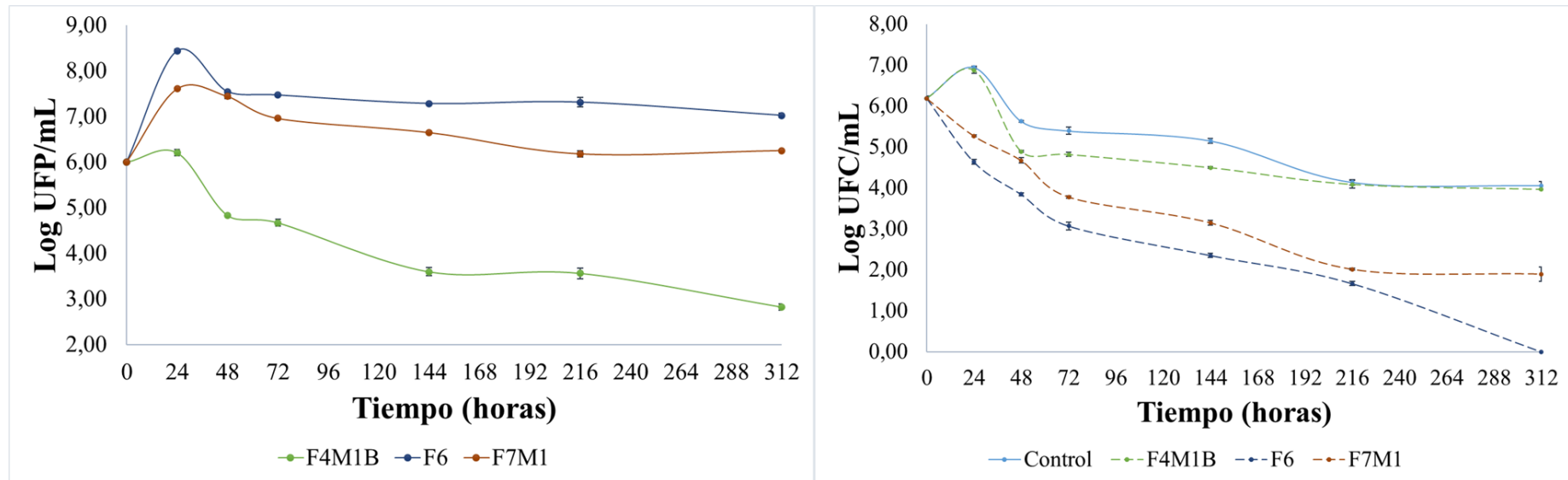
Nota. La imagen de la izquierda muestra la reducción del título de los fagos F4M1B (verde), F6 (azul), F7M1B (naranja) después del experimento B (4 °C; pH 7.2) en función del tiempo (0, 24, 48, 72, 144, 216, 312 horas). Las líneas continuas son las medias y las barras de error representan la desviación estándar (n=3). La imagen de la derecha muestra la reducción de la bacteria S9V23, la línea continua refleja el control negativo y las líneas puntuadas la media de las UFC/mL de la bacteria en presencia de cada fago.

La estabilidad de los bacteriófagos en el experimento B (4 °C, pH 7.2) durante las 312 horas de estudio se presentan en la **Figura 13** (izquierda). Se puede apreciar que, a las 24 horas, los bacteriófagos alcanzan su punto más alto, aumentando 3.18, 2.29, y 0.45 Log UFP/mL, con respecto al valor inicial, para el caso de los fagos F6, F7M1 y F4M1B respectivamente. A partir de las 48 horas se observa una disminución en todos los casos. Con respecto al fago F6, la prueba de Tukey muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias a las 72, 216, 144 y 312 horas (**Anexo 13**), no así para los fagos F4M1B y F7M1, cuya concentración a las 312 horas con respecto a las 48 horas se redujo significativamente, disminuyendo 0.85 y 0.87 Log UFP/mL (**Anexo 8 y 18**).

En contraste con la cinética bacteriana (**Figura 13**, derecha), el análisis de medias mostró diferencias significativas ($p=0,0001$), entre la concentración de la bacteria en presencia de fago, en comparación con el control (ausencia de fago) a las mismas condiciones (**Anexo 11**), lo que demuestra que la reducción de la bacteria estuvo netamente influenciada por la acción del fago. Se puede evidenciar que en presencia del fago F6 y F7M1 la bacteria se redujo considerablemente, disminuyendo 2.59 y 3.08 Log UFC/mL en base al valor inicial, respectivamente; siendo el fago F7M1 el que presentó una mayor lisis, disminuyendo a la bacteria 2.22 Log UFC/mL por debajo del control; mientras que, en presencia del F4M1B, la bacteria tan solo se redujo en 0.81 Log UFC/mL a las 312 horas con respecto al control, debido a la baja concentración del fago, posiblemente influenciado por acción de la temperatura.

Figura 14

Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento C



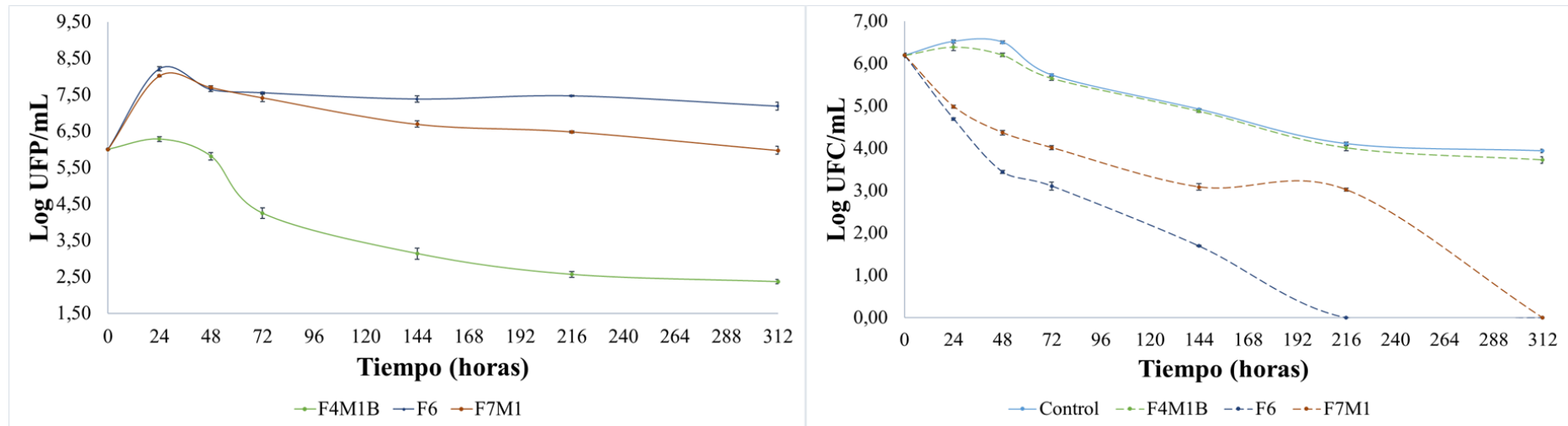
Nota. La imagen de la izquierda muestra la reducción del título de los fagos F4M1B (verde), F6 (azul), F7M1B (naranja) después del experimento C (-18 °C; pH 5.5) en función del tiempo (0, 24, 48, 72, 144, 216, 312 horas). Las líneas continuas son las medias y las barras de error representan la desviación estándar (n=3). La imagen de la derecha muestra la reducción de la bacteria S9V23, la línea continua refleja el control negativo y las líneas puntuadas la media de las UFC/mL de la bacteria en presencia de cada fago.

La estabilidad de los bacteriófagos en el experimento C (-18 °C, pH 5.5) se muestran en la **Figura 14** (izquierda). Se puede apreciar que, a las 24 horas, los bacteriófagos alcanzan su punto más alto, aumentando 2.44, 1.61, y 0.21 Log UFP/mL, con respecto al valor inicial, para el caso de los fagos F6, F7M1 y F4M1B respectivamente. A partir de las 48 horas se observa una disminución en todos los casos. La prueba de Tukey muestra que existe una diferencia significativa entre las medias a las 48 y 312 horas de los fagos F6, F7M1 y F4M1B (**Anexo 14, 19, 9**), disminuyendo el título fágico en 0.52, 1.19 y 2.01 Log UFP/mL respectivamente. Siendo el fago F4M1B el que presenta mayor reducción, alcanzado un valor de 2.83 Log UFP/mL a las 312 horas, posible acción de la temperatura y el pH.

En contraste con la cinética bacteriana (**Figura 14**, derecha), la comparación de medias mostró diferencias significativas ($p= 0,0001$), entre la concentración de la bacteria en presencia de fago y el control (ausencia de fago) a las mismas condiciones (**Anexo 24**), lo que demuestra que la reducción de la bacteria estuvo netamente influenciada por la acción del fago. Se puede evidenciar que el fago F6 fue capaz de inactivar por completo a la bacteria en un periodo de 312 horas, manteniéndose estable y activo a las condiciones de este experimento. Por su parte, el fago F7M1 alcanzó una reducción de la bacteria de 2.16 Log UFC/mL en 312 horas en comparación con el control, mientras que el fago F4M1B perdió su actividad a las 216 horas, debido a la baja concentración de este.

Figura 15

Estabilidad de los bacteriófagos en el experimento D



Nota. La imagen de la izquierda muestra la reducción del título de los fagos F4M1B (verde), F6 (azul), F7M1B (naranja) después del experimento D (-18 °C; pH 7.2) en función del tiempo (0, 24, 48, 72, 144, 216, 312 horas). Las líneas continuas son las medias y las barras de error representan la desviación estándar (n=3). La imagen de la derecha muestra la reducción de la bacteria S9V23, la línea continua refleja el control negativo y las líneas puntuadas la media de las UFC/mL de la bacteria en presencia de cada fago.

La estabilidad de los bacteriófagos en el experimento D (-18 °C, pH 7.2) se presentan en la **Figura 15** (izquierda). Se puede apreciar que, a las 24 horas, los bacteriófagos alcanzan su punto más alto, aumentando 2.21, 2.02 y 0.28 Log UFP/mL, con respecto al valor inicial, para el caso de los fagos F6, F7M1 y F4M1B respectivamente. A partir de las 48 horas se observa una disminución en todos los casos. Con respecto al fago F6, la prueba de Tukey muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias a las 48, 72, 216 y 144 horas (**Anexo 15**), alcanzando un valor final de 7.19 Log UFP/mL a las 312 horas. En el caso del fago F7M1 se observa una reducción del título fágico en cada tiempo, sin embargo, no existe una diferencia significativa entre el valor final y el valor inicial (**Anexo 20**), siendo estos 5.98 y 6 Log UFP/mL respectivamente. Por su parte, el fago F4M1B muestra una reducción significativa a las 48, 72, 144 y 216 horas (**Anexo 10**), teniendo un título fágico de 2.37 Log UFP/mL a las 312 horas, 3.63 Log UFP/mL por debajo del valor inicial.

En contraste con la cinética bacteriana (**Figura 15**, derecha), la comparación de medias mostró diferencias significativas ($p= 0,0001$), entre la concentración de la bacteria en presencia de fago y el control (ausencia de fago) a las mismas condiciones (**Anexo 25**), lo que demuestra que la reducción de la bacteria estuvo netamente influenciada por la acción del fago. En el caso de los fagos F6 y F7M1, estos pudieron inactivar completamente a la bacteria en un lapso de 216 y 312 horas respectivamente, esto debido a que fueron capaces de mantener su actividad a las condiciones de este experimento. Mientras que, el fago F4M1B al ver su título fágico drásticamente disminuido debido a la acción de la temperatura, no fue capaz de lisar de forma efectiva a la bacteria, al compararla con el control.

En resumen, en las 4 condiciones evaluadas los bacteriófagos F4M1B, F6 y F7M1 mostraron un aumento en el título fágico a las 24 horas, debido a la presencia de la bacteria que favoreció su reproducción. El efecto de la temperatura y el pH fue evidente en todos los casos, sin embargo, ambos tuvieron un efecto independiente sobre cada fago. El fago F6 se mantuvo viable en los cuatro experimentos durante las 312 horas, siendo el pH el factor de mayor influencia en la reducción de la concentración, presentando mayor estabilidad a las condiciones del experimento D, es

decir, a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 7.2, consiguiendo inactivar a la bacteria en 216 horas. En el caso del fago F7M1B este se mantuvo estable en los cuatro experimentos, presentando una menor reducción del título fágico a las condiciones del experimento B, es decir, a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH 7.2, sin embargo, a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, el pH 5.5 mostro un efecto significativo en la reducción de la concentración del fago, mientras que a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ el factor predominante fue la temperatura. Con respecto al fago F4M1B, este mantuvo su actividad a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin influencia significativa del pH, no así a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde perdió su actividad a las 216 horas.

La temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ presentó un menor efecto en todos los casos, esto concuerda con los estudios realizados por **Mullan (2001)**, en el que bacteriófagos evaluados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostraron reducciones insignificantes en un periodo de 6 meses, demostrando que la temperatura de refrigeración es ideal para el mantenimiento de fagos; sin embargo, investigadores como **Mohamed et al. (2022)**, recomiendan que su almacenamiento a esta temperatura no sobrepase los 40 días. Los efectos variados de los fagos a dicha temperatura son causa directa de sus cualidades, ya que, investigaciones describen la existencia de fagos con características biológicas inusuales como la capacidad de formar placas a bajas temperaturas ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (**Jurczak-Kurek et al., 2016**).

Por su parte, la temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ afectó en mayor medida al título fágico. De acuerdo con **Leny & Waturangi (2023)**, el almacenamiento de bacteriófagos a temperaturas inferiores a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ reduce significativamente la actividad de los fagos, debido a las estructuras cristalinas del hielo formadas por el almacenamiento a largos periodos, que dañan la ultraestructura del fago, teniendo un mayor efecto en aquellos con cola de la familia *Myoviridae*, ya que la cola y las fibras de la misma, pueden disociarse de la cabeza del fago, destruyéndolo, incluso en presencia de un crioprotector.

De igual forma, **Jończyk et al. (2011)**, indican que las temperaturas de congelación pueden influir negativamente en su estabilidad, ya que, al no estar en presencia de una temperatura óptima de replicación, el material genético de los fagos que ingresa a la

célula huésped es menor, por lo cual, una cantidad menor de ellos, se involucran en la fase de multiplicación. Aun así, **Ackermann et al. (2004)**, asegura que algunos bacteriófagos pueden ser resistentes a dicha temperatura. A pesar de ello, los bacteriófagos F6 y F7M1 consiguieron inactivar por completo a la bacteria, esto pudo ser causa de la reducción en la concentración bacteriana por efecto de la temperatura, lo que favoreció la acción de los fagos, al encontrarse en una mayor proporción respecto a la bacteria.

El efecto del pH a 7.2 se utilizó como un estándar, ya que la norma ISO 10705-2 (**ISO, 2002**), lo establece como el pH óptimo para el aislamiento, purificación y conservación de fagos, en este contexto, este factor pudo haber contribuido a la subsistencia de estos fagos a lo largo del tiempo y no tener influencia negativa sobre éstos. Por su parte, un pH de 5.5 tuvo un efecto significativo en la disminución del título fágico, esto debido a que, al igual que la temperatura, dañan los elementos estructurales de los fagos como la cabeza y cola (**Ackermann et al., 2004**). Los datos obtenidos coinciden con el estudio de **Ly-Chatain (2014)**, donde al evaluar los factores de afectan la eficiencia de tratamiento con fagos de *S. aureus*, encontraron que el título fágico se redujo en 2 Log UFP/mL en tan solo 6 horas al exponerlos a un pH de 5.38, demostrando así que, los títulos fágicos tienden a bajar lentamente cuando hay una reducción significativa del pH, además si un fago está en condiciones desfavorables de crecimiento (pH), las fibras del mismo permanecen retraídas, lo que no permite el ciclo de infección (**Aksyuk & Rossmann, 2011**).

No obstante, los bacteriófagos consiguieron mantener su actividad durante las 312 horas a un pH de 5.5, datos que se ajustan a los obtenidos por **Mohamed et al. (2022)**, quienes al caracterizar los bacteriófagos ϕ PAE1 y ϕ PAE2, estos no perdieron su capacidad de infección en un rango de pH de 5 a 8, pero, a valores inferiores su actividad lítica disminuyó con el aumento del período de almacenamiento, por lo que el tiempo también es un factor importante para tener en cuenta. En consecuencia, se pudo observar que las bajas temperaturas y el pH es un factor que afecta la estabilidad de los bacteriófagos, por lo que se destaca la importancia de su estudio (**Jurczak-Kurek et al., 2016**).

3.2. Verificación de hipótesis

En base a los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación, se acepta la hipótesis alternativa; ya que, fue posible realizar una bioprospección de bacteriófagos líticos de *S. enterica* multirresistente de origen avícola aislados a partir de fuentes acuáticas contaminadas de la provincia de Cotopaxi y Tungurahua.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se realizó una bioprospección de 27 bacteriófagos aislados a partir de fuentes acuáticas de ríos contaminados de la provincia de Tungurahua y Cotopaxi, utilizando dos cepas de *S. enterica* serovar Infantis, multirresistente de origen avícola. La evaluación de sus perfiles líticos y estabilidad a bajas temperaturas demostró su potencial como agentes de biocontrol de microorganismos patógenos aplicados en alimentos crudos como el pollo.
- Se seleccionaron dos hospedadores de *S. enterica* (S2 y S9V23) para el aislamiento de bacteriófagos. La genotipificación molecular con los genes de virulencia *bcfC* y *M.SinI* identificaron a las cepas como *S. enterica* serovar Infantis. El análisis filogenético por (GTG)₅-PCR demostró su alta variabilidad genética con respecto a otros aislamientos, mientras que, su perfil de resistencia fenotípica frente a 17 antibióticos mostró un fenotipo de multirresistencia y producción de BLEE.
- Se aisló y purificó un total de 27 bacteriófagos para *S. enterica*, 3 usando como hospedador la bacteria S2 y 24 con la bacteria S9V23. De ellos, el 62.96 % (17/27) presentaron calvas claras, indicador típico de actividad lítica, mientras que el 37.04 % (10/27) formaron calvas semi claras, posible indicador de actividad lisogénica.
- Se evaluó el perfil lítico de los 27 bacteriófagos frente a 38 cepas de *Salmonella* y 5 serovares de *S. enterica*. El 25.93 % (7/27) mostraron actividad lítica con un rango amplio de hospedadores, en base a esto se determinó que los bacteriófagos F6, F7M1 y F4M1B eran los mejores candidatos para pruebas de estabilidad. Utilizando estos bacteriófagos se estableció que la temperatura y el pH son factores que influyen significativamente en la reducción del título fágico, lo que demuestra la importancia de estudiar las condiciones de

estabilidad de los bacteriófagos para su aplicación exitosa como agentes de biocontrol de microorganismos patógenos en alimentos.

4.2. Recomendaciones

- Si bien, los bacteriófagos pueden actuar de forma independiente como agentes de biocontrol, su aplicación como cocteles de fagos garantiza la lisis de bacterias patógenas, motivo por el cual se propone ampliar la colección de los bacteriófagos, con el fin de poder escoger aquellos candidatos ideales en posteriores aplicaciones *in vivo*.
- La multiplicidad de infección (MOI) influye en la efectividad de los fagos sobre la lisis de la bacteria, por lo que, se sugiere la evaluación de la estabilidad de los fagos a distintos MOI, así como con temperaturas superiores a los 25 °C si el interés de estos radica en su aplicación en industrias con tratamientos térmicos elevados en plantas de procesamiento de pollos.
- Es necesario caracterizar las propiedades genómicas de los bacteriófagos para su aplicación como biocontrol, para garantizar la ausencia de genes de resistencia a los antibióticos que puedan tener un efecto contrario al esperado.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Ackermann, H.-W., Tremblay, D., & Moineau, S. (2004). *Long-term bacteriophage preservation*. <https://www.researchgate.net/publication/285783875>
- AGROCALIDAD. (2016). *AGROCALIDAD, 2016, Listado de Moléculas Prohibidas: Resolución 034 Cancelación Cloranfenicol y Nitrofuranos*. 1.
- Aguilera, M., Martínez, S., Tello, M., Gallardo, M. J., & García, V. (2022). Use of Cocktail of Bacteriophage for *Salmonella* Typhimurium Control in Chicken Meat. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/FOODS11081164>
- Aksyuk, A. A., & Rossmann, M. G. (2011). Bacteriophage Assembly. *Viruses*, *3*(3), 172. <https://doi.org/10.3390/V3030172>
- Almutairi, M., Imam, M., Alammari, N., Hafiz, R., Patel, F., & Alajel, S. (2022). Using Phages to Reduce *Salmonella* Prevalence in Chicken Meat: A Systematic Review. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*, *3*(1), 15–27. https://doi.org/10.1089/PHAGE.2021.0017/ASSET/IMAGES/LARGE/PHAGE.2021.0017_FIGURE1.JPEG
- Arenas, G. N., Neusa, G., & Alvearreascos, R. R. (2021). Poultry Farming InTimes of Pandemic and Its Impact on Poultry Farm Production in Ecuador. *Linguistica Antverpiensia*, *2*, 11.
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 771510. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.771510/BIBTEX>
- Babazadeh, D., & Ranjbar, R. (2021). (GTG)5-PCR Mediated Molecular Typing of Zoonotic Bacteria. *World Vet. J*, *11*(2), 279–283. <https://doi.org/10.54203/scil.2021.wvj37>

- Baéza, E., Guillier, L., & Petracci, M. (2022). Review: Production factors affecting poultry carcass and meat quality attributes. *Animal*, *16*, 100331. <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2021.100331>
- Bantawa, K., Sah, S. N., Subba Limbu, D., Subba, P., & Ghimire, A. (2019). Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Vibrio* isolated from chicken, pork, buffalo and goat meat in eastern Nepal. *BMC Research Notes*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S13104-019-4798-7>
- Bao, H., Shahin, K., Zhang, Q., Zhang, H., Wang, Z., Zhou, Y., Zhang, X., Zhu, S., Stefan, S., & Wang, R. (2019). Morphologic and genomic characterization of a broad host range *Salmonella enterica* serovar Pullorum lytic phage vB_SPuM_SP116. *Microbial Pathogenesis*, *136*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103659>
- Bardina, C., Spricigo, D. A., Cortés, P., & Llagostera, M. (2012). Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(18), 6600–6607. https://doi.org/10.1128/AEM.01257-12/SUPPL_FILE/ZAM999103647SO1.PDF
- Berglund, F., Ebmeyer, S., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2023). Evidence for wastewaters as environments where mobile antibiotic resistance genes emerge. *Communications Biology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/S42003-023-04676-7>
- Bescucci, D. M., Montana, T., Boras, V. F., & Inglis, G. D. (2022). Infection by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Modulates Immune Responses, the Metabolome, and the Function of the Enteric Microbiota in Neonatal Broiler Chickens. *Pathogens*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11111257/S1>
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, *10*(12), 2854. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2016.79>

- Burnett, E., Ishida, M., de Janon, S., Naushad, S., Duceppe, M. O., Gao, R., Jardim, A., Chen, J. C., Tagg, K. A., Ogunremi, D., & Vinueza-Burgos, C. (2021). Whole-Genome Sequencing Reveals the Presence of the blaCTX-M-65 Gene in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and Multi-Drug-Resistant Clones of *Salmonella* Serovar Infantis Isolated from Broiler Chicken Environments in the Galapagos Islands. *Antibiotics*, *10*(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10030267>
- Chlebicz, A., & Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(5). <https://doi.org/10.3390/IJERPH15050863>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2019). Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution* *2019* *88:1*, *88*(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/S00239-019-09914-3>
- Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J. C., Arias, J., Arévalo, A., Donado-Godoy, P., & Vives-Flores, M. (2019). Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. *Poultry Science*, *98*(10), 5054. <https://doi.org/10.3382/PS/PEZ251>
- CONAVE. (2023). *INFORMACIÓN SECTOR AVÍCOLA (PÚBLICO)*. Corporación Nacional de Avicultores Del Ecuador. <https://conave.org/informacion-sector-avicola-publico/>
- de Souza, Z. N., de Moura, D. F., de Almeida Campos, L. A., Córdula, C. R., & Cavalcanti, I. M. F. (2023). Antibiotic resistance profiles on pathogenic bacteria in the Brazilian environments. *Archives of Microbiology*, *205*(5), 185. <https://doi.org/10.1007/S00203-023-03524-W/TABLES/2>
- Dunstan, R. A., Bamert, R. S., Tan, K. S., Imbulgoda, U., Barlow, C. K., Taiaroa, G., Pickard, D. J., Schittenhelm, R. B., Dougan, G., Short, F. L., & Lithgow, T. (2023). Epitopes in the capsular polysaccharide and the porin OmpK36 receptors are required for bacteriophage infection of *Klebsiella pneumoniae*. *Cell Reports*, *42*(6), 112551. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112551>

- ECDC, & EFSA. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2018.5500>
- EFSA. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- EFSA, & ECDC. (2023). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal*, 21(3), 7867. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2023.7867>
- Elois, M. A., Silva, R. da, Pilati, G. V. T., Rodríguez-Lázaro, D., & Fongaro, G. (2023). Bacteriophages as Biotechnological Tools. *Viruses*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/V15020349>
- FAO. (2020). *Chickens | Gateway to poultry production and products | Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/poultry-species/chickens/en/>
- FAO. (2022). *Livestock production in Latin America and the Caribbean*. Regional Office for Latin America and the Caribbean. <https://www.fao.org/americas/prioridades/produccion-pecuaria/ru/>
- FAO. (2023). *Producción y productos avícolas: Especies de aves de corral*. Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura. <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/poultry-species/es/>
- Fathima, S., Hakeem, W. G. Al, Shanmugasundaram, R., & Selvaraj, R. K. (2022). Necrotic Enteritis in Broiler Chickens: A Review on the Pathogen, Pathogenesis, and Prevention. *Microorganisms*, 10 (10). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10101958>
- Fegan, N., McAuley, C. M., Gray, J. A., Duffy, L. L., Namvar, A., & Warriner, K. (2022). Current trends in zoonoses and foodborne pathogens linked to the consumption of meat. *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics, Second Edition*, 717–754. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85879-3.00020-9>

- Ferrari, R. G., Rosario, D. K. A., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E. S., & Conte-Juniora, C. A. (2019). Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>
- Gardiner, B. J., Stewardson, A. J., Abbott, I. J., & Peleg, A. Y. (2019). Nitrofurantoin and fosfomycin for resistant urinary tract infections: old drugs for emerging problems. *Australian Prescriber*, 42(1), 14–19. <https://doi.org/10.18773/AUSTPRESCR.2019.002>
- Gargano, V., Gambino, D., Migliore, S., Vitale, M., Sciortino, S., Costa, A., & Vicari, D. (2021). Can human handling increase the presence of multidrug resistance (Mdr) in *Salmonella* spp. isolated from food sources? *Microorganisms*, 9(10), 2018. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9102018/S1>
- Gil-Gil, T., Laborda, P., Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., Blanco, P., & Martínez, J. L. (2019). Antimicrobial resistance: a multifaceted problem with multipronged solutions. *MicrobiologyOpen*, 8(11). <https://doi.org/10.1002/MBO3.945>
- Gomes, B., Pena, P., Cervantes, R., Dias, M., & Viegas, C. (2022). Microbial Contamination of Bedding Material: One Health in Poultry Production. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(24), 16508. <https://doi.org/10.3390/IJERPH192416508/S1>
- Gordillo Altamirano, F., Forsyth, J. H., Patwa, R., Kostoulias, X., Trim, M., Subedi, D., Archer, S. K., Morris, F. C., Oliveira, C., Kielty, L., Korneev, D., O'Bryan, M. K., Lithgow, T. J., Peleg, A. Y., & Barr, J. J. (2021). Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials. *Nature Microbiology* 2021 6:2, 6(2), 157–161. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00830-7>
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2018). *Salmonella* infection – Prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review. *Microbiology (United Kingdom)*, 164(11), 1327–1344. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000709>

- Han, S., Byun, K. H., Mizan, M. F. R., Kang, I., & Ha, S. Do. (2022). Bacteriophage and their lysins: A new era of biocontrol for inactivation of pathogenic bacteria in poultry processing and production—A review. *Food Control*, *137*, 108976. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2022.108976>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, *212–213*, 38–58. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.007>
- Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev-Med-080219-122208*, *73*, 197–211. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MED-080219-122208>
- Hu, J., Che, C., Zuo, J., Niu, X., Wang, Z., Lian, L., Jia, Y., Zhang, H., Zhang, T., Yu, F., Nawaz, S., & Han, X. (2021). Effect of Antibiotics on the Colonization of Live Attenuated *Salmonella* Enteritidis Vaccine in Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 784160. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.784160/FULL>
- Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J., & Wang, X. (2018). Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices. *Food Research International*, *111*, 631–641. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.05.071>
- Hudzicki, J. (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*.
- Huemer, M., Shambat, S. M., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, *21*(12). <https://doi.org/10.15252/EMBR.202051034>
- Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals 2019, Vol. 12, Page 35, 12*(1), 35. <https://doi.org/10.3390/PH12010035>

- IACG/OMS. (2019). *No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations.*
- Inda-Díaz, J. S., Lund, D., Parras-Moltó, M., Johnning, A., Bengtsson-Palme, J., & Kristiansson, E. (2023). Latent antibiotic resistance genes are abundant, diverse, and mobile in human, animal, and environmental microbiomes. *Microbiome*, *11*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/S40168-023-01479-0/TABLES/2>
- INEN. (2011). *Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 056:2011 Carne y Productos Cárnicos* (1st ed.). Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- ISO. (2002). *Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos.* https://www.en.aenor.com/_layouts/15/r.aspx?c=N0027095
- Jamal, M., Bukhari, S. M. A. U. S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A., Hussain, T., Rahman, S. u., & Shah, S. S. A. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. In *Journal of Basic Microbiology* (Vol. 59, Issue 2, pp. 123–133). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800412>
- Joaquim, P., Herrera, M., Dupuis, A., & Chacana, P. (2021). Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes isolated from swine production in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, *53*(3), 233–239. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2020.10.001>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages-review. *Folia Microbiologica*, *56*(3), 191–200. <https://doi.org/10.1007/S12223-011-0039-8/TABLES/1>
- Jurczak-Kurek, A., Gasior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., Narajczyk, M., Richert, M., Mieszkowska, A., Wróbel, B., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/SREP34338>
- Kaboré, B., Ouédraogo, G. A., Cissé, H., Ouédraogo, H. S., Sampo, E., Zongo, K. J., Zeba, B., Traoré, Y., Gnankiné, O., Sanou, I., & Savadogo, A. (2022). (GTG)5-

- PCR fingerprinting of multi-drug resistant *Escherichia coli* bacteria isolates from hospital in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Microbiology*, 22(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-022-02537-7/FIGURES/4>
- Kaewthong, P., Pomponio, L., Carrascal, J. R., Knøchel, S., Wattanachant, S., & Karlsson, A. H. (2019). Changes in the Quality of Chicken Breast Meat due to Superchilling and Temperature Fluctuations during Storage. *The Journal of Poultry Science*, 56(4), 308. <https://doi.org/10.2141/JPSA.0180106>
- Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2022). Bacteriophages. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 280–283. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00131-5>
- Kering, K. K., Zhang, X., Nyaruaba, R., Yu, J., & Wei, H. (2020). Application of Adaptive Evolution to Improve the Stability of Bacteriophages during Storage. *Viruses*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/V12040423>
- Khalatbari-Limaki, S., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., & Berizi, E. (2020). The morphological and biological characteristics of a virulent PI phage isolated from slaughterhouse sewage in Shiraz, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(6), 616. <https://doi.org/10.18502/IJM.V12I6.5037>
- Kim, S. H., Lee, Y.-S., Joo, I.-S., Kwak, H. S., Chung, G. T., & Kim, S. H. (2018). Rapid Detection for *Salmonella* spp. by Ultrafast Real-time PCR Assay. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 33(1), 50–57. <https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.1.50>
- Klaharn, K., Pichpol, D., Meeyam, T., Harintharanon, T., Lohaankul, P., & Punyapornwithaya, V. (2022). Bacterial contamination of chicken meat in slaughterhouses and the associated risk factors: A nationwide study in Thailand. *PLoS ONE*, 17(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0269416>
- Koh, Y., Bae, Y., Lee, Y. S., Kang, D. H., & Kim, S. H. (2022). Prevalence and Characteristics of *Salmonella* spp. Isolated from Raw Chicken Meat in the Republic of Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 32(10), 1307–1314. <https://doi.org/10.4014/JMB.2207.07031>

- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host and Microbe*, 25(2), 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Cesare, A. De, Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Dewulf, J., Hald, T., Michel, V., ... Davies, R. (2019). *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA Journal*, 17(2), e05596. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5596>
- Lázaro, E., Arribas, M., Cabanillas, L., Román, I., & Acosta, E. (2018). Evolutionary adaptation of an RNA bacteriophage to the simultaneous increase in the within-host and extracellular temperatures. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-26443-Z>
- Leny, L. A., & Waturangi, D. E. (2023). Application of BI-EHEC and BI-EPEC bacteriophages to control enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* on various food surfaces. *BMC Research Notes*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13104-023-06371-6>
- Lopez-Garcia, A. V., Abuoun, M., Nunez-Garcia, J., Nale, J. Y., Gaylov, E. E., Phothaworn, P., Sukjoi, C., Thiennimitr, P., Malik, D. J., Korbsrisate, S., Clokie, M. R. J., & Anjum, M. F. (2023). Pathogen genomics and phage-based solutions for accurately identifying and controlling *Salmonella* pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1166615>
- Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 74029. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00051/BIBTEX>
- MAE. (2023). *Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica*. <https://www.ambiente.gob.ec/mae-ejecuta-plan-de-descontaminacion-del-rio-cutuchi/>
- Magnusson, U. (2021). *How to use antibiotics effectively and responsibly in poultry production for the sake of human and animal health*. FAO.

- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G. T., Clokie, M. R. J., Garton, N. J., Stapley, A. G. F., & Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, *249*, 100–133. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2017.05.014>
- Marmion, M., Ferone, M. T., Whyte, P., & Scannell, A. G. M. (2021). The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge. *Food Microbiology*, *99*, 103823. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103823>
- McMillan, E. A., Wasilenko, J. L., Tagg, K. A., Chen, J. C., Simmons, M., Gupta, S. K., Tillman, G. E., Folster, J., Jackson, C. R., & Frye, J. G. (2020). Carriage and Gene Content Variability of the pESI-Like Plasmid Associated with *Salmonella* Infantis Recently Established in United States Poultry Production. *Genes*, *11*(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/GENES11121516>
- Mejia, L., Vela, G., & Zapata, S. (2021). High Occurrence of Multiresistant *Salmonella* Infantis in Retail Meat in Ecuador. *Https://Home.Liebertpub.Com/Fpd*, *18*(1), 41–48. <https://doi.org/10.1089/FPD.2020.2808>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*, *38*(6), 732. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- Mohamed, W. F., Askora, A. A., Mahdy, M. M. H., EL-Hussieny, E. A., & Abu-Shady, H. M. (2022). Isolation and Characterization of Bacteriophages Active against *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Diabetic Foot Infections. *Archives of Razi Institute*, *77*(6), 2187. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.359032.2357>
- Mohammed Alomari, M. M., Dec, M., & Urban-Chmiel, R. (2021). Bacteriophages as an Alternative Method for Control of Zoonotic and Foodborne Pathogens. *Viruses*, *13*(12). <https://doi.org/10.3390/V13122348>
- Moon, S. H., Waite-Cusic, J., & Huang, E. (2020). Control of *Salmonella* in chicken meat using a combination of a commercial bacteriophage and plant-based

- essential oils. *Food Control*, *110*, 106984.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106984>
- Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, *30*(4), 619–635.
<https://doi.org/10.1016/J.GIEC.2020.06.004>
- Moye, Z. D., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, *10*(4).
<https://doi.org/10.3390/V10040205>
- Mpundu, P., Mbewe, A. R., Muma, J. B., Zgambo, J., & Munyeme, M. (2019). Evaluation of Bacterial Contamination in Dressed Chickens in Lusaka Abattoirs. *Frontiers in Public Health*, *7*(FEB), 19.
<https://doi.org/10.3389/FPUBH.2019.00019>
- Mueller, A. J., Maynard, C. J., Jackson, A. R., Mauromoustakos, A., Kidd, M. T., Rochell, S. J., Caldas-Cueva, J. P., Sun, X., Giampietro-Ganeco, A., & Owens, C. M. (2023). Assessment of meat quality attributes of four commercial broiler strains processed at various market weights. *Poultry Science*, *102*(5), 102571.
<https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2023.102571>
- Mullan, W. M. A. (2001). *Isolation and purification of bacteriophages*.
<https://www.dairyscience.info/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>
- Nale, J. Y., Vinner, G. K., Lopez, V. C., Thanki, A. M., Phothaworn, P., Thiennimitr, P., Garcia, A., AbuOun, M., Anjum, M. F., Korbsrisate, S., Galyov, E. E., Malik, D. J., & Clokie, M. R. J. (2021). An Optimized Bacteriophage Cocktail Can Effectively Control *Salmonella* in vitro and in *Galleria mellonella*. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.609955/FULL>
- OECD/FAO. (2022). Meat. In *Agricultural Outlook 2021-2030*.
<https://doi.org/10.1787/f1b0b29c-en>
- OMS. (2021, June 7). *La OMS intensifica sus esfuerzos para mejorar la salubridad de los alimentos y proteger a la población de las enfermedades*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news/item/07-06-2021-who-steps-up-action-to-improve-food-safety-and-protect-people-from-disease>

- Owen, S. V., Wenner, N., Dulberger, C. L., Rodwell, E. V., Bowers-Barnard, A., Quinones-Olvera, N., Rigden, D. J., Rubin, E. J., Garner, E. C., Baym, M., & Hinton, J. C. D. (2021). Prophages encode phage-defense systems with cognate self-immunity. *Cell Host & Microbe*, 29(11), 1620. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2021.09.002>
- PAHO, & WHO. (2022). *Food Safety*. PAHO/WHO | Pan American Health Organization. <https://www.paho.org/en/topics/food-safety>
- Park, H., Kim, J., Kim, M., Park, Y., & Ryu, S. (2021). Development of new strategy combining heat treatment and phage cocktail for post-contamination prevention. *Food Research International*, 145, 110415. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110415>
- Petsong, K., Benjakul, S., Chaturongakul, S., Switt, A. I. M., & Vongkamjan, K. (2019). Lysis Profiles of *Salmonella* Phages on *Salmonella* Isolates from Various Sources and Efficiency of a Phage Cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *Microorganisms*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7040100>
- Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., Gobena, T., Majowicz, S. E., Hald, T., Hoejskov, P. S., Minato, Y., & Devleeschauwer, B. (2021). Burden of foodborne diseases: think global, act local. *Current Opinion in Food Science*, 39, 152–159. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.01.006>
- Poojari, K., Akhila, D. S., Raj, M. J. R., Santhosh, K. S., Kenjar, A., & Ashwath, P. (2022). Biocontrol of *Escherichia coli* and *Salmonella* in poultry meat using phage cocktail. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 23(3), 270. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2022.41490.6030>
- Principi, N., Silvestri, E., & Esposito, S. (2019). Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Pharmacology*, 10(MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00513>
- Rakov, A. V., Kuznetsova, N. A., & Yakovlev, A. A. (2020). Genetic diversity of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis in the Siberia and Far East

- of Russia based on plasmid profiles. *AIMS Microbiology*, 6(2), 106.
<https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2020007>
- Ramirez, K., Cazarez-Montoya, C., Lopez-Moreno, H. S., & Castro-del Campo, N. (2018). Bacteriophage cocktail for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7: Stability and potential allergenicity study. *PLoS ONE*, 13(5).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0195023>
- Ranjbar, R., Mortazavi, S. M., Mehrabi Tavana, A., Sarshar, M., Najafi, A., & Soruri Zanjani, R. (2017). Simultaneous Molecular Detection of *Salmonella enterica* Serovars Typhi, Enteritidis, Infantis, and Typhimurium. *Iranian Journal of Public Health*, 46(1), 103. /pmc/articles/PMC5401918/
- Rivera-Gomis, J., Marín, P., Otaol, J., Galecio, J. S., Martínez-Conesa, C., & Cubero, M. J. (2021). Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018. *Preventive Veterinary Medicine*, 186, 105222. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2020.105222>
- Rodríguez, D. F., Erazo, J. C., & Narváez, C. I. (2019). Quantitative techniques of marketing research applied to meat consumption in Cuenca City millennial generation. *Contenido. ESPACIOS*, 40, 20.
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 98(4), 1791.
<https://doi.org/10.3382/PS/PEY539>
- Rousham, E. K., Unicomb, L., & Islam, M. A. (2018). Human, animal and environmental contributors to antibiotic resistance in low-resource settings: integrating behavioural, epidemiological and One Health approaches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1876).
<https://doi.org/10.1098/RSPB.2018.0332>
- Ruvalcaba-Gómez, J. M., Villagrán, Z., Valdez-Alarcón, J. J., Martínez-Núñez, M., Gomez-Godínez, L. J., Ruesga-Gutiérrez, E., Anaya-Esparza, L. M., Arteaga-Garibay, R. I., & Villarruel-López, A. (2022). Non-Antibiotics Strategies to

- Control *Salmonella* Infection in Poultry. *Animals* 2022, Vol. 12, Page 102, 12(1), 102. <https://doi.org/10.3390/ANI12010102>
- Salazar, G. A., Guerrero-López, R., Lalaleo, L., Avilés-Esquivel, D., Vinueza-Burgos, C., & Calero-Cáceres, W. (2019). Presence and diversity of *Salmonella* isolated from layer farms in central Ecuador. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.18233.2>
- Samreen, Ahmad, I., Malak, H. A., & Abulreesh, H. H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 101–111. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2021.08.001>
- Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2020). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1347–1354. <https://doi.org/10.1111/JAM.14562>
- Sasaki, Y., Kakizawa, H., Baba, Y., Ito, T., Haremake, Y., Yonemichi, M., Ikeda, T., Kuroda, M., Ohya, K., Hara-Kudo, Y., Asai, T., & Asakura, H. (2021). Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Isolated from Food Workers and Chicken Products in Japan. *Antibiotics*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10121541>
- Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J. J., Reed, S. L., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A. M., Taplitz, R., Smith, D. M., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., McCauley, M. D., Strathdee, S. A., ... Hamilton, T. (2017). Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00954-17>
- Seo, B. J., Song, E. T., Lee, K., Kim, J. W., Jeong, C. G., Moon, S. H., Son, J. S., Kang, S. H., Cho, H. S., Jung, B. Y., & Kim, W. Il. (2018). Evaluation of the broad-spectrum lytic capability of bacteriophage cocktails against various *Salmonella* serovars and their effects on weaned pigs infected with *Salmonella*

- Typhimurium. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6), 851.
<https://doi.org/10.1292/JVMS.17-0501>
- Soler Sanchis, M., Mateos Otero, M., Safón García, E., Soler Romero, P., & Garcés Narro, C. (2011). Caracterización del color y relación con el pH de pechuga de pollo durante el procesado de las canales en matadero. *XLVIII SIMPOSIO CIENTÍFICO DE AVICULTURA*, 6.
- Tao, C., Yi, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, H., Afayibo, D. J. A., Li, T., Tian, M., Qi, J., Ding, C., Gao, S., Wang, S., & Yu, S. (2021). Characterization of a Broad-Host-Range Lytic Phage SHWT1 Against Multidrug-Resistant *Salmonella* and Evaluation of Its Therapeutic Efficacy in vitro and in vivo. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 683853.
<https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.683853/FULL>
- Toprak, Z. T., & Şanlıbaba, P. (2020). Application of Phage for Biocontrol of *Salmonella* Species in Food Systems. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(10), 2214–2221.
<https://doi.org/10.24925/TURJAF.V8I10.2214-2221.3689>
- Torres, M. C., Vieira, T. R., Cardoso, M. R. I., Siqueira, F. M., & Borba, M. R. (2022). Perception of poultry veterinarians on the use of antimicrobials and antimicrobial resistance in egg production. *Poultry Science*, 101(9), 101987.
<https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101987>
- Touret, T., Oliveira, M., & Semedo-Lemsaddek, T. (2018). Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PloS One*, 13(9).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0203501>
- Untea, A. E., Saracila, M., Vlaicu, P. A., Popova, T., Petkov, E., Ignatova, M., Vlahova-Vangelova, D., Balev, D., Dragoev, S., Kolev, N., & Dimov, K. (2023). Meat Quality of Male Layer-Type Chickens Slaughtered at Different Ages. *Agriculture* 2023, Vol. 13, Page 624, 13(3), 624.
<https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE13030624>
- Vikram, A., Callahan, M. T., Woolston, J. W., Sharma, M., & Sulakvelidze, A. (2022). Phage biocontrol for reducing bacterial foodborne pathogens in produce and other

- foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102805. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2022.102805>
- Wahl, A., Battesti, A., & Ansaldi, M. (2019). Prophages in *Salmonella enterica*: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host? *Molecular Microbiology*, 111(2), 303. <https://doi.org/10.1111/MMI.14167>
- Wardani, A. K., Buana, E. O. G. H. N., & Sutrisno, A. (2023). The potency of bacteriophages isolated from chicken intestine and beef tripe to control biofilm-forming bacteria, *Bacillus subtilis*. *Scientific Reports*, 13(1), 8222. <https://doi.org/10.1038/S41598-023-35474-0>
- Wernicki, A., Nowaczek, A., & Urban-Chmiel, R. (2017). Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virology Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12985-017-0849-7>
- Wessels, K., Rip, D., & Gouws, P. (2021). *Salmonella* in Chicken Meat: Consumption, Outbreaks, Characteristics, Current Control Methods and the Potential of Bacteriophage Use. *Foods*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/FOODS10081742>
- Whitman, P. A., & Marshall, R. T. (1971). Characterization of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef. *Applied Microbiology*, 22(3), 463–468. <https://doi.org/10.1128/AM.22.3.463-468.1971>
- WHO. (2019). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*, 6th rev.
- Xu, Z., Ding, Z., Zhang, Y., Liu, X., Wang, Q., Shao, S., & Liu, Q. (2023). Shelf-life prediction and storage stability of *Aeromonas* bacteriophage vB_AsM_ZHF. *Virus Research*, 323, 198997. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2022.198997>
- Yan, M., Zhou, Y., Cao, Y., Li, Z., Lu, X., Pang, B., Wang, S., & Kan, B. (2022). *Salmonella enterica* subsp. II serovar 4,5,12:a:- may cause gastroenteritis infections in humans. *Gut Microbes*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2089007>

- Żbikowska, K., Michalczyk, M., & Dolka, B. (2020). The Use of Bacteriophages in the Poultry Industry. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ANI10050872>
- Zhu, C., Yue, M., Rankin, S., Weill, F. X., Frey, J., & Schifferli, D. M. (2015). One-Step Identification of Five Prominent Chicken *Salmonella* Serovars and Biotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(12), 3881. <https://doi.org/10.1128/JCM.01976-15>

Anexos

Anexo 1

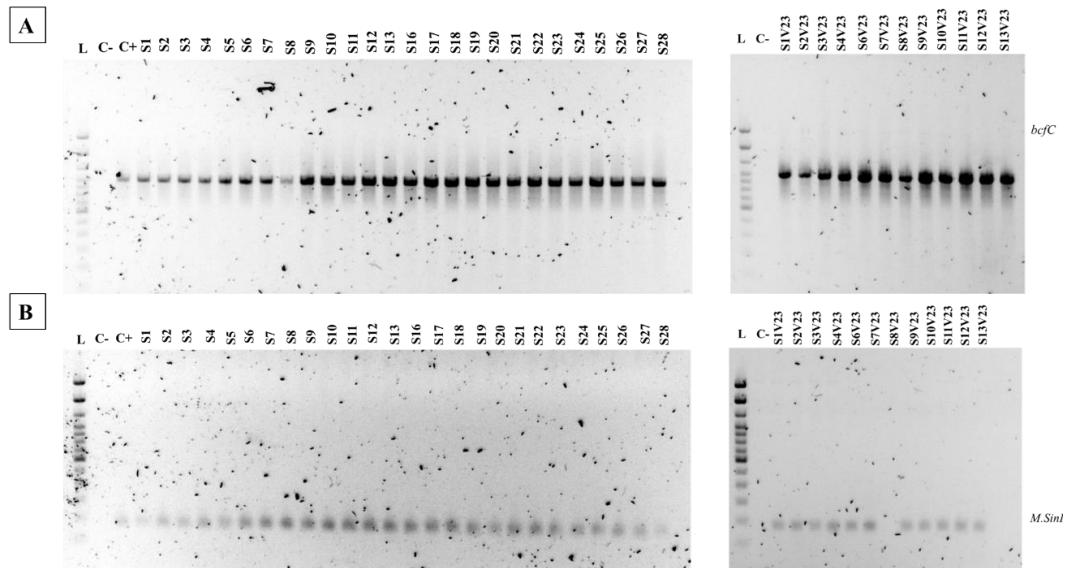
Oligonucleótidos utilizados en PCR

Organismo	Gen	Orientación	Secuencia 5' – 3'	Producto de la PCR (pb)	T(°C) alineamiento	Referencia
<i>Enterica</i>	<i>bcfC</i>	Forward	GGG TGG GCG GAA AAC TAT TTC	993	56	(Zhu et al., 2015)
		Reverse	CGG CAC GGC GGA ATA GAG CAC			
Infantis	<i>M.SinI</i>	Forward	CAC AAT GAA CGT GGT GAA GG	184	56	(Ranjbar et al., 2017)
		Reverse	TGA ACT ACG TTC GTT CTT CTGG			

Nota. Nomenclatura IUPAC de las bases nitrogenadas. A: Adenina; C: Citosina; T: Timina; G: Guanina.

Anexo 2

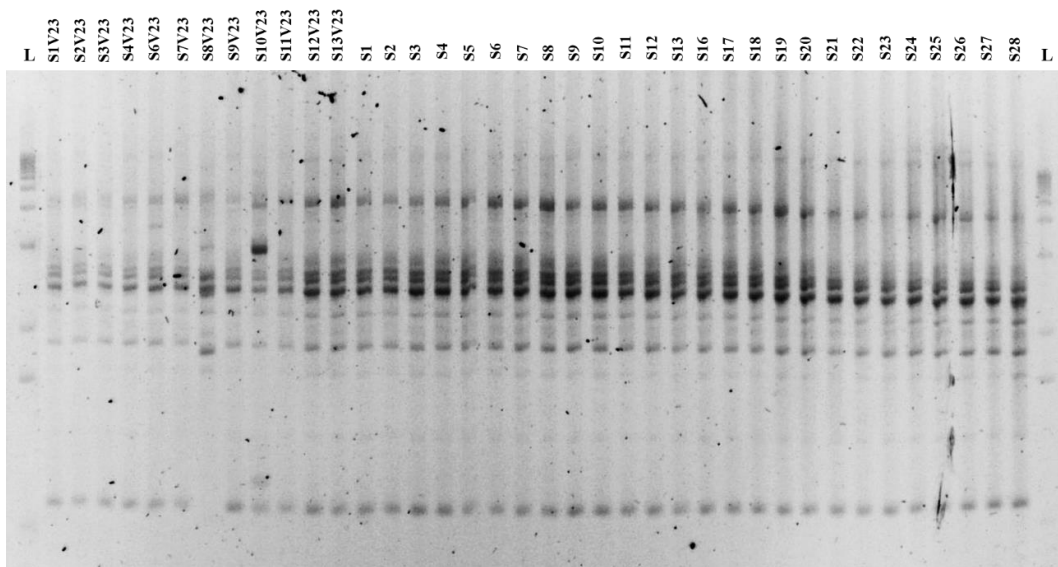
Electroforesis de los genes *bcfC* y *M.SinI* de las 38 cepas de *Salmonella*



Nota. (A) Todas las cepas presentan en gen *bcfC*. (B) Todas las cepas a excepción de la S8V23 presentan el gen *M.SinI*.

Anexo 3

Electroforesis (GTG)₅



Anexo 4

Tipificación molecular de cepas de *Salmonella*

Cepas de <i>Salmonella</i>	Genes de virulencia	
	<i>bcfC</i>	<i>M.SinI</i>
S1	+	+
S2	+	+
S3	+	+
S4	+	+
S5	+	+
S6	+	+
S7	+	+
S8	+	+
S9	+	+
S10	+	+
S11	+	+
S12	+	+
S13	+	+
S16	+	+
S17	+	+
S18	+	+
S19	+	+
S20	+	+
S21	+	+
S22	+	+
S23	+	+
S24	+	+
S25	+	+
S26	+	+
S27	+	+
S28	+	+
S1V23	+	+
S2V23	+	+
S3V23	+	+
S4V23	+	+
S6V23	+	+
S7V23	+	+
S8V23	+	-
S9V23	+	+

Cepas de <i>Salmonella</i>	Genes de virulencia	
	<i>bcfC</i>	<i>M.SinI</i>
S10V13	+	+
S11V23	+	+
S12V23	+	+
S13V23	+	+

Nota: (+) presencia del gen; (-) ausencia del gen

Análisis estadístico

- **Variable de respuesta: Título fágico (UFP/mL)**

Anexo 5

Efecto del experimento, tiempo, fago en el título fágico

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	469,74	71	6,62	21,89	<0,0001
Experimento	37,24	3	12,41	41,07	<0,0001
Tiempo	106,99	6	17,83	59,00	<0,0001
Fago	275,16	2	137,58	455,20	<0,0001
Experimento*Tiempo	15,21	18	0,85	2,80	0,0003
Experimento*Fago	14,94	6	2,49	8,24	<0,0001
Experimento*Tiempo*Fago	20,20	36	0,56	1,86	0,0045
Error	54,40	180	0,30		
Total	524,14	251			

Alfa (α)=0,05

Anexo 6

Efecto de la temperatura y pH sobre el fago F4M1B

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	130,48	27	4,83	755,93	<0,0001
Temperatura	39,25	1	39,25	6139,77	<0,0001
pH	0,23	1	0,23	35,73	<0,0001
Tiempo	64,61	6	10,77	1684,40	<0,0001
Temperatura*pH	1,76	1	1,76	275,35	<0,0001
Temperatura*Tiempo	20,28	6	3,38	528,65	<0,0001
pH*Tiempo	1,26	6	0,21	32,82	<0,0001
Temperatura*pH*Tiempo	3,09	6	0,52	80,69	<0,0001
Error	0,36	56	0,01		
Total	130,84	83			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03495

Error: 0,0064 gl: 56

Temperatura Medias n E.E.

4 5,80 42 0,01 A

-18 4,44 42 0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,03495

Error: 0,0064 gl: 56

pH Medias n E.E.

7,20 5,17 42 0,01 A

5,50 5,07 42 0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,09982

Error: 0,0064 gl: 56

Tiempo Medias n E.E.

24 6,30 12 0,02 A

0 6,00 12 0,02 B

48 5,73 12 0,02 C

72 5,25 12 0,02 D

144 4,49 12 0,02 E

216 4,23 12 0,02 F

312 3,85 12 0,02 G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06534

Error: 0,0064 gl: 56

Temperatura pH Medias n E.E.

4 7,20 6,00 21 0,02 A

4 5,50 5,61 21 0,02 B

-18 5,50 4,53 21 0,02 C

-18 7,20 4,34 21 0,02 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 7

Efeto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento A

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20506

Error: 0,0054 gl: 14

Tiempo Medias n E.E.

24	6,28	3	0,04	A
48	6,02	3	0,04	B
0	6,00	3	0,04	B
72	5,87	3	0,04	B
144	5,14	3	0,04	C
216	5,13	3	0,04	C
312	4,80	3	0,04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 8

Efeto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento B

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18958

Error: 0,0046 gl: 14

Tiempo Medias n E.E.

24	6,44	3	0,04	A
48	6,24	3	0,04	B
72	6,21	3	0,04	B
144	6,09	3	0,04	B C
0	6,00	3	0,04	C
216	5,63	3	0,04	D
312	5,39	3	0,04	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 9

Efeto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento C

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,21084

Error: 0,0057 gl: 14

Tiempo Medias n E.E.

24	6,21	3	0,04	A
0	6,00	3	0,04	A
48	4,84	3	0,04	B
72	4,67	3	0,04	B
144	3,59	3	0,04	C
216	3,57	3	0,04	C
312	2,83	3	0,04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 10

Efeto del tiempo en el fago F4M1B en el experimento D

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,27627

Error: 0,0098 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.	
24	6,28	3	0,06	A
0	6,00	3	0,06	B
48	5,81	3	0,06	B
72	4,25	3	0,06	C
144	3,14	3	0,06	D
216	2,57	3	0,06	E
312	2,37	3	0,06	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 11

Efecto de la Temperatura y pH sobre el fago F6

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	60,49	27	2,24	497,08	<0,0001
Temperatura	5,13	1	5,13	1138,35	<0,0001
pH	0,07	1	0,07	15,21	0,0003
Tiempo	50,19	6	8,37	1856,08	<0,0001
Temperatura*pH	7,6E-05	1	7,6E-05	0,02	0,8970
Temperatura*Tiempo	1,93	6	0,32	71,44	<0,0001
pH*Tiempo	1,78	6	0,30	65,70	<0,0001
Temperatura*pH*Tiempo	1,39	6	0,23	51,38	<0,0001
Error	0,25	56	4,5E-03		
Total	60,74	83			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02935

Error: 0,0045 gl: 56

Temperatura Medias n E.E.

4	7,82	42	0,01	A
-18	7,33	42	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02935

Error: 0,0045 gl: 56

pH Medias n E.E.

7,20	7,60	42	0,01	A
5,50	7,54	42	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08381

Error: 0,0045 gl: 56

Tiempo Medias n E.E.

24	8,74	12	0,02	A
48	7,99	12	0,02	B
72	7,89	12	0,02	C
144	7,59	12	0,02	D
216	7,48	12	0,02	E
312	7,32	12	0,02	F
0	6,00	12	0,02	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05486

Error: 0,0045 gl: 56

Temperatura pH Medias n E.E.

4	7,20	7,85	21	0,01	A
4	5,50	7,79	21	0,01	B
-18	7,20	7,35	21	0,01	C
-18	5,50	7,30	21	0,01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 12

Efeto del tiempo en el fago F6 en el experimento A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26631

Error: 0,0091 gl: 14

Tiempo Medias n E.E.

24	9,13	3	0,06	A
48	8,73	3	0,06	B
72	8,58	3	0,06	B
144	7,77	3	0,06	C
216	7,17	3	0,06	D
312	7,16	3	0,06	D
0	6,00	3	0,06	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 13

Efeto del tiempo en el fago F6 en el experimento B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13105

Error: 0,0022 gl: 14

Tiempo Medias n E.E.

24	9,18	3	0,03	A
48	8,05	3	0,03	B
72	7,94	3	0,03	B C
216	7,93	3	0,03	B C
144	7,93	3	0,03	B C
312	7,91	3	0,03	C
0	6,00	3	0,03	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 14

Efeto del tiempo en el fago F6 en el experimento C

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13204

Error: 0,0022 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.	
24	8,44	3	0,03	A
48	7,55	3	0,03	B
72	7,47	3	0,03	B
216	7,31	3	0,03	C
144	7,29	3	0,03	C
312	7,03	3	0,03	D
0	6,00	3	0,03	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 15

Efeto del tiempo en el fago F6 en el experimento D

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18603

Error: 0,0045 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.	
24	8,21	3	0,04	A
48	7,64	3	0,04	B
72	7,55	3	0,04	B C
216	7,50	3	0,04	B C
144	7,38	3	0,04	C
312	7,19	3	0,04	D
0	6,00	3	0,04	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 16

Efecto de la temperatura y pH sobre el fago F7M1

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	57,19	27	2,12	549,47	<0,0001
Temperatura	2,36	1	2,36	612,25	<0,0001
pH	2,66	1	2,66	691,17	<0,0001
Tiempo	45,76	6	7,63	1978,71	<0,0001
Temperatura*pH	0,72	1	0,72	185,97	<0,0001
Temperatura*Tiempo	0,69	6	0,12	29,94	<0,0001
pH*Tiempo	1,46	6	0,24	63,04	<0,0001
Temperatura*pH*Tiempo	3,53	6	0,59	152,71	<0,0001
Error	0,22	56	3,9E-03		
Total	57,40	83			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02714

Error: 0,0039 gl: 56

Temperatura Medias n E.E.

4 7,15 42 0,01 A

-18 6,81 42 0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02714

Error: 0,0039 gl: 56

pH Medias n E.E.

7,20 7,16 42 0,01 A

5,50 6,80 42 0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07751

Error: 0,0039 gl: 56

Tiempo Medias n E.E.

24 8,11 12 0,02 A

48 7,74 12 0,02 B

72 7,46 12 0,02 C

144 6,81 12 0,02 D

216 6,47 12 0,02 E

312 6,28 12 0,02 F

0 6,00 12 0,02 G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05073

Error: 0,0039 gl: 56

Temperatura pH Medias n E.E.

4 7,20 7,42 21 0,01 A

-18 7,20 6,90 21 0,01 B

4 5,50 6,88 21 0,01 B

-18 5,50 6,73 21 0,01 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 17

Efeto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento A

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18383

Error: 0,0043 gl: 14

Tiempo Medias n E.E.

24 8,51 3 0,04 A

48 7,78 3 0,04 B

72 7,75 3 0,04 B

144 6,29 3 0,04 C

216 6,06 3 0,04 D

0 6,00 3 0,04 D

312 5,75 3 0,04 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 18

Efeto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento B

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18752

Error: 0,0045 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.	
24	8,29	3	0,04	A
48	8,02	3	0,04	B
72	7,73	3	0,04	C
144	7,61	3	0,04	C
312	7,15	3	0,04	D
216	7,14	3	0,04	D
0	6,00	3	0,04	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 19

Efeto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento C

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11300

Error: 0,0016 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.	
24	7,61	3	0,02	A
48	7,45	3	0,02	B
72	6,96	3	0,02	C
144	6,65	3	0,02	D
312	6,25	3	0,02	E
216	6,18	3	0,02	E
0	6,00	3	0,02	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 20

Efeto del tiempo en el fago F7M1 en el experimento D

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19525

Error: 0,0049 gl: 14

Tiempo	Medias	n	E.E.	
24	8,02	3	0,04	A
48	7,70	3	0,04	B
72	7,42	3	0,04	C
144	6,69	3	0,04	D
216	6,49	3	0,04	E
0	6,00	3	0,04	F
312	5,98	3	0,04	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- **Variable de respuesta: Título bacteriano (UFC/ mL)**

Anexo 21

Efecto del experimento, tiempo, fago en el título bacteriano

Cuadro de Análisis de la Varianza

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	604,68	71	8,52	49,14	<0,0001
Experimento	51,28	3	17,09	98,62	<0,0001
Tiempo	368,69	6	61,45	354,55	<0,0001
Fago	109,37	2	54,69	315,54	<0,0001
Experimento*Tiempo	31,67	18	1,76	10,15	<0,0001
Experimento*Fago	23,83	6	3,97	22,92	<0,0001
Experimento*Tiempo*Fago	19,84	36	0,55	3,18	<0,0001
Error	31,20	180	0,17		
Total	635,87	251			

Experimentos versus Control bacteria

Anexo 22

Experimento A: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano

Contrastes

Fago	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Control vs F4M1B	1,14	0,02	13,54	1	13,54	4208,82	<0,0001
Control vs F6	2,12	0,02	47,19	1	47,19	14665,41	<0,0001
Control vs F7M1	1,37	0,02	19,65	1	19,65	6107,38	<0,0001
Total			48,53	3	16,18	5027,32	<0,0001

Anexo 23

Experimento B: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano

Contrastes

Fago	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Control vs F4M1B	0,49	0,01	2,52	1	2,52	1070,08	<0,0001
Control vs F6	1,40	0,01	20,69	1	20,69	8782,92	<0,0001
Control vs F7M1	1,38	0,01	20,05	1	20,05	8510,97	<0,0001
Total			30,20	3	10,07	4272,18	<0,0001

Anexo 24

Experimento C: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano

Contrastes

Fago	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Control vs F4M1B	0,31	0,02	0,99	1	0,99	242,98	<0,0001
Control vs F6	2,25	0,02	53,02	1	53,02	12965,92	<0,0001
Control vs F7M1	1,50	0,02	23,69	1	23,69	5791,97	<0,0001
Total			69,00	3	23,00	5624,71	<0,0001

Anexo 25

Experimento D: Efecto de los fagos sobre el título bacteriano

Contrastes

Fago	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Control vs F4M1B	0,12	0,02	0,16	1	0,16	63,67	<0,0001
Control vs F6	2,68	0,02	75,55	1	75,55	30349,77	<0,0001
Control vs F7M1	1,75	0,02	32,12	1	32,12	12903,81	<0,0001
Total			106,77	3	35,59	14296,61	<0,0001