



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Diseño de cócteles de bacteriófagos con sinergia lítica y estabilidad funcional para el control de *Salmonella enterica* serovar Infantis de origen avícola ecuatoriano

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación “Desarrollo del primer biobanco de bacteriófagos líticos contra *Salmonella enterica* para aplicación en la industria avícola”, aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2025-0028-R, por el Consejo de Investigación e Innovación de la Universidad Técnica de Ambato.

Autores: Justin Alexander Santamaria Rodríguez

Katherine Gabriela Silva Arellano

Tutor: Dr. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato - Ecuador

Enero - 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA:

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

Ambato, 11 de diciembre de 2025

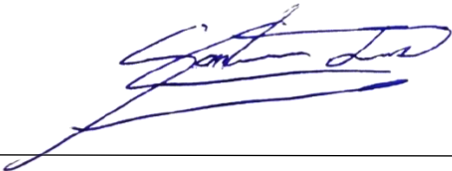
Dr. William Ricardo Calero Cáceres

17143448859

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

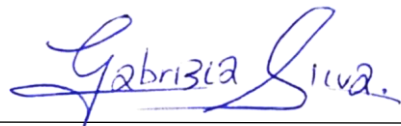
Nosotros, Justin Alexander Santamaria Rodríguez y Katherine Gabriela Silva Arellano manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Justin Alexander Santamaria Rodríguez

1805478425

AUTOR



Katherine Gabriela Silva Arellano

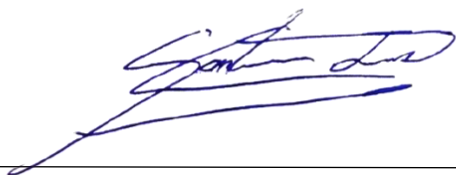
1850515659

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

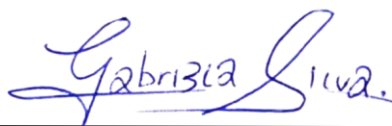
Cedo los Derechos en línea patrimoniales de nuestro Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando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



Justin Alexander Santamaria Rodríguez

1805478425

AUTOR



Katherine Gabriela Silva Arellano

1850515659

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción 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.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova
1803601853

Mg. Danae Fernández Rivero
1757181209

Ambato, 23 de diciembre de 2025

DEDICATORIA

El Señor irá delante de ti; Él estará contigo. No temas ni desmayes.

Deuteronomio 31:8

A Dios, por darme la fuerza y la sabiduría en los momentos en que estuve por rendirme.

Su guía sostiene y su propósito permanece.

A mi madre, por su amor que nunca falla, enseñándome con su ejemplo que la constancia y la humildad abren caminos. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba.

A mis abuelitos y a mi querida familia, por su cariño incondicional, por ser mi apoyo constante. Gracias por acompañarme en cada paso de este camino.

A mis amigos, por todos los buenos y malos momentos que pasamos, y porque pese a todo, siempre encontramos cómo seguir adelante.

A mis maestros, por su paciencia, dedicación y por cada enseñanza que aportó un paso más en este camino.

A mí, por la constancia, las noches de estudio, el esfuerzo silencioso, por levantarme cada vez que me caí y por seguir adelante a pesar del cansancio y la duda.

Justin Santamaria

DEDICATORIA

*Miremos atrás, donde todo empezó,
Lo que éramos antes, lo que somos hoy,
Porque insistir en quitarle la gloria al señor.*

*De que te vale alcanzar lo que quieras,
Que te aplauda la gente si detrás del telón,
Sigue sentado el dador de la vida, esperando que un día,
Le presten atención,*

*Lo que tenemos lo tenemos por gracia,
Por su misericordia, por su inmenso amor,
Y en el momento de abrirse la cortina si alguno te admira,
Que vean la imagen de Dios.*

-René Gonzáles

A Dios sea toda la gloria, porque sin Él no soy nadie.

*A mis padres por todo su esfuerzo, amor y paciencia para hacer de mí una mujer valiente,
decidida e inteligente.*

A todos quienes amé y me amaron.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por guiar mis pasos, darme la fortaleza en los momentos de duda y renovar mi ánimo cuando sentí que no podía más. Cada meta alcanzada ha sido posible gracias a Su gracia y Su presencia en mi vida.

A mi madre, *Maribel*, por su amor infinito, por cada esfuerzo que hizo para que yo pudiera llegar hasta aquí, por cada sacrificio silencioso y por sostenerme incluso en los momentos más difíciles. Su ejemplo es mi mayor inspiración. A mis abuelitos, *mamita Lupe* y *papito Pedro*, por su cariño, por cuidar de mí, por sus oraciones, por enseñarme el valor de la humildad y el esfuerzo. Gracias por ser un pilar fundamental en mi camino. A mis tíos *Alex*, *Verónica* y *Mónica*, por su afecto, consejos y por estar presentes en momentos importantes. Su apoyo ha sido una bendición que valoro profundamente. A mi padre, *Wilson*, por los aportes que también formaron parte de este proceso. A toda mi familia, por estar ahí, incluso en los pequeños gestos que también sumaron.

A mis amigos (*Majo*, *Kevin* y *Angeles*), los quiero mucho. A *Majo*, con quien comparto amistad desde nivelación, se volvió una compañera importante en este recorrido (compartiendo desafíos, apoyo mutuo y una amistad que valoro mucho). A *Kevin* (mi hermano), por su amistad firme, por las risas, los enojos, los trabajos compartidos y el respaldo constante en este camino. A *Angeles*, con quien comparto almuerzos, bromas, buenas salidas y buenos momentos que siempre alegran el día, gracias por tu amistad sincera.

A mi tutor, el *Dr. William Calero*, gracias por ser más que un mentor, por enseñarme con paciencia y por brindarme apoyo en momentos clave. Su dedicación, humanidad y excelencia profesional han sido un ejemplo que valoro profundamente. Gracias por todo lo que aportó a mi formación y por marcar de forma especial esta etapa de mi vida universitaria.

A mi familia UTA RAM (*Angie*, *Sasha*, *Ivanova*, *Cami*, *Gene*, *Mario* y *Eve*) gracias por las risas, el apoyo, por acompañarme en esta etapa con buena energía dentro y fuera del laboratorio. Cada momento compartido aportó a mi crecimiento y lo hizo más llevadero. A *Jae*, quien con su buena vibra hizo que los días en el laboratorio fueran alegres. A mi compañera de tesis (*Gabriela*), gracias por su aporte y por avanzar juntos este proyecto. A mi mejor amigo, *Sebas Z*, gracias por los memes, las horas de juego y cada momento compartido. Tu amistad significa más de lo que imaginas. A mi pequeño grupo: *Damaris*, *Angeles* y *Cami*, gracias por las reuniones, las salidas y por brindarme siempre un espacio para desconectarme y reír. A la Universidad y a la Facultad, gracias por abrirme las puertas y brindarme el espacio para formarme como profesional.

AGRADECIMIENTO

Sin merecer tu misericordia me levantaste cada vez que caía, sin merecer tu amor me abrazaste en silencio cuando sentía que no podía más, sin merecer tu gracia me recomfortaste con cada hermoso cielo y atardecer. Gracias, amado Dios, porque a pesar de no ser tu mejor hija me sigues amando. Porque respondiste cada oración de mi corazón quebrantado preguntándome si este es mi camino. Y me demostraste que lo es. Hoy entrego todo mi trabajo a tus pies amado señor y padre. Gran artista, sigue formando a esta pequeña vasija de barro para reflejar tu voluntad, amor, gloria y sabiduría hacia quienes me rodean. Amén.

A mi papi, William Silva. Usted es mi fortaleza y el pilar que me ha sostenido desde el principio de todo. No podría haber superado los obstáculos sin esos abrazos de dragón y nuestras escapadas a comer. Le prometo que llegaré muy lejos, con estas alas que me ha construido con todo su amor. A mi mami, Catalina Arellano. Quien con todo su cariño y esfuerzo me convirtió en una mujer capaz de enfrentarse al mundo. Pero que por dentro sigue siendo esa niña que se queda dormida en su pecho cada vez el mundo la agobia. No podría haber llegado tan lejos sin cada plato de mi comida favorita, sin cada abrazo para liberar endorfinas, sin nuestras “memes”, cafecitos o novelas juntas. Ni importa lo lejos que llegue a estar, usted siempre será mi refugio, mi confidente y mi mejor amiga. Los amo profundamente a los dos. ¡Gracias por haberme cuidado con tanto amor desde la pancita!

A mi hermana Cristina Silva, el pedacito más importante de mi corazón. Mi compañera, mi amiga, mi bolita. Gracias por tu amor incondicional, por ser el hombro donde puedo llorar, la personita con la que puedo reír y ser yo misma sin miedo. Eres lo más importante de mi vida y nunca te dejaré sola. Somos mejores amigas para toda la vida. Toma mi ejemplo y llega aún más lejos que yo.

Mi Dustin, gracias por llegar a mi vida en el momento justo y demostrarme que el amor es dulce. Gracias por tu compañía en cada momento, difícil o alegre. Por escucharme hablar por horas y cantarme cuando necesitaba tranquilidad. Nos encontramos como dos corazones, un poco magullados, pero dispuestos a amarse. Amor que floreció hermosamente y nos ha dado lindos recuerdos. ¡Formemos muchos más amor mío!

Gracias a mi familia UTA RAM One Health, empezando por quien me abrió las puertas a este pequeño oasis. Mi tutor y mentor Dr. William Calero. Gracias por haber visto en mi esa chispa de amor por la ciencia y darme la confianza de ejecutar el presente trabajo. Por impulsarme a desarrollarme como una profesional competente y a la vez humana. Para siempre tendrá mi admiración y profundo respeto. Y a todos quienes forman parte de este bello lugar, mi Cami, Angie, Majo, Ivanova, Sasha, Eve y Mario. Gracias por todo su apoyo y su linda amistad, son unos chicos increíbles, espero verlos triunfar en cada uno de sus caminos

Y no menos importante mi compañero de tesis, Justin Santamaría. Gracias por ser un apoyo constante y un buen amigo. Por todas las canciones y conversaciones en las largas tardes de trabajo en el laboratorio. Por mantener siempre la actitud positiva y hacerme reír cuando estaba estresada. Es bonito haberte conocido en nivelación y ahora concluir este camino juntos. Que Dios te guíe a alcanzar todo lo que tu corazón desee y te proteja siempre.

INDÍCE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTO.....	viii
AGRADECIMIENTO.....	viii
INDÍCE GENERAL DE CONTENIDOS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN EJECUTIVO	xvi
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Justificación	1
1.1.2. Bases conceptuales de la inocuidad avícola	2
1.1.3. <i>Salmonella enterica</i> serovar Infantis: relevancia biológica y sanitaria	5
1.1.4. Métodos de control microbiológico en la industria avícola.....	7

1.1.5. Fundamento biológico de los bacteriófagos líticos	10
1.2 Objetivos.....	16
1.2.1 Objetivo General	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
CAPITULO II.- METODOLOGÍA	17
2.1 Materiales	17
2.2 Métodos.....	20
2.2.1. Evaluación de la capacidad lítica de bacteriófagos individuales frente a cepas multirresistentes de <i>S. Infantis</i> mediante ensayos fenotípicos.....	20
2.2.2. Determinación de la estabilidad biológica de los fagos seleccionados frente a condiciones de refrigeración, exposición a cloro y su multiplicidad de infección óptima (MOI).....	22
2.2.3. Identificación de combinaciones de bacteriófagos con capacidad lítica complementaria y estabilidad funcional en condiciones simuladas para su posterior análisis de eficacia y efectividad	24
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1 Análisis y discusión de los resultados.....	26
3.1.1 Evaluación de la capacidad lítica de bacteriófagos individuales frente a cepas multirresistentes de <i>S. Infantis</i>	26
3.1.2. Determinación de la estabilidad biológica de los bacteriófagos	36
3.1.3. Identificación de combinaciones de bacteriófagos con capacidad lítica complementaria y estabilidad funcional en condiciones simuladas para su posterior análisis de eficacia y efectividad	47

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
4.1 Conclusiones	64
4.2 Recomendaciones	66
MATERIALES DE REFERENCIA	67
Referencias bibliográficas.....	67
ANEXOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados.....	17
Tabla 2. Condiciones para evaluación de estabilidad de bacteriófagos individuales y en cóctel	23
Tabla 3. Antibióticos evaluados en el perfil de resistencia de <i>S. Infantis</i>	27
Tabla 4. Perfiles de Resistencia de 46 Aislados de <i>S. enterica</i> de varios serovares frente a Antibióticos Seleccionados	29
Tabla 5. Cobertura de infección de los bacteriófagos evaluados frente a <i>S. Infantis</i>	34
Tabla 6. Cobertura de infección de los cócteles de bacteriófagos frente a <i>S. Infantis</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de infección y multiplicación fágica.....	11
Figura 2. Diagrama de la prueba de la gota.....	22
Figura 3. Patrones de lisis de los bacteriófagos frente a cepas de <i>S. Infantis</i>	33
Figura 4. Viabilidad lítica de bacteriófagos en función del tiempo y la concentración de cloro	37
Figura 5. Cinéticas de estabilidad de los bacteriófagos frente a diferentes concentraciones de cloro y tiempos de incubación.....	39
Figura 6. Supervivencia bacteriana tras el tratamiento con bacteriófagos en presencia de cloro	42
Figura 7. Efecto del MOI en la reducción de <i>S. Infantis</i> por los bacteriófagos vB_Sal_eIF_008, vB_Sal_eIF_009 y vB_Sal_eIF_012	45
Figura 8. Red de interacción entre fagos, cócteles formulados y cepas de <i>S. Infantis</i>	48
Figura 9. Cinéticas de estabilidad del cóctel de bacteriófagos frente a diferentes concentraciones de cloro y tiempos de incubación.....	58
Figura 10. Supervivencia bacteriana tras el tratamiento con el cóctel de bacteriófagos en presencia de cloro	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla ANOVA de los efectos principales e interacciones entre fago, tiempo de incubación y concentración de cloro (ppm) sobre la variación del título fágico	84
Anexo 2. Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos bajo condiciones del experimento.....	84
Anexo 3. Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para los fagos.....	89
Anexo 4. Tabla ANOVA de los efectos principales e interacciones entre fago, tiempo de incubación y MOI sobre la variación del título fágico.....	91
Anexo 5. Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos	91
Anexo 6. Parámetros de reducción bacteriana: valores logarítmicos iniciales y finales y disminución ΔLog_{10} para cada combinación experimental.....	93
Anexo 7. Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de los cócteles de fagos bajo condiciones del experimento.....	93
Anexo 8. Tabla ANOVA de los efectos principales e interacciones entre bacterias, tiempo de incubación y concentración de cloro (ppm)	97
Anexo 9. Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para las bacterias.....	97
Anexo 10. Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de bacterias en los cócteles	100
Anexo 11. Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de las bacterias	102

RESUMEN EJECUTIVO

El presente trabajo desarrolla un enfoque integral para el diseño racional de cócteles de bacteriófagos dirigidos al control de *Salmonella enterica* serovar Infantis, un patógeno de creciente relevancia sanitaria en la industria avícola ecuatoriana. A partir de una colección inicial de fagos líticos aislados en el país, se realizó una caracterización exhaustiva de su espectro lítico, capacidad de reducción bacteriana y estabilidad funcional frente a condiciones que simulan el entorno de procesamiento avícola, incluyendo refrigeración y exposición a concentraciones controladas de cloro. Análisis que permitió identificar fagos con desempeño robusto, así como descartar aquellos con actividad limitada o inestable. Posteriormente, se evaluaron combinaciones experimentales para determinar la compatibilidad entre fagos, diferenciando efectos sinérgicos de interacciones antagónicas que pudieran comprometer la eficacia del cóctel. Las mezclas seleccionadas mostraron complementariedad lítica, ampliación del rango de hospedadores y estabilidad frente a los factores operativos estudiados. El proceso de formulación se sustentó en modelos estadísticos multifactoriales y en la estimación de medias marginales, garantizando que la selección final respondiera a criterios cuantitativos y reproducibles. En conjunto, los resultados demuestran la viabilidad de desarrollar cócteles fágicos con potencial de aplicación en programas de control microbiológico dentro de la cadena avícola. El estudio aporta evidencia para el uso de fagos como alternativa biotecnológica frente a *S. Infantis* multirresistente y constituye una base sólida para futuras evaluaciones de eficacia en matrices cárnicas y sistemas productivos reales, contribuyendo al fortalecimiento de la inocuidad alimentaria y a la mitigación del riesgo asociado a patógenos emergentes en Ecuador.

Palabras clave: Cóctel de bacteriófagos, *Salmonella enterica* serovar Infantis, estabilidad funcional, sinergia lítica, control microbiológico avícola

ABSTRACT

This study presents a comprehensive approach for the rational design of bacteriophage cocktails aimed at controlling *Salmonella enterica* serovar Infantis, a pathogen of increasing public health concern within the Ecuadorian poultry industry. Using an initial collection of lytic phages isolated in the country, we conducted an exhaustive characterization of their lytic spectra, bactericidal activity, and functional stability under conditions simulating poultry processing environments, including refrigeration and exposure to controlled chlorine concentrations. This analysis enabled the identification of phages with robust performance, as well as the exclusion of those exhibiting limited or unstable activity. Subsequently, experimental combinations were assessed to determine phage compatibility, distinguishing synergistic interactions from antagonistic effects that could compromise cocktail efficacy. The selected mixtures demonstrated complementary lytic activity, expanded host range coverage, and consistent stability under the operational conditions evaluated. The formulation process was supported by multifactorial statistical modeling and estimated marginal means analyses, ensuring that the final selection was guided by quantitative and reproducible criteria. Overall, the findings demonstrate the feasibility of developing phage cocktails with strong potential for implementation in microbiological control programs within the poultry production chain. This study provides evidence supporting the use of phages as a biotechnological alternative against multidrug-resistant *S. Infantis* and establishes a solid foundation for subsequent efficacy assessments in meat matrices and real production systems, ultimately contributing to enhanced food safety and mitigation of risks associated with emerging pathogens in Ecuador.

Key words: Bacteriophage cocktails, *Salmonella enterica* serovar infantis, functional stability, lytic synergy, poultry microbiological control

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

Cada año, millones de productos avícolas son procesados y distribuidos para el consumo a nivel mundial, siendo este sector uno de los pilares fundamentales de la industria alimentaria (**Fuseini et al., 2023**). Sin embargo, a pesar de los rigurosos controles sanitarios establecidos durante el procesamiento y faenado, la contaminación microbiológica sigue siendo una preocupación persistente (**Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023**). Una de las amenazas más relevantes es *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, una bacteria zoonótica asociada a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), responsable de gastroenteritis y otras infecciones graves (**Lamichhane et al., 2024; Mkangara, 2023**). En condiciones estándar de almacenamiento, como el uso de refrigeración a 4 °C y desinfección con soluciones cloradas, se ha observado que existen cepas multirresistentes de *S. enterica* que logran persistir en superficies y productos cárnicos, representando un riesgo latente para la salud pública y la seguridad alimentaria (**J. L. Da Silva et al., 2022; Obe et al., 2024**). Esta problemática evidencia una necesidad de desarrollar estrategias de control más eficaces que complementen los métodos convencionales de higiene industrial.

La persistencia de *S. enterica* en productos avícolas, incluso tras el faenado y en condiciones de almacén controlado, plantea un riesgo creciente para la seguridad alimentaria, lo que ha impulsado la búsqueda de métodos de control más eficaces (**Betiku et al., 2025**). Aunque se emplean de forma rutinaria desinfectantes químicos y refrigeración, las cepas multirresistentes sobreviven en superficies de contacto y en los propios alimentos, reforzadas por la formación de biofilms que dificultan su eliminación (**Obe et al., 2021; Ohashi et al., 2022**). Asimismo, a pesar de las mejoras en los protocolos de limpieza y desinfección y de tecnologías emergentes (plasma frío, irradiación, recubrimientos antimicrobianos), sus resultados suelen ser inconsistentes y poco escalables (**Alvarado, 2024; Moutiq et al., 2020**). Además, variables como temperatura, humedad, tipo de superficie y materia orgánica reducen la eficacia de los métodos convencionales (**Ethèves et al., 2021**). Aunque los bacteriófagos se han propuesto como alternativa biológica contra *S. enterica*, la mayoría de los estudios emplea fagos individuales, cuya efectividad disminuye ante la variabilidad genética y fenotípica de las cepas en condiciones reales (**Mosimann et al., 2021; Sarrami et al., 2023**). Por ello, el enfoque actual se orienta

hacia el desarrollo de soluciones complementarias que sean más específicas, sostenibles y adaptables a los entornos reales de la industria avícola.

Frente a esta problemática y con base en los antecedentes revisados, esta investigación propone formular un cóctel de bacteriófagos líticos contra cepas de *S. enterica* pertenecientes al serovar predominante en el entorno avícola del Ecuador, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*) (Mejía et al., 2020). De acuerdo con las recomendaciones de nomenclatura establecidas por el CDC, un serovar de *Salmonella* debe escribirse inicialmente como *Salmonella* serotype (o ser.) seguido del nombre del serovar en mayúscula y sin cursivas, por ejemplo, *Salmonella* ser. Typhimurium, pudiendo abreviarse posteriormente como *S. Typhimurium* (F. W. Brenner et al., 2000). A diferencia de los fagos individuales, el cóctel amplía el espectro de acción y reduce la aparición de resistencias mediante sinergia viral. Se determinará la multiplicidad de infección (MOI) óptima y se evaluará la estabilidad de los fagos bajo condiciones de la industria avícola, buscando así una alternativa biotecnológica eficaz que complemente el control microbiológico convencional.

1.1.2. Bases conceptuales de la inocuidad avícola

1.1.2.1. Producción avícola y su importancia en seguridad alimentaria

La producción avícola se ha transformado en uno de los sectores estratégicos para la seguridad alimentaria, impulsada por un incremento sostenido en el consumo de carne de pollo durante la última década. Esta constituye la fuente de proteína animal de mayor crecimiento debido a su costo reducido, disponibilidad y eficiencia productiva (Grigore et al., 2025). Informes de organismos internacionales indican que la producción mundial de carne de pollo podría situarse en torno a los 146 millones de toneladas en 2024, y se proyecta un crecimiento continuo para los próximos años (FAO, 2023). Este incremento responde a la modernización de los sistemas avícolas, la integración de cadenas agroindustriales y la alta demanda asociadas a dietas urbanas. Sin embargo, esta expansión también ha incrementado la exposición del consumidor a peligros microbiológicos, especialmente a bacterias zoonóticas como *Salmonella*, cuando no se implementa controles adecuados (Fadipe et al., 2025; Zizza et al., 2024).

De esta manera, la inocuidad en la industria avícola deja de ser un concepto técnico y pasa a convertirse en un componente esencial de la salud pública. La contaminación microbiana puede ocurrir

en granjas, plantas de faenado, transporte y establecimientos de venta minoristas, por lo cual se hace necesario el fortalecimiento de las medidas de vigilancia en todas las etapas de la cadena de producción **(Bolohan et al., 2025)**. Estudios epidemiológicos advierten que las fallas en el control higiénico-sanitario en la producción intensiva facilita la persistencia de *Salmonella*, generando brotes recurrentes de enfermedades transmitidas por alimentos **(Fadipe et al., 2025)**. En este sentido, garantizar la inocuidad de la carne de pollo representa no solo un requisito regulatorio, sino un factor para la competitividad del sector y la protección del consumidor.

1.1.2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un desafío global y constituyen una de las principales causas de morbilidad gastrointestinal asociada al consumo de productos de origen animal. Entre los agentes más relevantes tenemos a *S. enterica* la cual ocupa una posición prioritaria debido a su amplia distribución zoonótica, su capacidad de persistencia en alimentos y su asociación con brotes en múltiples regiones **(Hagedoorn et al., 2023; Kumar et al., 2025)**. En humanos, los serovares no tifoideos de *Salmonella*, entre ellos *S. Infantis*, son responsables de gastroenteritis aguda, fiebre, dolor abdominal y en casos graves septicemia, especialmente en niños, adultos mayores e individuos con sistemas inmunocomprometidos **(Lamichhane et al., 2024)**.

Durante los últimos años, diversos estudios han documentado un aumento significativo en el aislamiento de *S. Infantis* en carne de pollo, convirtiéndose en un serovar de alta importancia en salud pública **(Mattock et al., 2024)**. Este incremento se debe a la combinación de su capacidad para colonizar aves de engorde, su persistencia en matrices cárnicas y su resistencia a múltiples antimicrobianos **(Georganas et al., 2024)**. La epidemiología sugiere que la diseminación de linajes clonales adaptados al ambiente avícola ha permitido a *S. Infantis* establecerse como un contaminante frecuente y un agente recurrente en brotes de ETAs **(Zizza et al., 2024)**. Esta tendencia confirma la necesidad de fortalecer los programas de control en toda la cadena productiva.

1.1.2.3. Contaminación microbiológica en el proceso de faenado

El proceso de faenado avícola constituye un punto crítico de control debido a la elevada probabilidad de contaminación cruzada entre aves, equipos y superficies. Aunque las plantas aplican sistemas de higiene basados en lavado, escaldado y desinfección química, estas medidas reducen, pero

no eliminan por completo a *Salmonella*, especialmente cuando están presentes condiciones que interfieren con la acción del desinfectante **(Carstens et al., 2024; Kataria & Morey, 2020)**. Estudios en plantas comerciales han documentado la presencia de *Salmonella* entre el 25% y el 32% en etapas como evisceración, lavado final y enfriamiento, aun cuando se utilizan concentraciones adecuadas de cloro **(A. S. Khan et al., 2021; Thames et al., 2022)**.

Entre algunas de las razones de esta persistencia se relacionan con factores como la presencia de materia orgánica que consume el cloro disponible, la microestructura de la piel de pollo ofrece nichos de protección para las bacterias y la formación de biofilms en superficies de acero inoxidable y equipos de procesamiento **(Kataria & Morey, 2020)**. **Obe et al. (2023)** señala que las cepas de *S. Infantis* pueden detectarse en diferentes puntos de la planta durante varias semanas, lo que sugiere la existencia de reservorios crónicos difíciles de eliminar mediante métodos convencionales. Este comportamiento evidencia limitaciones en la eficacia de la desinfección química y subraya la necesidad de estrategias complementarias.

1.1.2.4. Riesgos asociados a cepas multirresistentes en carne de pollo

Un aspecto crítico en la inocuidad avícola es la emergencia de cepas multirresistentes (MDR) de *S. Infantis*, impulsadas por el uso de antibióticos por muchos años. Estudios recientes muestran que varios linajes de este serovar portan megaplasmidos tipo *pESI-like* que incorporan genes de resistencia a betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y sulfonamidas **(Mattock et al., 2024; Obe et al., 2024)**. Esta estructura genética también puede incluir tolerancia a desinfectantes, mayor capacidad de adhesión y formación de biopelículas, y efectos sobre la estabilidad bacteriana en ambientes refrigerados **(Bezek et al., 2023; J. L. Da Silva et al., 2022)**.

La presencia de *Salmonella* multirresistente en carne de pollo implica una serie de riesgos: incremento de la persistencia en superficies y equipos de procesamiento, mayor tolerancia a cloro y agentes oxidantes **(Obe et al., 2024)**. Esto refleja un potencial de transmisión en consumidores, donde estas cepas pueden causar infecciones de difícil tratamiento. Además, se ha observado que las cepas MDR muestran una notable habilidad para sobrevivir en temperaturas cercanas a los 4 °C durante períodos prolongados, lo que disminuye la eficacia de almacenamiento en frío como mecanismo de control **(J. L. Da Silva et al., 2022)**. Estos elementos justifican la necesidad de innovaciones biotecnológicas que permitan un control de *Salmonella* de manera más dirigida, sostenible y eficaz.

1.1.3. *Salmonella enterica* serovar Infantis: relevancia biológica y sanitaria

1.1.3.1. Características microbiológicas y factores de virulencia

S. Infantis es un patógeno emergente dentro del grupo de los serovares no tifoideos, el cual se caracteriza por su elevada adaptabilidad ambiental, su capacidad de colonización en aves de engorde y su eficacia para persistir en matrices avícola (**Georganas et al., 2024**). Al pertenecer al linaje *enterica* comparte propiedades clásicas de dicho género, como es el metabolismo anaerobio facultativo, la capacidad de invadir epitelios intestinales y el uso de sistemas de secreción tipo III (T3SS) para translocar proteínas efectoras a las células hospedadoras (**Lamichhane et al., 2024**). Sin embargo, *S. Infantis* presenta particularidades relevantes que explican su expansión a nivel global, entre ellas la adquisición de megaplasmidos *pESI-like* que incrementa la virulencia, su resistencia antimicrobiana y la tolerancia al estrés ambiental (**García-Soto et al., 2020**).

En los últimos años se ha descrito que las proteínas asociadas a las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 continúan siendo esenciales para la invasión intestinal y la supervivencia intracelular, pero estudios recientes sugieren que algunos linajes de *S. Infantis* expresan niveles más altos de reguladores clave como *HilA*, *InvF* y *SSrB*, lo que produce un incremento en la capacidad colonizadora y un amplio potencial en la diseminación en ambientes avícolas (**Han et al., 2024; Jones, 2005**). Este nivel de eficiencia invasiva explica por qué *S. Infantis* logra establecerse como flora persistente en las granjas y en los sistemas de producción avícola, convirtiéndose en un contaminante recurrente a lo largo de la cadena productiva.

1.1.3.2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana y multirresistencia

Uno de los rasgos preocupantes de *S. Infantis* en la última década ha sido la expansión de los linajes multirresistentes, impulsado por la circulación de megaplasmidos. Estos elementos genéticos pueden alcanzar tamaños superiores a 280 kbp y portan múltiples resistencias, incluyendo genes como *bla_{TEM}*, *qnrB*, *tetA*, *atadA*, además de integrones clase 1 que facilitan la adquisición adicional de cassettes de resistencia (**Franco et al., 2015; M. B. Kim et al., 2024**). La presencia de estos plásmidos le otorga a *S. Infantis* un fenotipo MDR altamente estable, lo cual ha sido documentado en estudios realizados en Europa, Asia y América Latina, mostrando una preocupante homogeneidad genética entre cepas de aves, alimentos y humanos (**Georganas et al., 2024**).

Más aún, algunas investigaciones indican que los linajes pueden presentar mecanismos combinados de resistencia basados en bombas de eflujo (AcrAB-TolC), mutaciones en genes diana como *gyrA* y *parC*, y una mayor tolerancia a desinfectantes oxidantes. Esta combinación les permite soportar condiciones subletales de cloro, peróxidos y compuestos de amonio cuaternario **(Nagpala et al., 2025; Tekin et al., 2025)**. En consecuencia, las cepas MDR de *S. Infantis* poseen mayor probabilidad de sobrevivir en entornos industriales, superficies y equipos, incluso después de haber pasado por procedimientos estándar de desinfección. Este comportamiento de *S. Infantis* lo convierte en un patógeno de difícil manejo en lo que a la industria avícola se refiere y refuerza la necesidad de hacer uso de estrategias alternativas o complementarias.

1.1.3.3. Epidemiología internacional, regional y ecuatoriana

En el ámbito internacional, *S. Infantis* ha sido catalogado como uno de los serovares emergentes de mayor preocupación por Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y los Centros para el control de Enfermedades (CDC-Estados Unidos), debido a su creciente frecuencia en brotes de salmonelosis asociados a productos avícolas. Entre 2018 y 2024, múltiples reportes han documentado incrementos en la prevalencia de *Salmonella* en Japón, Israel, Italia, España y países de Sudamérica, donde el consumo de carne de pollo es elevado **(Georganas et al., 2024; Montoro-Dasi et al., 2023)**.

En América Latina, estudios en Brasil, Colombia, Perú, Chile y Argentina han reportado que *S. Infantis* supera a serovares históricamente predominantes como Enteritidis y Typhimurium en granjas de engorde y plantas de faenado **(Guerrero et al., 2022)**. Estas investigaciones confirman la circulación de linajes *pESI-like*, lo que sugiere una diseminación entre países impulsada por el comercio, intercambio de insumos avícolas y falta de programas de control serovar-específicos **(Guzinski et al., 2024)**.

La presencia de *S. Infantis* en la industria avícola ecuatoriana ha sido confirmada por estudios recientes. Por ejemplo, un análisis genómico realizado sobre muestras provenientes de granjas avícolas, canales de pollo y muestras humanas reportó una prevalencia en aves; 41,4 % en granjas y 55,5 % en canales de pollo, mientras que en humanos la prevalencia fue menor con un 1,98 %, identificando que *S. Infantis* fue el serovar predominante y que todas las cepas secuenciadas pertenecían al linaje ST32, portando un megaplasmidio *pESI-like* con genes de resistencia, virulencia y tolerancia al estrés ambiental **(Mejía et al., 2020)**. Este hallazgo es particularmente relevante puesto que evidencia la

circulación de clones multirresistentes de *S. Infantis* en diferentes partes de la cadena avícola en Ecuador, reforzando el papel como una zoonosis emergente en el país.

1.1.4. Métodos de control microbiológico en la industria avícola

1.1.4.1. Métodos convencionales: cloro, ácidos orgánicos, frío

Las estrategias tradicionales de control microbiológico en la industria avícola se fundamentan en el uso de desinfectantes químicos especialmente compuestos clorados, la aplicación de ácidos orgánicos y el almacenamiento en frío como medidas complementarias. El cloro, en forma de hipoclorito de sodio, ha sido históricamente el desinfectante más empleado debido su bajo costo, disponibilidad y capacidad de actuar frente a un amplio espectro microbiano (**Thames & Sukumaran, 2020**). Sin embargo, a través del tiempo su eficacia se ha reducido significativamente en presencia de materia orgánica, un elemento común en etapas como el escaldado y la evisceración del pollo, lo que disminuye el cloro disponible y permite la supervivencia de serovares como *S. Infantis* (**Byun et al., 2021**). Además, se han documentado que algunas cepas presentan tolerancia fisiológica transitoria a concentraciones subletales, lo que limita la efectividad de este método cuando las condiciones de higiene no son óptimas (**Obe et al., 2024**).

Por otro lado, los ácidos orgánicos como el ácido peracético, ácido láctico y ácido acético han cobrado relevancia en la última década como alternativas menos dependientes de materia orgánica. Estudios en líneas de procesamiento comercial han demostrado reducciones moderadas de *Salmonella* en superficies y canales tratados con estos ácidos. Aunque su eficacia depende de variables como el pH, temperatura y tiempo de exposición (**Bai et al., 2022; Obe et al., 2024**). A pesar de los beneficios, su uso intensivo puede afectar características sensoriales del producto, limitando de esta forma su aplicación comercial en algunos mercados.

Finalmente, la refrigeración a 4 °C constituye uno de los pilares de la inocuidad alimentaria postfaenado, ya que limita la multiplicidad bacteriana. No obstante, diversos estudios han demostrado que *S. Infantis* presenta una sorprendente capacidad de sobrevivir en condiciones de frío prologado, manteniendo su viabilidad durante varios días o semanas (**J. L. Da Silva et al., 2022**). En consecuencia, el frío preserva la carne, pero no garantiza la eliminación de patógenos, lo que resalta la necesidad de utilizar o adicionar otros métodos de control.

1.1.4.2. Tecnologías emergentes en desinfección

Durante los últimos años, se han desarrollado tecnologías emergentes orientadas a mejorar la eliminación de *Salmonella* en matrices avícolas, especialmente aquellas dirigidas a superar las limitaciones del cloro. Entre estas innovaciones destacan el plasma frío, la irradiación UV-C, el agua electrolizada, los sistemas de microburbujas y antimicrobianas de origen natural (**Jin & Adhikari, 2025**). El plasma frío, por ejemplo, ha demostrado ser eficaz en la reducción de cargas bacterianas en superficies de pollo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno capaces de desestructurar membranas bacterianas (**Moutiq et al., 2020**). A pesar de su eficacia, su implementación suele limitarse por costos de instalación y la necesidad de equipos especializados.

Otra tecnología de interés es el agua electrolizada, la cual genera ácido hipocloroso y radicales libres con una capacidad antimicrobiana superior al cloro convencional y menor impacto ambiental (**Ramírez & Cano-Buendía, 2020**). Ensayos recientes han mostrado reducciones significativas en *Salmonella* sin comprometer la calidad del producto. Asimismo, los tratamientos con UV-C y ozono han demostrado ser efectivos en superficies de contacto, aunque su penetración es limitada en matrices con alta carga orgánica (**Jin & Adhikari, 2025; S.-W. Yi et al., 2022**). Si bien estas tecnologías representan avances importantes, todavía enfrentan barreras relacionadas con su escalabilidad, costos operativos, variabilidad en condiciones de faenado y aceptación regulatoria. Esto ha impulsado la búsqueda de alternativas biológicas capaces de integrarse de manera complementaria con los métodos existentes.

1.1.4.3. Limitaciones de las metodologías actuales

A pesar de los avances tecnológicos, la evidencia científica muestra que ningún método convencional garantiza la eliminación total de *S. Infantis*, especialmente de cepas multirresistentes y altamente adaptadas al ambiente avícola. Uno de los principales problemas es la formación de biofilms, en los cuales las bacterias quedan protegidas por matrices extracelulares que reducen la penetración de desinfectantes (**Sevilla-Navarro et al., 2024**). Investigaciones recientes han demostrado que *S. Infantis* exhibe una marcada capacidad de formar biopelículas en acero inoxidable, plástico y goma, materiales ampliamente presentes en líneas de proceso lo que permite su persistencia aun después de la desinfección (**Bezek et al., 2023**).

A todo esto, se suma la creciente evidencia de la tolerancia al cloro, donde estos linajes MDR sobreviven a concentraciones que teóricamente deberían inactivarlos. Así mismo, muchas prácticas de desinfección se aplican en condiciones que no reflejan la complejidad del entorno real; variabilidad del pH, temperaturas fluctuantes, presencia constante de grasa y proteína, y tiempos de contacto inferiores a los recomendados (**Obe et al., 2024; Weerasooriya et al., 2024**). Esta brecha entre condiciones ideales y condiciones industriales limita la efectividad de los métodos tradicionales. Finalmente, las estrategias químicas presentan el riesgo de favorecer la selección de cepas más resistentes y los antimicrobianos pueden generar efectos colaterales sobre la calidad del producto (**Laranja et al., 2021**). Debido a esta serie de limitaciones estructurales, se reconoce la necesidad de contar con enfoques complementarios que actúen con mayor especificidad y eficacia frente a serovares persistentes.

1.1.4.4. Necesidad de alternativas biotecnológicas complementarias

El perfil epidemiológico de *S. Infantis*, su capacidad de persistencia y la expansión de linajes MDR han impulsado una transición en la investigación hacia el desarrollo de alternativas biológicas, especialmente aquellas basadas en bacteriófagos líticos. A diferencia de los desinfectantes químicos, los fagos poseen especificidad hacia su huésped bacteriano y pueden actuar incluso en microambientes difíciles de alcanzar por agentes químicos, entre ellos los biofilms o nichos protegidos en la piel de pollo, esto debido a su capacidad de replicación in situ (**Pelyuntha & Vongkamjan, 2023**).

Además, los fagos no dejan residuos químicos, no afectan las características sensoriales del alimento, pueden combinarse con métodos tradicionales sin generar incompatibilidades y presentan un perfil regulatorio favorable en comparación con otros biocontroladores (**Hyla et al., 2022**). Diversos estudios han demostrado que los cócteles fágicos muestran eficacia notable en la reducción de *Salmonella* en carne de pollo, en superficies de contacto y en condiciones de almacenamiento (**Gvaladze et al., 2024**). Estos hallazgos sugieren que el uso de fagos podría constituir un enfoque sostenible y adaptado a las necesidades actuales de la industria avícola.

Debido a esto, el control de *S. Infantis* debe abordarse desde un enfoque basado en la aplicación de varias barreras de control, integrando métodos químicos, físicos y biológicos. En este contexto, los bacteriófagos emergen como una herramienta esencial para complementar la desinfección tradicional, especialmente frente a serovares multirresistentes y capaces de persistir en ambientes industriales.

1.1.5. Fundamento biológico de los bacteriófagos líticos

1.1.5.1. Naturaleza, ciclo lítico, lisogénico y especificidad huésped-fago

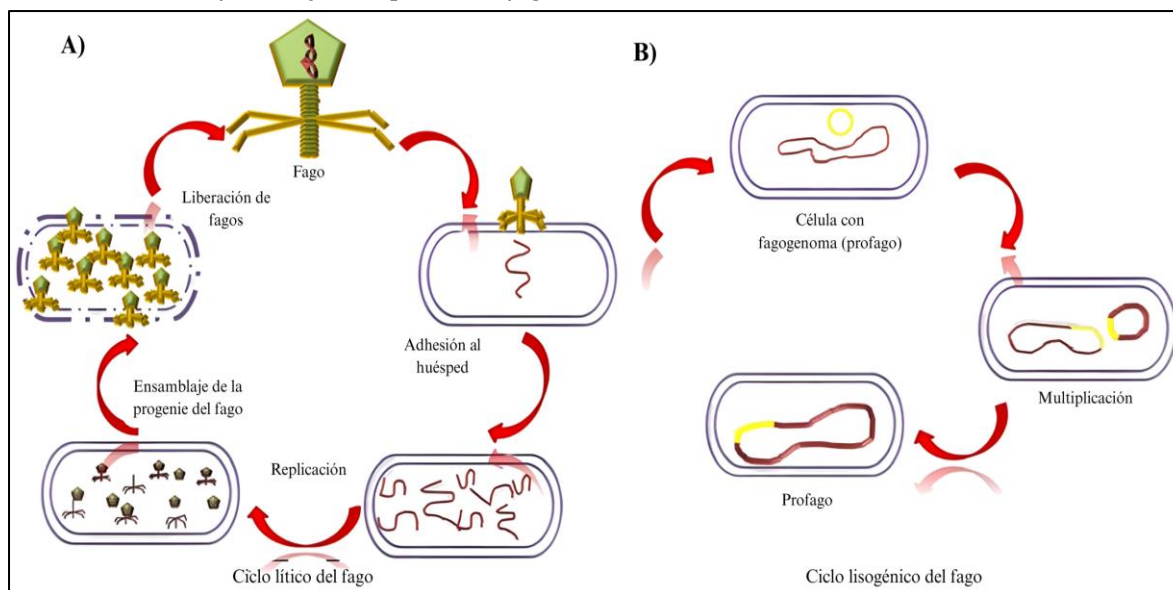
Los bacteriófagos, comúnmente denominados fagos, son virus que infectan exclusivamente bacterias y llegan a constituir la entidad biológica más abundante del planeta con estimado de 10^{31} partículas virales distribuidas prácticamente en todos los ecosistemas (**Mushegian, 2020**). Su alta diversidad genética y funcional les permite desempeñar un papel fundamental en la regulación de comunidades microbianas, la presión selectiva sobre patógenos y la transferencia horizontal de genes (**Naureen et al., 2020**). En el contexto de seguridad alimentaria y biocontrol, los fagos adquieren relevancia debido a su capacidad de atacar específicamente a bacterias patógenas, incluyendo serovares de *Salmonella* de importancia avícola.

Desde el punto de vista biológico, los fagos pueden presentar dos estrategias de replicación; el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. El ciclo lítico es el mecanismo deseable para aplicaciones alimentarias, ya que implica la destrucción completa de la célula bacteriana. En este ciclo, el fago se adhiere a receptores específicos de la superficie bacteriana como lipopolisacáridos (LPS), porinas o estructuras fimbriales, inyecta su genoma y secuestra maquinaria metabólica del hospedero para producir nuevas partículas virales. Una vez completada la síntesis y el ensamblaje, las endolisinas y holinas fágicas degradan la pared celular, provocando la lisis y liberación de decenas o cientos de nuevos virus capaces de reiniciar el proceso infeccioso tal como se describe en la **Figura 1** (**Rogovski et al., 2021; Tung et al., 2025**). Este tipo de mecanismo es clave para su eficacia como agentes antimicrobianos, ya que permite la amplificación directa del biocontrol en presencia de la bacteria diana.

En contraste, el ciclo lisogénico es usado por fagos los cuales integran su ADN en el cromosoma bacteriano, permaneciendo en estado de profago y replicándose pasivamente con la célula infectada como se puede observar en la **Figura 1**. Aunque este proceso es relevante para la evolución microbiana, resulta indeseable en aplicaciones que tengan relación con la inocuidad alimentaria, debido a que los profagos pueden movilizar genes asociados a la resistencia a antimicrobianos, virulencia o adaptación ambiental (**Gummalla et al., 2023; Tung et al., 2025**).

Figura 1

Mecanismos de infección y multiplicación fágica



Nota. La figura muestra el ciclo lítico (A), donde los fagos se replican rápidamente sin integrarse al ADN bacteriano y provocan la lisis para liberar nuevas partículas virales. Ciclo lisogénico (B), en el que el genoma del fago se integra como profago, se replica junto con la célula y puede contribuir a la transferencia de genes bacterianos, razón por la cual estos fagos no se emplean en terapia. Adaptado de **Ranveer et al. (2024)**.

Por esta razón, los programas de biocontrol en alimentos, incluyendo recomendados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y EFSA exigen el uso exclusivo de fagos estrictamente líticos, libres de determinantes lisogénicos como *int*, *xis*, *cl*, *cil* y otros reguladores del ciclo temperado (**Hyla et al., 2022; Kuźmińska-Bajor et al., 2021**).

Un rasgo fundamental para el uso de fagos es su especificidad huésped-virus, que determina la compatibilidad molecular entre las estructuras de reconocimiento del fago (generalmente las fibras de la cola) y los receptores bacterianos, esta especificidad puede abarcar desde cepas individuales hasta varios serovares relacionados, dependiendo de la estructura del fago (**Taslem et al., 2022**). En el caso de *Salmonella* existen fagos con rango estrecho, afinidad exclusiva por un serovar y fagos de rango intermedio capaces de infectar varios serovares de importancia zoonótica (**Fong et al., 2021; Guzel et al., 2024**). Esta característica ofrece una ventaja significativa en aplicaciones avícolas, ya que permite dirigir el tratamiento específicamente contra *S. Infantis* sin alterar la microbiota acompañante o comprometer la calidad del alimento.

1.1.5.2. Parámetros críticos: adsorción, periodo latente, *burst size*

El desempeño de un bacteriófago como herramienta de biocontrol depende de un conjunto de parámetros cinéticos que determinan su velocidad y eficacia de infección. Entre estos destacan tres factores fundamentales; la tasa de adsorción, el periodo latente y el *burst size*, los cuales permiten comprender el potencial del fago para reducir poblaciones bacterianas, en superficies de acero inoxidable, piel de pollo o matrices con una alta carga orgánica (Hyman & Abedon, 2010; Li et al., 2020). Estos parámetros no solo describen la dinámica molecular de la infección, sino que también guían la selección de fagos adecuados para la formulación de cócteles altamente eficaces frente a *Salmonella*.

La adsorción constituye la primera etapa del ciclo lítico e implica el reconocimiento específico entre proteínas de la cola del fago y receptores en la superficie bacteriana. La rapidez de adsorción determina qué tan velozmente un fago puede iniciar la infección y competir con otros microorganismos presentes en el ambiente (Esmael et al., 2021). Estudios han demostrado que los fagos dirigidos contra *Salmonella* presentan tasas de adsorción elevadas incluso en condiciones de estrés, lo que sugiere afinidad robusta hacia receptores como LPS y proteínas de membrana externa (Jeon & Ahn, 2021). Una adsorción eficiente es esencial en matrices avícolas donde la competencia con biofilms y residuos orgánicos puede obstaculizar el contacto directo entre fago y bacteria.

El periodo latente se refiere al tiempo comprendido entre la infección inicial y la liberación de nuevos viriones tras la lisis celular. En términos de biocontrol, periodos latentes cortos permiten una rápida amplificación viral dentro de la población bacteriana, lo que acelera la reducción de la carga microbiana (Hussein et al., 2025). Investigaciones en fagos líticos para *Salmonella* han reportado periodos latentes que oscilan entre 10 y 30 minutos, tiempos significativamente más rápidos que los observados en muchos fagos ambientales no especializados (S. Cao et al., 2022; Y. Yi et al., 2021). Este tipo de característica es especialmente relevante ya que durante el procesamiento avícola los tratamientos antimicrobianos deben actuar en ventanas temporales reducidas para evitar la recontaminación.

En última instancia tenemos el *burst size* (tamaño de explosión viral), este indica el número de nuevos viriones producidos por cada célula bacteriana infectada. En aplicaciones industriales, este parámetro elevado es deseable debido a que incrementa exponencialmente la cantidad de fagos disponibles para continuar la infección (Kannoly et al., 2023). Fagos dirigidos suelen exigir *burst sizes*

de entre 80 a 300 partículas por célula, lo que se asocia a una rápida diseminación viral y amplificación dentro del alimento o superficies tratada (Y. Yi et al., 2021). Este tipo de comportamientos permite que el biocontrol no dependa únicamente de la dosis inicial de fago, sino también de su capacidad intrínseca de multiplicación en presencia de la bacteria.

1.1.5.3. Innovación biotecnológica: diseño de cócteles de bacteriófagos

El uso de cócteles de bacteriófagos líticos representa una alternativa innovadora y altamente efectiva para la eliminación de *S. Infantis* en el pollo faenado. Según Almutairi et al. (2022) los bacteriófagos son virus que infectan y destruyen bacterias específicas tales como *S. Infantis*, lo que permite un control dirigido del patógeno sin afectar otras bacterias presentes. Al aplicar un cóctel con diferentes tipos de bacteriófagos, es posible cubrir un espectro más amplio de cepas de *S. Infantis*, aumentando así la eficacia del tratamiento.

Además, posee beneficios adicionales en comparación con los métodos químicos tradicionales, ya que no genera residuos, no representa un riesgo para la salud humana y puede aplicarse en distintas etapas del procesamiento, desde la desinfección de las aves hasta el tratamiento de la carne procesada (Pelyuntha & Vongkamjan, 2023). De esta manera, se consolida como una solución eficaz, segura y sostenible para reducir significativamente la presencia de *S. Infantis* en el pollo faenado, aportando a la mejora de la seguridad alimentaria y la salud pública (Shahdadi et al., 2023).

1.1.5.4. Sinergia lítica en cócteles de bacteriófagos

La sinergia lítica de fagos describe el efecto potenciado que ocurre cuando dos o más bacteriófagos, aplicados en forma de cóctel, ejercen una actividad bactericida superior a la que lograrían individualmente. Este fenómeno se debe a que los fagos pueden reconocer receptores distintos en la superficie bacteriana, presentar diferentes tasas de adsorción y replicación, o actuar en conjunto sobre biopelículas. De esta manera, la acción combinada no solo amplía el espectro de eliminación de cepas heterogéneas, sino que también reduce la probabilidad de aparición de mutantes resistentes, ya que una bacteria tendría que acumular múltiples mutaciones simultáneamente para evadir a todos los fagos presentes (Molina et al., 2022).

A nivel funcional, la sinergia lítica se manifiesta en distintos mecanismos, un fago puede debilitar la matriz extracelular de la biopelícula, facilitando la penetración de otro, o bien diferentes fagos pueden atacar subpoblaciones bacterianas con variaciones genéticas. Asimismo, cuando se combina la terapia fágica con antibióticos, se potencia la permeabilidad de la pared celular y se incrementa la eficacia antimicrobiana a bajas concentraciones, lo que disminuye la presión selectiva de resistencia (**H. Lu et al., 2023; Rastegar et al., 2024**). Estas evidencias consolidan a la sinergia lítica como un principio central en el diseño racional de cócteles de fagos, con aplicaciones tanto en biocontrol de alimentos como en terapias contra infecciones multirresistentes (**M. K. Kim et al., 2024**).

1.1.5.5. Factores fisicoquímicos y biológicos determinantes en la estabilidad funcional

La eficacia de un cóctel de fagos depende en gran medida de su estabilidad frente a condiciones fisicoquímicas del entorno donde serán aplicados. La tolerancia al pH es una propiedad altamente específica (**M. A. S. Khan et al., 2024**). En cuanto a la temperatura, es un factor con una variación significativa de un fago a otro. Mientras que algunos mantienen viabilidad desde 70-80 °C otros aislados de la misma fuente son estables en temperaturas entre 28-60 °C, lo que demuestra que la resistencia térmica debe ser evaluada caso por caso (**Luo et al., 2025**). Por otro lado, la matriz alimentaria afecta notablemente la adsorción del fago; por ejemplo, en huevo líquido, la eficacia fue mayor en clara que en yema, lo que sugiere que la viscosidad y el contenido proteico influyen en el contacto fago-bacteria (**He et al., 2024**). Este tipo de observaciones indica que es esencial validar la formulación en la matriz objetivo, ya sea leche, carne, huevo o superficies, ya que la interacción con los componentes del alimento puede alterar el efecto terapéutico (**Sezer & Boyaci, 2024**).

En el plano biológico, factores como el receptor bacteriano, el diseño del cóctel y la multiplicidad de infección (MOI) son determinantes para la eficacia y la prevención de resistencia. Se ha demostrado que la combinación de fagos que reconocen diferentes receptores bacterianos, como LPS o flagelos, permite retrasar la aparición de mutantes resistentes y aumentar la cobertura frente a cepas diversas (**S. Kim et al., 2024**). Asimismo, el uso de estrategias basadas en sensibilidad colateral ha mejorado el diseño de cócteles racionales, que además de reducir la población bacteriana también controlan su evolución adaptativa (**Acton et al., 2024**).

Las combinaciones sinérgicas también han mostrado ventajas; por ejemplo, un cóctel de tres fagos logró inactivar completamente *Salmonella* en leche cruda, donde los fagos individuales fueron solo parcialmente efectivos (**Sallami et al., 2024**). Finalmente, ensayos in vivo en pollos revelaron que

la administración profiláctica de fagos redujo la colonización durante varios días, aunque el efecto desapareció al suspender el tratamiento, destacando la importancia de la dosis, la frecuencia y el nicho ecológico (Agapé et al., 2025).

1.1.5.6. Seguridad, regulación y uso en alimentos

La aplicación de bacteriófagos en alimentos ha sido evaluada ampliamente desde la perspectiva de seguridad, y la evidencia científica reciente coincide en que los fagos líticos son seguros para el consumo humano, ya que no infectan células eucariotas no generan residuos químicos en el producto final (Georganas et al., 2024; Imran et al., 2023). Además, al tratarse de entidades presentes de forma natural en el intestino, agua y alimentos, su incorporación en matrices avícolas no representa un riesgo toxicológico ni microbiológico.

En cuanto a regulación, agencias como la FDA, EFSA y Health Canadá requieren que los fagos sean estrictamente líticos, carezcan de genes asociados a lisogenia, resistencia antimicrobiana o factores de virulencia, y que su genoma este completamente secuenciado antes de su aprobación para uso comercial. Este enfoque preventivo garantiza que la aplicación de fagos no contribuya a la transferencia horizontal de genes ni interfiera con otros procesos del sistema de inocuidad alimentaria (Braz et al., 2025; Dhulipalla et al., 2025). Así mismo, se exige demostrar estabilidad en condiciones de almacenamiento y compatibilidad con prácticas de procesamiento como refrigeración, lavado y empaquetado.

Su aceptación poco a poco en el sector alimentario se debe gracias a estudios que demuestran que los fagos no alteran las características sensoriales del pollo, textura, color, olor o retención de humedad después del tratamiento (Endersen & Coffey, 2020). Así mismo, se ha demostrado que pueden combinarse con desinfectantes en concentraciones reducidas sin generar interacciones negativas, lo cual permite disminuir la dependencia del cloro y reducir el riesgo de formación de subproductos tóxicos como los trihalometanos (Cristobal-Cueto et al., 2021; Pelyuntha & Vongkamjan, 2023). Estas ventajas han impulsado su incorporación como complemento en sistemas para el control de *Salmonella* en la cadena avícola.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar cócteles de bacteriófagos con sinergia lítica y estabilidad funcional para el control de *S. enterica* serovar Infantis de origen avícola ecuatoriano.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la capacidad lítica de bacteriófagos individuales frente a cepas multirresistentes de *S. Infantis* mediante ensayos fenotípicos.
- Determinar la estabilidad biológica de los fagos seleccionados frente a condiciones de refrigeración y exposición a cloro.
- Identificar combinaciones de bacteriófagos con capacidad lítica complementaria y estabilidad funcional en condiciones simuladas para su evaluación posterior en pruebas de eficacia.

CAPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

Este trabajo de titulación fue de tipo experimental y se ejecutó en los laboratorios de investigación la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. La **Tabla 1** detalla los equipos, materiales, reactivos y herramientas informáticas empleados durante el desarrollo del estudio.

Tabla 1

Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados

REACTIVOS	CANTIDAD
Agar Müller Hilton	150 g
Agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato)	60 g
Caldo de Soja Tripticaseína (TSB)	120 g
Extracto de levadura	50 g
Extracto de carne	90 g
Luria Bertani (LB)	90 g
Agua peptonada	50 g
Carbonato sódico (Na_2CO_3)	10 g
Cloruro de magnesio (MgCl_2)	2 mL
Cloruro de calcio (CaCl_2)	2 mL
Agar - Agar	60 g
Hipoclorito de sodio 10%	2 mL
Buffer fosfato salino (PBS) 1x	500 mL
Agua destilada	10 L
Agua estéril	50 mL
Etanol al 70%	100 mL
Ciprofloxacina (5 μg)	1 cartucho (50 discos)
Meropenem (10 μg)	1 cartucho
Fosfomicina (200 μg)	1 cartucho
Tazobactam (110 μg)	1 cartucho

Tabla 1*Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados*

REACTIVOS	CANTIDAD
Ampicilina (10 µg)	1 cartucho
Cefuroxima (30 µg)	1 cartucho
Amikacina (10 µg)	1 cartucho
Sulfametoxazol (25 µg)	1 cartucho
Nitrofurantoína (300 µg)	1 cartucho
Ertapenem (10 µg)	1 cartucho
Gentamicina (10 µg)	1 cartucho
Cefotaxima (30 µg)	1 cartucho
Amoxicilina (30 µg)	1 cartucho
Ceftriaxona (30 µg)	1 cartucho
Cefepima (30 µg)	1 cartucho
Cefurozima (30 µg)	1 cartucho
Aztreonam (30 µg)	1 cartucho
Ceftazidima (30 µg)	1 cartucho
MATERIAL FUNGIBLE	CANTIDAD
Botellas de autoclave (100 – 500 mL)	5
Espátula	1
Asa de siembra	2
Cajas Petri plásticas	500
Pipeta de vidrio (10 mL)	2
Pinzas metálicas	1
Pera de succión	1
Gradillas	3
Puntas para micropipetas	200 de cada tipo
Cajas de puntas	2 de cada tipo
Tubos de ensayo con tapa	30
Filtros Syringe Filters de 0.22 µm	100
Jeringas de 3mL	100
Eppendorfs de 1.5 mL	100
Parafilm	1
Guantes de nitrilo	4 cajas

Tabla 1*Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados*

MATERIAL FUNGIBLE	CANTIDAD
Rotulador doble punta	2
Mascarillas	2 cajas
Cofias	2
Papel film	1
Papel aluminio	1
Papel industrial	2
Cinta adhesiva de papel	1
Tijera	1

EQUIPOS	CANTIDAD
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Microondas	1
Mechero Bunsen	2
Juego de micropipetas	1
Refrigeradora (4 °C)	1
Incubadora	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad II	1
Vórtex	1
Microcentrífuga	1
Baño termostático	1
Computadora	2

Nota. Todos los equipos empleados fueron facilitados por el Laboratorio de Investigación de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE).

2.2 Métodos

2.2.1. Evaluación de la capacidad lítica de bacteriófagos individuales frente a cepas multirresistentes de *S. Infantis* mediante ensayos fenotípicos.

2.2.1.1. Selección de las cepas de *S. Infantis* con perfiles de resistencia múltiple

Las cepas de *S. Infantis* empleadas en este estudio fueron obtenidas a partir del banco de UTA RAM One Health. Para la ejecución del análisis de los perfiles de resistencia se empleó el método descrito Kirby-Bauer. Cada una de las cepas fue sembrada por estría escocesa en agar XLD. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. De las placas con crecimiento se tomaron varias colonias y se inocularon en tubos con 5 mL de caldo TSB para la generación de biomasa. Los tubos se incubaron a 37°C entre 45-60 minutos, o hasta que alcanzaron la turbidez óptica de 5 en la escala McFarland.

Se realizaron siembras por dispersión de la biomasa líquida generada con anterioridad (tubos) en placas de agar Müller-Hinton utilizando un hisopo estéril por cada una, con el fin de generar una capa de bacterias uniforme. Se dejaron secar por 1-2 minutos y se colocaron los discos de antibiótico seleccionados previamente con la ayuda de una pinza estéril. Las placas se incubaron a 37°C de 12 a 18 horas.

La medición de los halos de inhibición se realizó en milímetros (mm), medidas que fueron empleadas para la clasificación de las bacterias evaluadas como sensibles (S), intermedias (I), o resistentes (R) siguiendo CLSI M100-ED35:2025 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35th Edition disponible en el portal CLSI Micro Free (**Clinical and Laboratory Standards Institute, 2025**).

2.2.1.2. Preparación de suspensiones bacterianas y fágicas para la prueba de la gota.

Se prepararon tubos de ensayo con 5 mL de caldo TSB inoculados con una bacteria hospedadora sensible. La cual fue incubada de 3 a 4 horas a 37° C con el fin de generar un ambiente de biomasa propicio para el crecimiento y desarrollo de los bacteriófagos.

Se tomaron suspensiones fágicas criopreservadas a partir del banco de UTA RAM One Health cuyos perfiles de lisis demuestran infectar *Salmonella* efectivamente. Las suspensiones se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos con el fin de sedimentar la biomasa bacteriana. De los tubos se tomó el sobrenadante resultante y se filtró a través de membranas de 0,22 µm. Cada filtrado fue colocado en los tubos con biomasa generada con anterioridad. La mezcla del bacteriófago con la bacteria hospedadora será incubada a 37° C de 12 a 14 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomó 1 mL de la solución fago-bacteria y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos con el fin de precipitar las bacterias. El sobrenadante, donde se encuentran los fagos fue tomado y filtrado a través de una membrana de 0.22 µm. Las soluciones de cada fago fueron almacenadas a 4° C hasta su uso.

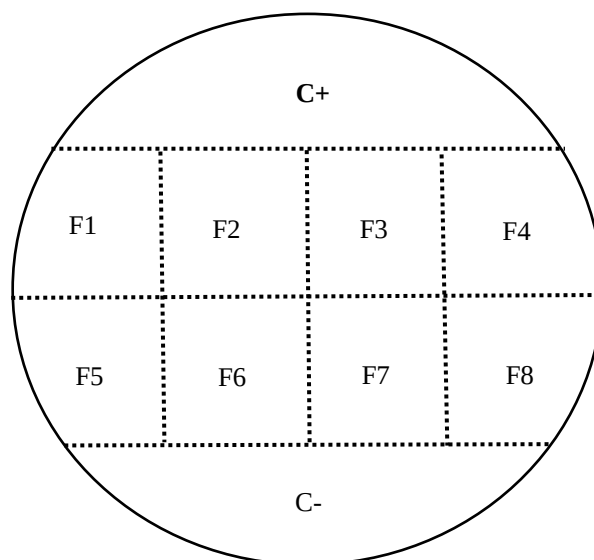
También se prepararon tubos de ensayo con 5 mL de caldo TSB, los cuales fueron etiquetados e inoculados con cada una de las bacterias seleccionadas previamente en base a su perfil de resistencia. Los tubos inoculados con la bacteria fueron incubados a 37° C por una hora.

2.2.1.2. Prueba de la gota (spot test)

Para la ejecución de la prueba de la gota modificada según **Paranos et al. (2024)** se emplearon placas Petri con agar Müller-Hinton. Cada placa, previamente sembrada por dispersión uniforme de la biomasa bacteriana (como se describe en el apartado 6.1.1), se dividió en cuadrantes marcados en la base de la placa representados en el diagrama de la **Figura 1**. En cada sección se depositaron 2 µL de la suspensión fágica, previamente filtrada (membrana 0,22 µm). Tras dejar absorber la gota durante 10 minutos a temperatura ambiente, las placas se incubaron invertidas a 37 °C durante 18-20 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron halos de lisogénesis alrededor de cada punto de inoculación, los cuales indican la eficacia lítica de cada fago frente a la cepa testada.

Figura 2

Diagrama de la prueba de la gota



2.2.1.4. Tabulación e interpretación de los resultados de la prueba de la gota.

Los diámetros de los halos de lisogénesis se midieron en milímetros con regla Vernier y se registraron en la bitácora de trabajo. Para posteriormente ser digitalizados y colocados en una hoja de cálculo en Microsoft Excel. Con base en criterios visuales de capacidad lítica, se clasificó cada interacción como la presencia/ausencia de calvas y según su turbidez: claras (1), semi claras (0) o sin lisis (-1) (**Baer & Kehn-Hall, 2014**). Estos datos permitieron seleccionar los fagos de mayor potencia para los ensayos de estabilidad biológica.

Los datos se analizaron en base al número de cepas susceptibles con resultados positivos para la infección del fago del número total de cepas analizadas. Los datos fueron procesados con herramientas bioinformáticas para la generación de representaciones gráficas de la interacción fago-bacteria. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron los bacteriófagos que presentaron un espectro de lisis amplio y robusto.

2.2.2. Determinación de la estabilidad biológica de los fagos seleccionados frente a condiciones de refrigeración, exposición a cloro y su multiplicidad de infección óptima (MOI)

2.2.2.1. Preparación de suspensiones fágicas para ensayos de estabilidad.

Una vez seleccionados los fagos de interés, se procedió a la preparación de las suspensiones para los ensayos de estabilidad. Para ello, cada fago fue propagado en un cultivo de su hospedador sensible procedimiento indicado en el apartado 2.2.1.2. Posteriormente, se clarificó el lisado mediante centrifugación a 4000 rpm durante 4 minutos y filtración a través de un filtro estéril de 0.22 μm para eliminar residuos bacterianos. Las suspensiones se conservaron en tubos estériles y se almacenaron a 4°C hasta el momento de realizar las pruebas de estabilidad.

2.2.2.2. Evaluación de viabilidad de bacteriófagos en condiciones de refrigeración y concentración de cloro

La viabilidad de los fagos seleccionados se evaluó exponiéndolos a condiciones simuladas de refrigeración y concentración de cloro, que representan condiciones de la industria avícola. Para ello, cada suspensión fágica fue dividida en dos grupos: uno para refrigeración a y otro para exposición a una solución de cloro. Se tomaron alícuotas en tiempos de 0, 24 y 48 horas, y se procedió a determinar la viabilidad de los fagos mediante el recuento de unidades formadoras de placa (PFU/mL) empleando el método de doble capa en placas de agar.

Tabla 2

Condiciones para evaluación de estabilidad de bacteriófagos individuales y en cóctel

Tratamiento	Temperatura (° C)	Concentración de cloro (ppm)
A	4	0
B	4	1
C	4	3
D	4	5

Simultáneamente, se cuantificó la concentración de la bacteria huésped en UFC/mL utilizando el método de Miles y Misra (**Miles et al., 1938**). Para este método, se realizaron diluciones seriadas de la bacteria hospedadora y, en una placa de agar nutritivo dividida en secciones, se colocaron 20 μL de cada dilución. Posteriormente, se incubará la placa a 37°C durante toda la noche, y al día siguiente se procedió al recuento de colonias para determinar la concentración bacteriana por recuento en placa.

Se calculó la viabilidad relativa expresada como el porcentaje de supervivencia en comparación con la concentración inicial registrada en el tiempo cero.

2.2.2.3. Determinación del MOI óptimo para cada fago frente a su hospedador sensible

Para determinar el MOI óptimo (relación fago/bacteria) de cada fago frente a su hospedador sensible, se realizó primero una búsqueda bibliográfica que permitió estimar el rango de MOI más adecuado para iniciar los ensayos experimentales. Esta búsqueda bibliográfica se enfocó en estudios similares sobre fagos líticos contra *S. Infantis*, considerando valores previamente reportados de MOI que han demostrado eficacia en experimentos in vitro.

Con base en la información recopilada y lo enunciado por **Baer & Kehn-Hall (2014)**, se seleccionaron diferentes valores de MOI entre 0.01, 0.1, 1 y 10, para aplicar a cultivos logarítmicos de las bacterias hospedadoras, ajustadas a una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL. Cada mezcla fago-bacteria se incubó a 37°C. La eficacia de lisis se evaluó a través del recuento de bacterias viables (UFC/mL) en placas de agar.

Finalmente, se determinó el MOI óptimo como aquel que logró la mayor reducción bacteriana en el menor tiempo de incubación, considerándose el más adecuado para el cóctel fágico final.

2.2.3. Identificación de combinaciones de bacteriófagos con capacidad lítica complementaria y estabilidad funcional en condiciones simuladas para su posterior análisis de eficacia y efectividad

2.2.3.1. Realizar mezclas experimentales de fagos en diferentes combinaciones

Se elaboraron mezclas experimentales de fagos seleccionados con actividad lítica complementaria, considerando las características de cada uno y los resultados previos obtenidos en las pruebas de lisis individuales. Para ello, se realizaron combinaciones de dos o más fagos en diferentes proporciones, siguiendo los lineamientos encontrados en la literatura científica y adaptándolos a las necesidades del estudio. Además, se utilizó el paquete *PhageCocktail* de R como herramienta

bioinformática para analizar la matriz de infección fago-bacteria y optimizar la selección de fagos con base en su espectro de actividad, permitiendo así un diseño más racional y eficiente de los cócteles (Díaz-Galián et al., 2022). Estas mezclas se prepararon en tubos estériles, manteniendo concentraciones adecuadas y homogéneas, y se documentó la composición de cada mezcla para su posterior análisis.

2.2.3.2. Evaluar la eficacia del cóctel frente al panel de cepas mediante spot test y/o recuentos en tiempo real

La eficacia de cada cóctel fágico formulado se evaluó frente al panel de cepas bacterianas previamente seleccionadas, utilizando la prueba de la gota (*spot test*). Para el spot test, se sembraron las bacterias hospedadoras en placas de agar y se aplicaron gotas de cada mezcla de fagos sobre la superficie, observando la formación de zonas de lisis tras la incubación. En paralelo, se realizaron recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) antes y después de aplicar el cóctel, con el fin de comparar la disminución de la población bacteriana y corroborar la eficacia observada en el spot test.

2.2.3.3. Medir la estabilidad del cóctel en condiciones de refrigeración y concentración de cloro, y ajustar el MOI combinado

La estabilidad de las mezclas de fagos seleccionadas se evaluó sometiéndolas a condiciones simuladas de refrigeración y exposición a una solución de cloro, representativas de la industria avícola. Se realizaron tomas de muestras en diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas) para cuantificar la viabilidad de los fagos presentes en el cóctel mediante el recuento de unidades formadoras de placa (PFU/mL). Asimismo, se determinó el MOI combinado, considerando la concentración de cada fago en la mezcla, con el objetivo de ajustar la proporción óptima que garantice la máxima eficacia frente a las cepas seleccionadas. Este ajuste permitió asegurar la actividad lítica adecuada y la estabilidad del cóctel durante el almacenamiento y la aplicación.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

El desarrollo de esta investigación permitió obtener resultados relevantes en la selección, evaluación y formulación de cócteles de bacteriófagos líticos dirigidos al control de *S. Infantis* de origen avícola ecuatoriano. A partir de los ensayos fenotípicos y de estabilidad biológica, se identificaron fagos con elevada capacidad de lisis frente a cepas multirresistentes, así como una notable resistencia frente a condiciones de refrigeración y exposición a cloro, factores que suelen limitar la eficacia de los agentes biológicos en entornos industriales. Estos hallazgos evidencian el potencial de las mezclas fágicas diseñadas como una alternativa biotecnológica sostenible frente a los métodos de desinfección convencionales, aportando un avance significativo en el desarrollo de estrategias de biocontrol aplicables a la industria avícola nacional.

3.1.1 Evaluación de la capacidad lítica de bacteriófagos individuales frente a cepas multirresistentes de *S. Infantis*

3.1.1.1 Selección de la cepas de *S. Infantis* con perfiles de resistencia múltiple

Para la caracterización fenotípica de los aislados se evaluó un panel de 18 antibióticos pertenecientes a diferentes clases fluoroquinolonas, carbapenémicos, fosfonatos, penicilinas con inhibidor de β -lactamasa, penicilinas, sulfonamidas, cefalosporinas de 2^{da}, 3^{ra} y 4^{ta} generación, etc. Mediante el método de difusión en disco (Miles y Misra), siguiendo los puntos de corte establecidos por el CLSI M100-ED35. La **Tabla 3** resume los antimicrobianos incluido sus concentraciones y la clase farmacológica a la que pertenecen. De acuerdo con los criterios establecidos, se considera resistencia múltiple cuando una cepa presenta resistencia frente a tres o más antibióticos (**Bonilla-Caballero et al., 2022**).

Tabla 3*Antibióticos evaluados en el perfil de resistencia de S. Infantis*

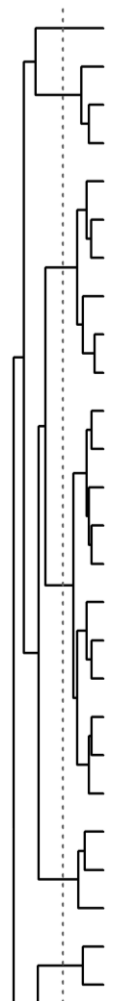
Sigla	Nombre	Concentración (µg/disco)	Clase antimicrobiana
CIP	Ciprofloxacina	5	Fluoroquinolona
MEM	Meropenem	10	Carbapenémico
FF	Fosfomicina	200	Fosfomicina
TPZ	Piperacilina/Tazobactam	110	Penicilina + inhibidor de β-lactamasa
AM	Ampicilina	10	Penicilina
CXM	Cefuroxima	30	Cefalosporina de 2ª generación
AK	Amikacina	30	Aminoglucósido
SXT	Trimetoprima/Sulfametoxazol	25	Sulfonamida
F	Nitrofurantoína	300	Nitrofuranos
ETP	Ertapenem	10	Carbapenémico
CN	Gentamicina	10	Aminoglucósido
CTX	Cefotaxima	30	Cefalosporina de 3ª generación
AMC	Amoxicilina/Ácido clavulánico	30	Penicilina + inhibidor de β-lactamasa
CRO	Ceftriaxona	30	Cefalosporina de 3ª generación
FEP	Cefepima	30	Cefalosporina de 4ª generación
CXM	Cefuroxima	30	Cefalosporina de 2ª generación
ATM	Aztreonam	30	Monobactámico
CAZ	Ceftazidima	30	Cefalosporina de 3ª generación

Nota. La tabla presenta los antibióticos empleados para la determinación del perfil de resistencia de *S. Infantis* mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), conforme a los estándares del CLSI (2025). Las siglas corresponden a la abreviatura de cada antibiótico utilizada en los mapas de calor y análisis de resistencia. Las concentraciones indicadas representan el contenido de cada disco antimicrobiano en microgramos (µg/disco).

Se realizó un análisis de los perfiles de resistencia corresponden a 46 aislados de *S. Infantis* que se pueden observar en la **Tabla 4**, representados en un mapa de calor y acompañado de un dendrograma, donde se distinguen varios clústeres (C1-C9) de acuerdo con la combinación de antibióticos, frente a la cual cada cepa se mostró sensible, intermedia o resistente (interpretación fenotípica), los serovares a los que pertenecen, el perfil BLEE y el número total de resistencias.

Tabla 4

Perfiles de Resistencia de 46 Aislados de S. enterica de varios serovares frente a Antibióticos Seleccionados

		Serovar	BLEE	Resistencias	Interpretación	
	2CTP.0017	C1	I 1,4,[5],12:i:-	-	5	Multirresistente
	51.6.11		Infantis	-	5	Multirresistente
	U10925	C2	Infantis	-	3	Multirresistente
	U26065		Infantis	-	3	Multirresistente
	U7195	C3	Infantis	-	12	Multirresistente
	U7295		Typhimurium	-	11	Multirresistente
	U2620077		Infantis	-	11	Multirresistente
	GCT.10		Infantis	-	11	Multirresistente
	ICT.198		Infantis	-	10	Multirresistente
	POLGIC		Infantis	-	10	Multirresistente
	POLLISA	C4	Sin identificar	-	9	Multirresistente
	7859		Sin identificar	-	10	Multirresistente
	8884		Typhimurium	-	9	Multirresistente
	U16785		Infantis	-	9	Multirresistente
	9356		Infantis	-	8	Multirresistente
	9306		Infantis	-	9	Multirresistente
	U8045		Infantis	-	8	Multirresistente
	9205		Infantis	-	8	Multirresistente
	8934		Sin identificar	-	7	Multirresistente
	8831		Infantis	-	7	Multirresistente
	9201	C5	Infantis	-	7	Multirresistente
	6601		Derby	-	8	Multirresistente
	U7185		Infantis	-	7	Multirresistente
	U14895		Infantis	-	6	Multirresistente
	SM8L2R2C2	C6	Infantis	+	5	Multirresistente
	SM3LXR1C2		Infantis	-	4	Multirresistente

Continúa

Tabla 4

Perfiles de Resistencia de 46 Aislados de S. enterica de varios serovares frente a Antibióticos Seleccionados

		Serovar	BLEE	Resistencias	Interpretación
	SM8L1R3C1	Infantis	-	2	Resistente
	SM10L1R1C1	Infantis	-	1	Resistente
	SM10L1R3C1	Infantis	-	1	Resistente
	9203	Hadar	-	0	Sensible
	7351	Infantis	-	0	Sensible
	8826	Infantis	-	1	Resistente
	8827	Infantis	-	0	Sensible
	U6955	Amsterdam	-	1	Resistente
	O.ZG246	Enteriditis	-	1	Resistente
	MH3.Z2	Uganda	-	0	Sensible
	SM8L3R1C3	Infantis	-	7	Multirresistente
	SM11L2R1C1	Infantis	-	14	Multirresistente
	SM3LXR2C2	Infantis	-	13	Multirresistente
	SM11L1R2C1	Infantis	-	12	Multirresistente
	SM11L1D2C1	Infantis	-	12	Multirresistente
C9	HgL1C.1	Infantis	-	11	Multirresistente
	StL1.1	Infantis	-	9	Multirresistente
	SM12L2R3C1	Infantis	-	10	Multirresistente
	SM12L2R2C1	Infantis	+	9	Multirresistente
	SM11L2R3C1	Infantis	+	8	Multirresistente
	CIP				
	MEM				
	FF				
	TPZ				
	AM				
	CXM				
	AK				
	SXT				
	F				
	ETP				
	CN				
	CTX				
	AMC				
	CRO				
	FEP				
	ATM				
	CAZ				

Nota. El mapa de calor representa perfiles de resistencia antimicrobiana de aislados de *S. Infantis* frente a antibióticos. Los colores indican la interpretación fenotípica; verde corresponde a cepas resistentes, rojo a cepas con sensibilidad intermedia, y azul a cepas sensibles.

En la **Tabla 4** se observó desde aislados completamente sensibles, hasta cepas con resistencia frente a 14 antibióticos, lo que evidencian una marcada heterogeneidad en los fenotipos de resistencia dentro de la colección. EL 93,5 % de las cepas no evidencian presencia de enzimas BLEE, la baja presencia de este fenotipo puede explicarse por la naturaleza plasmídica y la variabilidad genética que caracteriza a los clones multirresistentes de *S. Infantis* (**Papić et al., 2022**). Este tipo de serovar suele portar megaplasmidos tipo *pESI* (plásmido emergente de *S. Infantis*), los cuales confieren un amplio espectro de resistencia a antibióticos no β -lactámicos, así como genes de tolerancia a desinfectantes y metales pesados (**Aviv et al., 2014; Piña-Iturbe et al., 2024**). Sin embargo, la presencia de genes β -lactamasa de espectro extendido, como *bla_{CTX-M-1}* o *bla_{CTX-M-65}*, no es constante en estos plásmidos, sino que depende de eventos de adquisición esporádicos, recombinación plasmídica y presiones selectivas locales (**Di Marcantonio et al., 2022; Lee et al., 2021**).

El 82,6 % de las cepas presentó resistencia a más de 3 antibióticos. A partir del análisis jerárquico se identificó que los clados C3, C4 y C9 presentan los perfiles de multirresistencia más destacados, lo que coincide con su mayor diversidad de orígenes ambientales y avícolas. La elevada frecuencia de resistencias frente a β -lactámicos y sulfonamidas observadas en los aislamientos analizados puede atribuirse a la presencia de genes de resistencia no-ESBL, así como a la amplia diseminación de megaplasmidos tipo *pESI-like* y plásmidos conjugativos más pequeños que actúan como reservorios de determinantes antimicrobianos (**Alba et al., 2020; Russo et al., 2024**). En *S. Infantis* de origen avícola, estos elementos móviles frecuentemente están asociados a integrones de clase 1 se co-localizan genes como *bla_{TEM-1}*, *bla_{CMY-2}*, *sul1* y *sul2*, los cuales confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas de espectro reducido y sulfonamidas respectivamente, sin generar un fenotipo BLEE clásico (**Kürekci et al., 2021; Tekin et al., 2025**). En particular, el gen *bla_{TEM1}* que codifica una β -lactamasa de espectro restringido capaz de hidrolizar penicilinas y algunas cefalosporinas tempranas, lo que explica la resistencia a amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) y piperacilina/tazobactam (TPZ), aun cuando las cepas son negativas para BLEE (**Tekin et al., 2025**). De manera similar, las β -lactamasas tipo AmpC (como *bla_{CMY-2}*), detectadas en colecciones internacionales de *S. Infantis* procedentes de pollos de engorde, esto confiere resistencia a cefalosporinas de segunda generación y algunos compuestos de tercera generación, contribuyendo al fenotipo resistente observado (**Kang et al., 2024**).

Por otro lado, la alta resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol (STX) se relaciona con amplia distribución de genes *sul1* y *sul2*, los cuales codifican variantes de la enzima dihidropteroato sintasa, insensible a la inhibición por sulfonamidas (**Z. Z. Cao et al., 2020; Jiang et al., 2024**). Estos genes se encuentran habitualmente insertos en integrones de clase 1 o en los megaplasmidos *pESI-like*, junto con

otros determinantes como *aadA1*, *tet(A)* y *dfrA*, lo que favorece su co-selección y mantenimiento plasmídico incluso en ausencia de presión selectiva directa por sulfonamidas (Tekin et al., 2025).

La resistencia β -lactámica en los aislamientos negativos para BLEE deriva de la expresión de β -lactamasas no extensas o enzimas AmpC, que hidrolizan sustratos limitados (penicilinas y cefalosporinas tempranas), mientras que la resistencia a sulfonamidas es consecuencia de la producción de enzimas alternativas que eluden el sitio diana del fármaco (Gheorghe-Barbu et al., 2025; Jiang et al., 2024). Además, la frecuente ecolocalización de estos genes en un mismo plásmido asegura la diseminación conjunta mediante conjugación bacteriana, incluso entre clones estrechamente relacionados (Alba et al., 2020). Estos patrones son particularmente preocupantes porque compromete antibióticos de primera línea para el tratamiento de las salmonelosis invasivas y limita severamente las opciones terapéuticas.

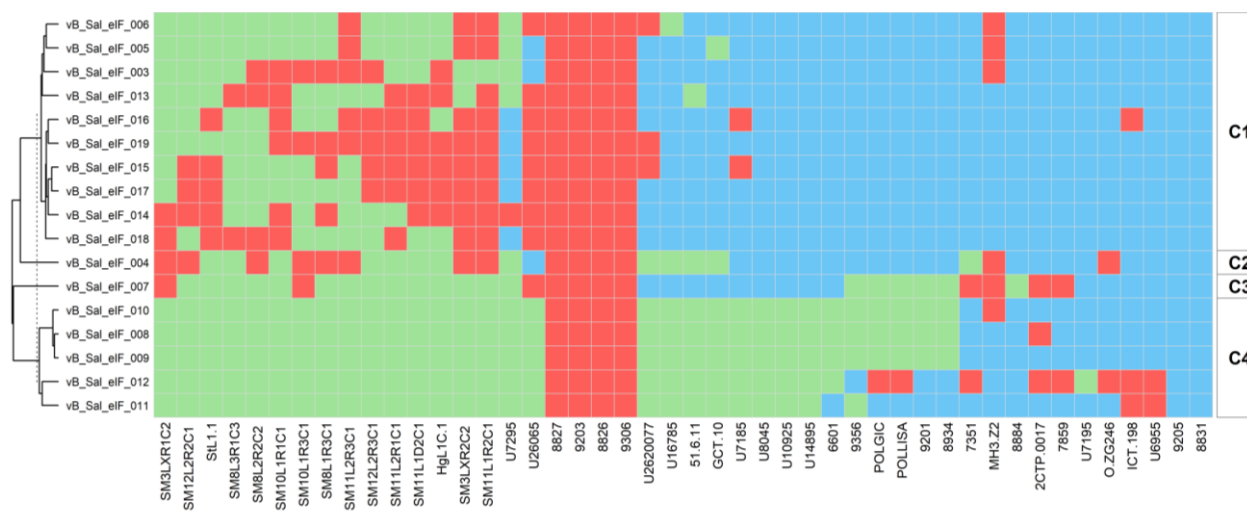
Dentro de estos clados se detectó también la presencia de dos aislamientos pertenecientes al serovar *S. Typhimurium* y tres sin identificación serológica confirmada; sin embargo, dado que el enfoque del estudio se centra en *S. Infantis*, únicamente se consideraron para las etapas posteriores las cepas correspondientes a este serovar.

3.1.1.2 Prueba de la gota

La prueba de la gota aplicada a los 17 bacteriófagos seleccionados permitió la caracterización de su capacidad lítica frente al panel de cepas de *S. Infantis* y construir una matriz de infección fago-bacteria a partir de la cual se generó el mapa de calor mostrado en la **Figura 3**. Este ensayo spot test se considera actualmente una alternativa rápida y de alto rendimiento al método clásico de doble capa en agar para el cribado de rango de hospedadores, ya que permite evaluar simultáneamente múltiples combinaciones fago-cepa conservando una buena sensibilidad analítica (Ng et al., 2021; Olsen et al., 2020). En el presente estudio, la respuesta de cada aislamiento se categorizó en lisis clara, intermedia y ausencia de lisis, de forma análoga a en otros trabajos utilizan la morfología de la calvas para clasificar cepas sensibles, moderadamente sensibles o resistente a los fagos (Furfaro et al., 2020).

Figura 3

Patrones de lisis de los bacteriófagos frente a cepas de S. Infantis.



Nota. El mapa de calor muestra los patrones de lisis obtenidos para 17 bacteriófagos frente a múltiples cepas de *S. enterica* serovar *Infantis*. Los colores representan los tipos de lisis observados; verde para lisis clara, rojo para lisis intermedia y azul para ausencia de lisis. El dendrograma lateral agrupa los fagos según la similitud de sus perfiles líticos, mientras que los clados (C1-C4) indican conjuntos con comportamientos de infección semejantes. Los fagos pertenecientes a los clados C1 y C2 presentaron los perfiles líticos más amplios y efectivos.

Como se aprecia en la **Figura 3**, los bacteriófagos que generan zonas de lisis amplias y bien definidas sobre un mayor número de cepas se interpretaron como candidatos con mayor potencia lítica, mientras que las interacciones con calvas turbias o ausentes se asociaron a una infección menos eficiente. El análisis de la matriz de infección agrupó a los fagos en cuatro clados (C1-C4) de acuerdo con la similitud de sus perfiles de lisis, lo que permitió distinguir fagos con comportamiento generalista y fagos con espectro más restringido. Los clados C1 y C2 son los que concentran los fagos con un perfil de lisis más amplio, mientras que los clados C3 y C4 incluyeron principalmente fagos con actividad limitada a subconjuntos específicos de cepas. Este patrón sugiere que la colección evaluada contiene fagos de amplio rango y fagos de rango estrecho lo cual puede ayudar a reforzar la cobertura frente a subpoblaciones concentradas de *S. infantis*.

Los fagos reconocen estructuras muy específicas (LPS/O-antígeno, proteínas de membrana externa, cápsula) mediante sus fibras caudales, pequeñas variaciones en la composición o longitud del O-antígeno o en la expresión de porinas entre cepas de *Salmonella* bastan para que un fago adsorba muy bien a unas cepas y prácticamente nada a otras (Broeker & Barbirz, 2017; Stephan et al., 2020).

Además, muchas cepas modulan receptores por *phase variation* y por operones como *gtr* que alteran el O-antígeno, lo que genera subpoblaciones sensibles y resistentes dentro de un mismo serotipo (**Tajer et al., 2024**). A esto se le suman sistemas de resistencia intracelular (restricción-modificación, CRISPR-Cas, excusión de superinfección, *abortive infection*), que pueden bloquear completamente el ciclo lítico y explicar las cepas donde no se observa lisis. Estudios recientes con paneles de *Salmonella*, este mismo patrón se ve donde cada fago solo lisa un subconjunto de cepas, confirmando que la diversidad genética del hospedero limita el rango de hospedadores del fago (**Egido et al., 2021**).

Las calvas turbias o intermedias suelen indicar que el fago sí infecta, pero con una eficiencia lítica baja o heterogénea, parte de la población lisa y otra sobrevive o entra en un estado menos productivo. Investigaciones describen que placas turbias pueden deberse a tasas de adsorción más bajas, periodos latentes más largos o tamaños de explosión reducidos, así como a estados fisiológicos subóptimos de la bacteria (fase de crecimiento, estrés, microbiofilm en la placa) (**Z. Lu et al., 2022; Mayorga-Ramos et al., 2024**). Esto también puede se debe a la asociación con comportamientos templados o pseudolisogénicos, donde una fracción de las células infectadas no se lisan de inmediato, lo que mantiene una niebla de crecimiento dentro del halo (**Mäntynen et al., 2021**). Por otro lado, dentro de la misma cepa pueden aparecer mutantes resistentes durante el ensayo, estos clones vuelven a crecer dentro de la zona de infección y aumentan la turbidez del halo, mientras que en las cepas totalmente resistentes los receptores están modificados o sus defensas bloquean el ciclo del fago desde el inicio, de modo que no se observa lisis visible (**Egido et al., 2022**).

Tabla 5

Cobertura de infección de los bacteriófagos evaluados frente a S. Infantis.

Fago	Cobertura_pct
vB_Sal_eIF_008	66
vB_Sal_eIF_009	66
vB_Sal_eIF_010	66
vB_Sal_eIF_011	55,3
vB_Sal_eIF_012	55,3
vB_Sal_eIF_007	42,6
vB_Sal_eIF_005	29,8
vB_Sal_eIF_006	29,8
vB_Sal_eIF_004	27,7

Continúa

Tabla 5

Cobertura de infección de los bacteriófagos evaluados frente a S. Infantis.

Fago	Cobertura_pct
vB_Sal_eIF_013	21,3
vB_Sal_eIF_003	19,1
vB_Sal_eIF_016	14,9
vB_Sal_eIF_017	14,9
vB_Sal_eIF_018	14,9
vB_Sal_eIF_014	12,8
vB_Sal_eIF_015	12,8
vB_Sal_eIF_019	10,6

Nota. La cobertura (%) representa el porcentaje de cepas de *S. Infantis* en las que cada bacteriófago mostró capacidad de infección en las pruebas de rango de hospedadores. Valores más altos indican fagos con mayor amplitud de lisis.

La amplitud del rango de hospedadores se cuantificó mediante el porcentaje de cepas lisadas por cada fago, resumido en la **Tabla 5**. La cobertura individual osciló entre 10,6% y 66% de las cepas de *S. Infantis*, observándose que los bacteriófagos vB_Sal_eIF_008, vB_Sal_eIF_009 y vB_Sal_eIF_010 presentaron el mayor espectro, con capacidad de lisar dos tercios del panel evaluado, seguidos de vB_Sal_eIF_011, vB_Sal_eIF_012 y vB_Sal_eIF_007, en contraste el resto de los fagos mostraron una cobertura más estrecha (<30%). Desde la perspectiva de biocontrol, la selección de fagos con alta cobertura sobre cepas multirresistentes de *S. Infantis* es especialmente relevante, considerando que este serovar se ha consolidado como un patógeno emergente asociado a la producción avícola y con frecuencia porta el megaplasmiado *pESI* o variantes *pESI-like* que confieren resistencia frente a múltiples clases de antimicrobianos (**Alvarez et al., 2023**).

A partir de estos resultados, se definió un conjunto de seis bacteriófagos para su evaluación en la siguiente etapa del estudio. Los tres de mayor cobertura (vB_Sal_eIF_008, vB_Sal_eIF_009 y vB_Sal_eIF_010) se consideraron como candidatos principales por su capacidad de lisar la mayor proporción de cepas. De forma complementaria, se incorporaron vB_Sal_eIF_011, vB_Sal_eIF_012 y vB_Sal_eIF_007, cuyos perfiles ampliaron la cobertura hacia cepas que no cubren los 3 fagos iniciales.

3.1.2. Determinación de la estabilidad biológica de los bacteriófagos

Los bacteriófagos presentan ventajas importantes frente a los agentes antimicrobianos tradicionales ya que poseen la capacidad de erradicar patógenos resistentes con eficacia incluso cuando los fármacos convencionales fracasan (**Jordá et al., 2023**). Manifiestan especificidad estrecha de ataque hacia su hospedador, al ser de origen natural presentan baja toxicidad y benignidad con el microbioma colindante de la matriz en el que se desarrolla su aplicación (**A. Khan & Joshi, 2024**). No obstante, su implementación a nivel industrial enfrenta desafíos debido a su sensibilidad hacia factores medioambientales y técnicas de procesamiento de alimentos en la industria (**A. Khan & Joshi, 2025**). El uso de cloro como desinfectante en distintas etapas la cadena de procesamiento cárnico es común en la industria avícola. Y si bien **Pelyuntha & Vongkamjan (2023)** han reportado fagos con una viabilidad del 80-100% hasta con 0,3% de cloro disponible, el comportamiento habitual es de baja tolerancia. La presencia de cloro tiende a reducir drásticamente la infectividad de los bacteriófagos (**A. Khan & Joshi, 2025**).

Las condiciones escogidas para las pruebas de estabilidad se basan en la normativa ecuatoriana, la cual establece que la cantidad de cloro residual permitido durante etapa de faenamiento se encuentra dentro de un rango de 1-3 ppm (**AGROCALIDAD, 2010**). Mientras que la temperatura de procesamiento y almacenamiento para productos cárnicos, entre ellos carne de pollo se encuentra entre 0 y 4° C (**INEN, 2011**).

3.1.2.1 Viabilidad de los bacteriófagos en condiciones de refrigeración y cloro

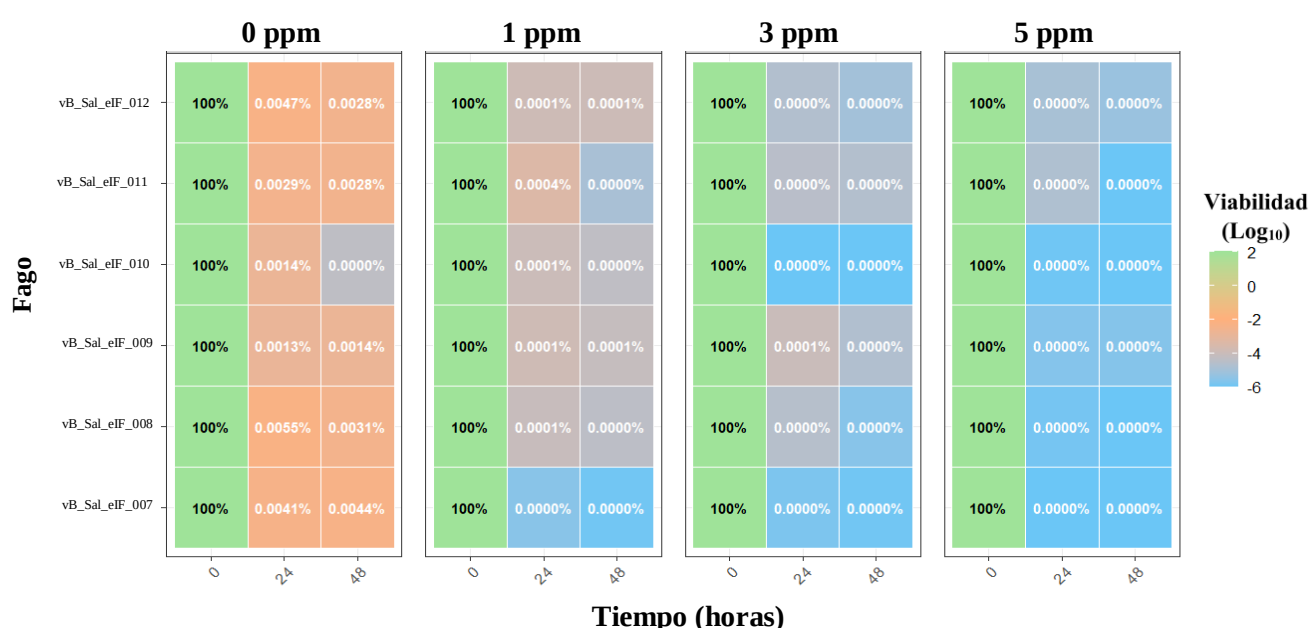
La influencia del tiempo de incubación y de las diferentes concentraciones de cloro sobre la estabilidad fágica se evaluó cuantificando la reducción del título de los bacteriófagos a lo largo del tiempo. Este comportamiento se observa en la **Figura 4**, donde se evidencia un efecto significativo del tiempo en la disminución del título fágico.

Inicialmente, se calculó la viabilidad relativa de los bacteriófagos, expresada como el porcentaje de supervivencia respecto al título inicial registrado en el tiempo 0 (**Figura 4**). Este análisis permitió visualizar de manera descriptiva la magnitud de la reducción en la viabilidad fágica bajo cada combinación de tiempo y concentración de cloro. En general, se observó que, aunque todos los fagos conservaron el 100 % de viabilidad al inicio, la supervivencia disminuyó drásticamente a partir de las

24 horas, especialmente en presencia de cloro, alcanzando valores cercanos a 0 % en los tratamientos de 1, 3 y 5 ppm. Si bien este comportamiento descriptivo ofrece un primer acercamiento a la dinámica de inactivación fágica, no determina si las diferencias observadas entre fagos o entre condiciones experimentales son estadísticamente significativas.

Figura 4

Viabilidad lítica de bacteriófagos en función del tiempo y la concentración de cloro



Nota. El mapa de calor representa la reducción bacteriana (Log₁₀) generada por los fagos VB_SAL{EIF_007, VB_SAL{EIF_008, VB_SAL{EIF_009, VB_SAL{EIF_010, VB_SAL{EIF_011 y VB_SAL{EIF_012 tras 0, 24 y 48 horas de exposición a 0, 1, 3 y 5 ppm de cloro. Los tonos naranjas, grises y celestes indican mayor disminución del título fágico, evidenciando diferencias en la eficacia lítica según la naturaleza del bacteriófago y la concentración del sanitizante.

La viabilidad relativa de los bacteriófagos, calculada como el porcentaje de supervivencia respecto al título inicial registrado en el tiempo cero, mostró un patrón claramente dependiente del tiempo y de la concentración de cloro. En ausencia de cloro (0 ppm), todos los fagos conservaron el 100 % de su viabilidad en el tiempo cero; sin embargo, a las 24 horas la supervivencia descendió a valores inferiores al 1 %, reflejando una pérdida marcada de estabilidad incluso en condiciones sin agentes oxidantes. Para los fagos VB_SAL{EIF_009, VB_SAL{EIF_010 y VB_SAL{EIF_011 la reducción fue más pronunciada, alcanzando porcentajes cercanos al 0,001 %. A las 48 horas, la

viabilidad relativa fue prácticamente nula para todos los fagos, lo que confirma que el tiempo de almacenamiento constituye un factor crítico de inactivación aún en ausencia de cloro.

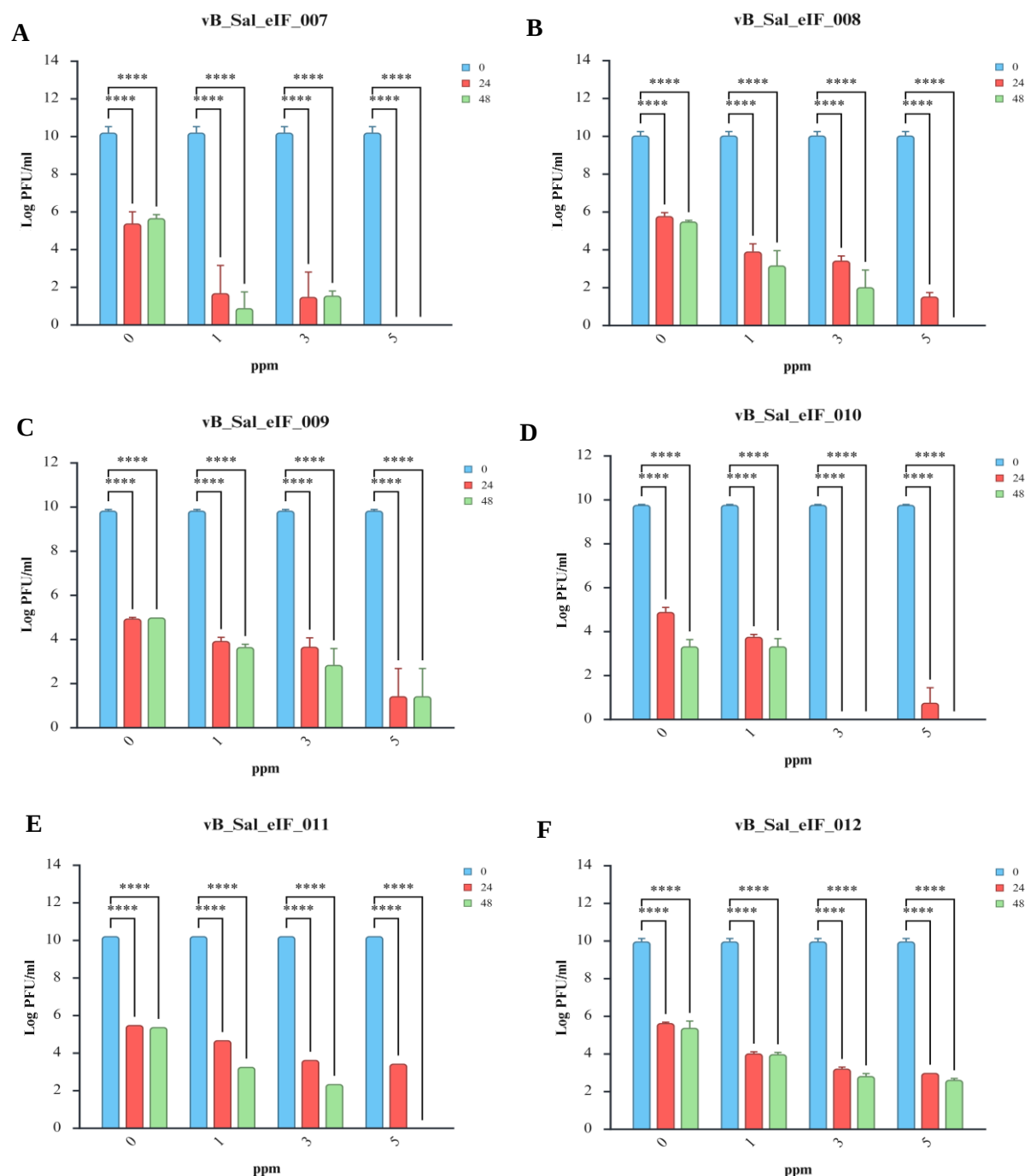
En el tratamiento de baja concentración (1 ppm), la tendencia de disminución fue aún más acentuada. Aunque todos los fagos iniciaron con un 100 % de supervivencia, a las 24 horas la viabilidad relativa se redujo casi por completo, registrándose porcentajes de 0,0001 % o inferiores para la mayoría de los fagos. La exposición prolongada a 48 horas acentuó esta pérdida, alcanzándose valores iguales o cercanos a 0,0000 %, lo que evidencia que incluso bajas concentraciones de cloro aceleran significativamente la inactivación fágica. Cuando la concentración de cloro aumentó a 3 ppm, la reducción en la supervivencia fágica fue más homogénea y severa. A las 24 horas, la mayoría de los fagos mostró porcentajes de viabilidad iguales o cercanos a 0 %, y esta condición se mantuvo a las 48 horas. Destaca que fagos como VB_SAL{EIF_010 y VB_SAL{EIF_007 fueron particularmente susceptibles, registrando reducciones completas incluso antes del tiempo máximo de evaluación.

Finalmente, a 5 ppm de cloro, la condición de mayor estrés oxidativo evaluada, todos los fagos presentaron una disminución drástica desde las primeras 24 horas, alcanzando valores de viabilidad cercanos a los nulos (0,0000 %) y manteniéndose sin recuperación a las 48 horas. Esta concentración fue efectiva para suprimir la estabilidad fágica, lo cual sugiere que la acción del cloro en niveles altos excede ampliamente la capacidad de resistencia natural de estos bacteriófagos. En conjunto, los resultados demuestran que la viabilidad relativa de los bacteriófagos disminuye en función del tiempo y de la concentración de cloro, con reducciones drásticas incluso en condiciones sin agente desinfectante, pero intensificándose notablemente conforme aumenta la concentración. Estos hallazgos evidencian que la estabilidad fágica es altamente sensible al estrés oxidativo, lo que subraya la importancia de seleccionar fagos robustos frente a agentes químicos para su uso en aplicaciones de biocontrol.

Los factores y sus combinaciones fueron evaluados a través de la ejecución de un ANOVA multifactorial demostrando que Tiempo, Fago y Concentración de cloro (ppm) representan factores con efectos altamente significativos sobre el título fágico ($p < 2 \times 10^{-16}$ en todos los casos). Las interacciones Fago $\times$ Tiempo, Fago $\times$ ppm y Tiempo $\times$ ppm también fueron evaluadas con resultados significativos ($p < 0,001$), indicando que los fagos no responden de forma uniforme a las variaciones de tiempo o concentración de cloro (**Anexo 1**). De forma crucial, la interacción triple Fago $\times$ Tiempo $\times$ ppm resultó significativa ($p = 1,11 \times 10^{-8}$), lo que evidencia que el efecto combinado del tiempo y del cloro sobre la estabilidad depende del fago evaluado (**Anexo 1**).

Figura 5

Cinéticas de estabilidad de los bacteriófagos frente a diferentes concentraciones de cloro y tiempos de incubación



Nota. Las curvas muestran la reducción de la concentración viral (PFU/mL, Log₁₀) de cada fago a 0, 1, 3 y 5 ppm de cloro durante 0, 24 y 48 horas de exposición. Las pendientes más pronunciadas indican mayor sensibilidad al cloro, mientras que las curvas con menor descenso representan fagos con mayor estabilidad en condiciones sanitizantes.

Dado que el análisis ANOVA multifactorial reveló efectos principales e interacciones altamente significativas entre los factores Fago, Tiempo y ppm, así como una interacción triple significativa se determinó que los fagos no presentan un comportamiento uniforme a lo largo de las condiciones evaluadas. En consecuencia, la estabilidad depende de la combinación específica de tiempo y concentración de cloro. Por este motivo, se realizó un análisis post hoc de comparaciones múltiples de Tukey sobre las medias marginales estimadas, el cual permite comparar el desempeño de cada fago dentro de cada combinación específica de tiempo y concentración de cloro (**Papadatou et al., 2021**).

En el Tratamiento A (0 ppm), las diferencias entre fagos se hicieron evidentes en el tiempo de 48 h. En esta condición, el fago VB_SAL{EIF_010 presentó un título promedio de 3,33 Log₁₀ PFU/mL, marcadamente inferior al observado en los demás fagos, cuyos valores oscilaron entre 5,00 y 5,67 Log₁₀ PFU/mL ($p < 0,001$) (**Anexo 2 - Anexo 3**). Este descenso pronunciado sugiere una menor estabilidad intrínseca por parte del fago VB_SAL{EIF_010 en periodos prolongados de almacenamiento aun en ausencia de cloro.

La estabilidad de los bacteriófagos tras la aplicación de Tratamiento B (1 ppm) mostró una respuesta diferencial marcada. El fago VB_SAL{EIF_007 presentó los valores más bajos tanto a 24 h (1,69 Log₁₀ PFU/mL) como a 48 h (0,91 Log₁₀ PFU/mL), siendo significativamente inferior a los demás fagos ($p < 0,001$). En contraste, los títulos de los fagos VB_SAL{EIF_008, VB_SAL{EIF_009, VB_SAL{EIF_010, VB_SAL{EIF_011 y VB_SAL{EIF_012 se mantuvieron entre 3,18 y 4,69 Log₁₀ PFU/mL en 24 h y entre 3,18 y 3,99 Log₁₀ PFU/mL en 48 h, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) (**Anexo 2 - Anexo 3**). Esto parece indicar que VB_SAL{EIF_007 es particularmente susceptible incluso a concentraciones bajas de cloro, por lo cual se descarta como candidato adecuado para la formulación de cócteles.

Los resultados del Tratamiento C (3 ppm) mostraron un patrón más heterogéneo. En el tiempo 24, el fago VB_SAL{EIF_010 registró el título más bajo (0,00 Log₁₀ PFU/mL), siendo significativamente inferior al resto ($p < 0,001$), mientras que los fagos VB_SAL{EIF_008, VB_SAL{EIF_009, VB_SAL{EIF_011 y VB_SAL{EIF_012 mantuvieron valores entre 3,22 y 3,67 Log₁₀ PFU/mL, lo que indica mejor estabilidad. A las 48 h, los títulos más altos correspondieron a VB_SAL{EIF_009 (2,85 Log₁₀ PFU/mL) y VB_SAL{EIF_012 (2,83 Log₁₀ PFU/mL), mientras que VB_SAL{EIF_010 volvió a mostrar una reducción marcada, estabilizándose nuevamente en 0,00 Log₁₀ PFU/mL ($p < 0,001$) (**Anexo 2 - Anexo 3**).

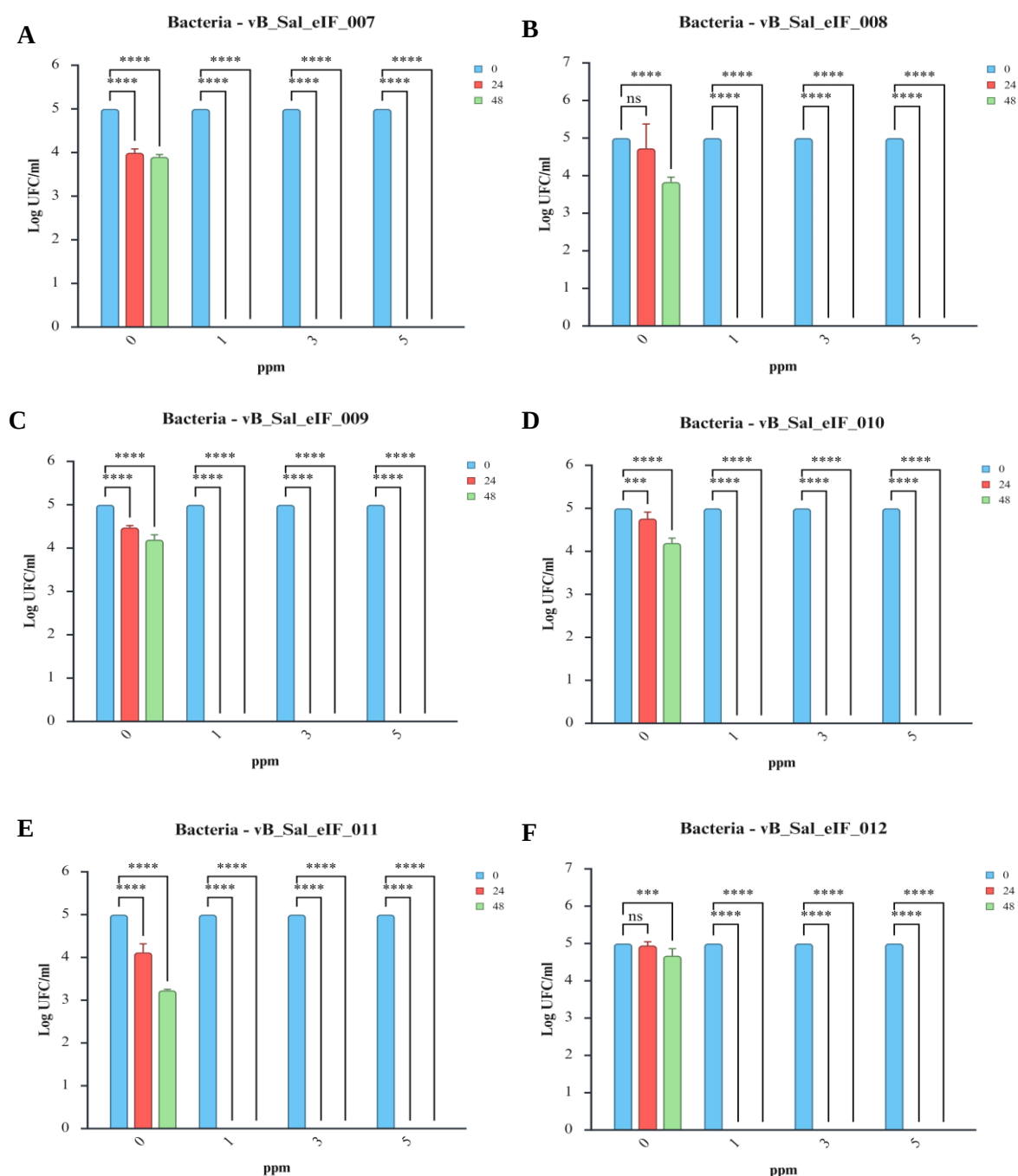
Finalmente, en el Tratamiento D (5 ppm) se observó en las 24 h el fago VB_SAL{EIF_007 mostró una pérdida completa del título (0,00 Log₁₀ PFU/mL), siendo el menos estable en esta condición, mientras que los fagos VB_SAL{EIF_011 y VB_SAL{EIF_012 alcanzaron los valores más altos (3,44 y 3,00 Log₁₀ PFU/mL, respectivamente; ($p < 0,001$) (**Anexo 2 - Anexo 3**). Sin embargo, a 48 h se produjo un cambio notable: VB_SAL{EIF_012 se convirtió en el fago más afectado por el cloro (2,63 Log₁₀ PFU/mL, significativamente inferior al resto), mientras que el fago VB_SAL{EIF_009, con un valor de 1,44 Log₁₀ PFU/mL, mantuvo el desempeño más consistente bajo esta condición extrema ($p < 0,01$) (**Anexo 2 - Anexo 3**).

La presencia rutinaria de cloro en las aguas de procesamiento avícola presenta un desafío en la viabilidad del uso de bacteriófagos dirigidos contra *S. Infantis*, serovar que ha emergido como uno de los dominantes en pollos de engorde en años recientes, llegando a constituir hasta el 95% de los aislamientos en granjas (**Sevilla-Navarro et al., 2024**). Estudios han evaluado la estabilidad de los fagos bajo condiciones de cloración industriales, con énfasis en cepas de *S. Infantis* y comparaciones con otros serotipos. En general, las concentraciones bajas a moderadas de cloro muestran un efecto mínimo sobre la actividad fágica. De forma similar, el ensayo ejecutado por **Vaz et al. (2025)** emplea agua clorada a 3 ppm y bacteriófagos aislados de fuentes naturales sin modificaciones (Wild - Type) sin evidencias de reducciones en el título fágico luego de 24 horas. Esto sugiere que, bajo condiciones de cloración moderada, los fagos pueden seguir ejerciendo su actividad lítica contra *S. Infantis* de forma comparable, lo cual refuerza su potencial como herramienta de biocontrol en ambientes de procesamiento con desinfección química.

Sin embargo, también se han identificado limitaciones importantes en la aplicación de fagos en presencia de cloro en concentraciones elevadas o durante exposiciones prolongadas. La inactivación de los bacteriófagos se vuelve significativa en ensayos controlado con concentraciones de cloro de 0,5-1%. **Pelyuntha et al. (2025)** evidencia caídas marcadas en la viabilidad fágica (43% de los viriones permanecieron activos con 0,1-1% de cloro) y dosis superiores (2,5-5%) llegaron a inactivar completamente a los virus. Por lo tanto, el uso eficaz de fagos en entornos con cloración requiere el desarrollo de estrategias de integración. Entre ellas se encuentra ajustar la dosis de cloro a niveles compatibles con la estabilidad del fago, y escalonar la aplicación de los tratamientos. Un estudio demostró que la introducción de una etapa adicional de tratamiento con fagos después de la limpieza y antes de la desinfección química mejoró notablemente la eliminación de *S. Infantis* multirresistente en instalaciones avícolas, la detección bacteriana se redujo del 100% (tras la limpieza) a 36% después de la aplicación de fagos, y cayó a 0% con la desinfección final (**Sevilla-Navarro et al., 2024**).

Figura 6

Supervivencia bacteriana tras el tratamiento con bacteriófagos en presencia de cloro



Nota. Las curvas muestran la disminución de *S. Infantis* (UFC/mL, Log₁₀) tras la infección con cada fago en condiciones de 0, 1, 3 y 5 ppm de cloro durante 0, 20 y 45 horas. Las pendientes reflejan la eficacia lítica de cada bacteriófago bajo diferentes niveles de sanitizante, donde descensos más pronunciados indican mayor capacidad de control bacteriano.

En relación con la reducción de la carga bacteriana, todos los tratamientos partieron de un inóculo comparable cercano a 5 Log₁₀ UFC/mL para cada fago, independientemente de la concentración de cloro. En ausencia de cloro (0 ppm), la viabilidad bacteriana se redujo parcialmente a las 24 h, con valores que oscilaron entre 3,99 y 4,95 Log₁₀ UFC/mL, y continuó disminuyendo a las 48 h, alcanzando títulos de 3,90-4,67 Log₁₀ UFC/mL, siendo el fago VB_SAL{EIF_011 el que logró la menor carga residual (3,23 Log₁₀ UFC/mL) (**Anexo 4 - Anexo 5**). En contraste, en presencia de cloro (1, 3 y 5 ppm) se observó una eliminación prácticamente completa de la bacteria a partir de las 24 h, con valores promedio cercanos a 0 Log₁₀ UFC/mL mantenidos hasta las 48 h para todos los fagos. Estos resultados indican que, aunque en ausencia de desinfectante algunos fagos como VB_SAL{EIF_011 contribuyen adicionalmente a reducir la población de *Salmonella*, la aplicación de cloro a partir de 1 ppm domina el efecto bactericida y conduce a una reducción drástica y equivalente de la carga bacteriana, independientemente del fago utilizado.

La integración de los resultados de estabilidad fágica y reducción bacteriana evidencia que el desempeño de los bacteriófagos frente al estrés por cloro no solo condiciona su propia viabilidad, sino también su capacidad para disminuir la carga de *Salmonella*. En ausencia de cloro (0 ppm), los fagos mostraron diferencias marcadas en estabilidad a las 48 h, destacándose VB_SAL{EIF_009 y los fagos del grupo F8 como los más persistentes, mientras que VB_SAL{EIF_010 y VB_SAL{EIF_007 fueron los más susceptibles. Esta variabilidad en estabilidad se reflejó parcialmente en la reducción bacteriana: aunque todos los tratamientos partieron de aproximadamente 5 Log₁₀ UFC/mL, la disminución alcanzada a las 24-48 h fue moderada (3,23-4,95 Log₁₀ UFC/mL), siendo VB_SAL{EIF_011 el que mostró la mayor capacidad de control en ausencia de desinfectante (**Anexo 4 - Anexo 5**).

En contraste, en presencia de cloro (1-5 ppm), la carga bacteriana se redujo de manera drástica e independiente del fago utilizado, alcanzando valores cercanos a 0 Log₁₀ UFC/mL desde las 24 h. Esto indica que el efecto bactericida del cloro domina sobre la actividad fágica bajo estas condiciones, mientras que la estabilidad de los bacteriófagos se convierte en el criterio determinante para identificar candidatos robustos que puedan complementar o potenciar la acción del desinfectante.

Estudios recientes documentan la detección persistente de *S. Infantis* a lo largo de la línea de producción, incluso después de etapas críticas de higienización. En plantas de Sri Lanka donde se emplearon tanques de enfriamiento clorados (2-50 ppm de cloro), se encontró *S. Infantis* en 28,8% de los canales de pollo muestreados (**Weerasooriya et al., 2024**). Adicionalmente, se ha reportado el aislamiento de cepas de *S. Infantis* en superficies de instalaciones procesadoras después de ejecutar

procesos de limpieza y desinfección rutinarios, lo cual subraya su gran capacidad de supervivencia frente a protocolos sanitarios convencionales (Sevilla-Navarro et al., 2024). Un mecanismo clave de este comportamiento es su habilidad para formar biopelículas protectoras en diversas superficies industriales. El serovar *Infantis* ha demostrado una marcada capacidad de adhesión y formación de matrices en materiales habituales de las fábricas. Pruebas de laboratorio demostraron una adherencia significativamente mayor en superficies plásticas en comparación con acero inoxidable (Kranjc et al., 2024). Adicional a ello, ha sido descrito por McMillan et al. (2024) que las cepas epidémicas portadoras del megaplasmido *pESI* exhiben una elevada resistencia a agentes oxidantes, incluyendo desinfectantes como compuestos clorados. Plásmido que conocido por contribuir también a la multirresistencia antimicrobiana e incluso codifica genes asociados a tolerancia a metales pesados y sanitizantes químicos. La exposición de *S. Infantis* (con y sin *pESI*) a hipoclorito sódico por largos períodos de tiempo (condición simulada inmersión en chiller por 90 minutos) reveló susceptibilidad en todas. Sin embargo, exposiciones breves evidenciaron variabilidad en la supervivencia, sugiriendo que la eficacia depende críticamente del tiempo de contacto y las condiciones.

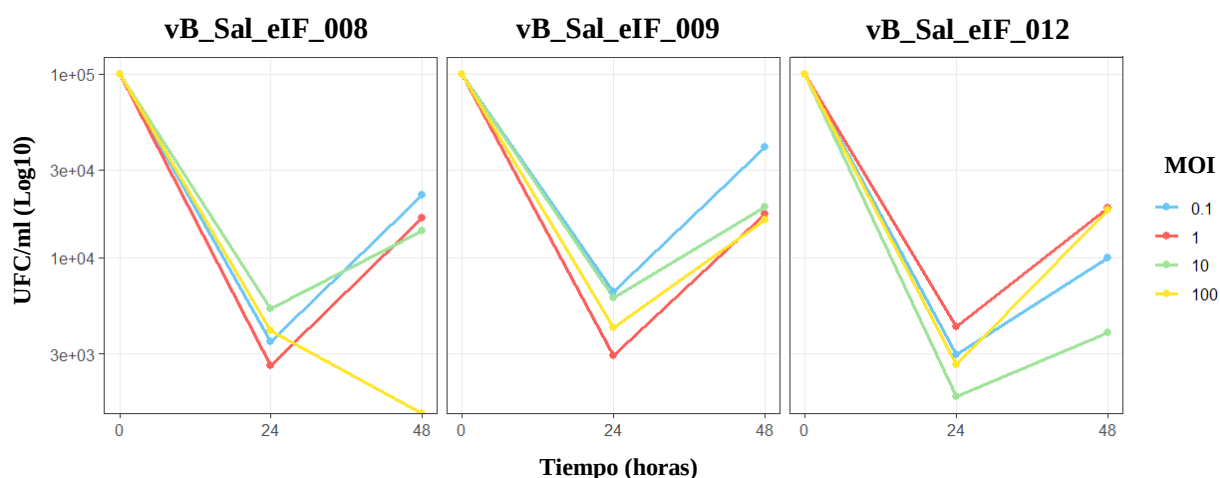
En conjunto, los resultados confirman que la estabilidad fágica frente al cloro depende de manera marcada de la interacción entre el tipo de fago, el tiempo de exposición y la concentración de cloro. La presencia de la bacteria hospedadora no promovió incrementos en el título fágico bajo condiciones de cloración, lo que evidencia que el efecto inhibitorio del cloro predomina sobre la replicación fágica. Tanto el tiempo como la concentración de cloro ejercieron efectos consistentes y combinados sobre la estabilidad de los bacteriófagos evaluados, reflejando una reducción progresiva en su viabilidad. Con base en los perfiles de estabilidad y supervivencia obtenidos, los fagos VB_SAL{EIF_008, VB_SAL{EIF_009 y VB_SAL{EIF_012 fueron identificados como los candidatos más adecuados para su inclusión en formulaciones de cócteles.

3.1.2.2 Determinación del MOI óptimo para cada fago frente a su hospedador sensible

La multiplicidad de infección (MOI) es fundamental en el diseño cócteles de bacteriófagos contra *Salmonella* en la industria avícola. Ya que se define como la proporción de virus por célula bacteriana, y su valor influye directamente en la eficiencia de la lisis bacteriana. Una dosificación inadecuada puede llegar a reducir la eficacia del tratamiento (Wiebe et al., 2024). Debido ello, la optimización del valor de MOI asegura la máxima reducción de *Salmonella* con el mínimo de fagos necesarios.

Figura 7

Efecto del MOI en la reducción de S. Infantis por los bacteriófagos vB_Sal_eIF_008, vB_Sal_eIF_009 y vB_Sal_eIF_012



Nota. Las curvas muestran la variación en la carga bacteriana (UFC/mL, Log₁₀) tras la infección con MOI 0.1, 1, 10 y 100 durante 0, 24 y 48 horas. Los patrones reflejan diferencias en la eficiencia lítica según la dosis de fago, destacando los MOI óptimos para maximizar la reducción bacteriana.

El análisis cuantitativo basado en medias marginales estimadas de la reducción bacteriana mostró dinámicas diferenciadas según el fago y el MOI evaluado. Para VB_SAL{EIF_008, en el tiempo 24 se registraron reducciones moderadas entre 1,28 y 1,59 Log₁₀ UFC/mL para los MOI 10, 0.1 y 1, mientras que el MOI 100 produjo una disminución comparable (1,40 Log₁₀). Sin embargo, al tiempo 48 las diferencias se marcaron. Los MOI 0.1, 1 y 10 mostraron reducciones limitadas de la biomasa bacteriana (0,69-0,86 Log₁₀), en contraste con el MOI 100, que alcanzó una reducción completa de 5 Log₁₀ UFC/mL, confirmando la significancia estadística detectada ($p < 0,0001$) (**Anexo 6**).

En VB_SAL{EIF_009, a las 24 horas las reducciones oscilaron entre 1,20 y 1,53 Log₁₀ UFC/mL para todos los MOI, siendo el MOI 1 significativamente más efectivo que el MOI 0.1 ($p = 0,047$). A las 48 horas, las reducciones disminuyeron para todos los tratamientos (0,41-0,80 Log₁₀). No se observaron diferencias entre los MOI 1, 10 y 100, que exhibieron eficiencias similares. Finalmente, el fago VB_SAL{EIF_012 alcanzó la mayor reducción a las 24 horas en condición de MOI 10 (1,76 Log₁₀ UFC/mL), superando a los MOI 1 (1,37 Log₁₀), 100 (1,65 Log₁₀) y 0.1 (1,53 Log₁₀). A las 48 horas, el MOI 10 volvió a ser el más eficiente (1,43 Log₁₀), superando estadísticamente a los MOI 1 y 100 ($p < 0,001$) (**Anexo 6**).

En conjunto, los datos obtenidos permitieron la determinación del MOI óptimo de cada uno de los fagos escogidos para la formación de cócteles. Es así como, VB_SAL{EIF_008 requiere MOI 100 para alcanzar reducciones máximas, VB_SAL{EIF_009 presenta respuestas equivalentes entre MOI 1-100, y VB_SAL{EIF_012 muestra eficacia de manera consistente con un MOI 10.

Constituye un parámetro crítico en la formulación de cócteles fágicos, ya que define la proporción promedio de viriones capaces de iniciar infección sobre la población bacteriana diana. Un MOI bajo implica que una fracción significativa de células no será alcanzada durante la exposición inicial, lo que permite su supervivencia y potencial replicación, reduciendo así la eficacia global del tratamiento. En contraste, un MOI elevado asegura que la mayoría de las bacterias sean atacadas simultáneamente, acelerando la lisis y favoreciendo una supresión más rápida del crecimiento microbiano (**Wiebe et al., 2024**). Sin embargo, diversos estudios de dinámica fago-huésped advierten que valores excesivamente altos pueden inducir “lisis desde fuera”, un proceso en el cual la adsorción masiva de partículas provoca la ruptura inmediata de la célula sin permitir la producción intracelular de nuevos viriones, comprometiendo la amplificación fágica y, por ende, la sostenibilidad del tratamiento (**J. Silva et al., 2021**).

Battistelli et al. (2024) evaluaron dos fagos líticos aislados de entornos avícolas y analizó su actividad a diferentes relaciones fago-bacteria, identificando un MOI óptimo de 0,1 como la condición que produjo la mayor reducción de la viabilidad bacteriana. A este MOI, los conteos de *S. Infantis* disminuyeron entre 2,2 y 3,4 Log₁₀ UFC/mL durante las primeras dos horas y se mantuvieron significativamente por debajo del control hasta al menos 24 horas posteriores al tratamiento. De manera notable, ni los MOI inferiores ni los superiores (1, 10 o 100) superaron la eficacia obtenida a 0,1. Asimismo, los autores reportaron una mayor capacidad de replicación fágica en esta condición, alcanzando títulos aproximados de 10^{10,5}-10¹¹ PFU/mL en seis horas, superiores a los registrados a MOI más altos, donde la eliminación acelerada de las células hospedadoras limitó la amplificación viral.

Dentro de ciertos rangos, el incremento del MOI puede potenciar la lisis de *Salmonella*. **A. R. Costa et al. (2025)** evaluaron varios bacteriófagos dirigidos contra patógenos alimentarios, incluidos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Las observaciones indican una asociación entre una mayor multiplicidad de infección con un aumento significativo en la eficiencia lítica. En sus ensayos, todos los fagos lograron disminuir de manera sustancial las cargas bacterianas de sus hospedadores, alcanzando reducciones máximas de aproximadamente 3,7 a 5,6 Log₁₀ UFC en un periodo cercano a 10 horas con la aplicación de MOI elevados. Cabe señalar que el incremento del MOI no conduce

indefinidamente a mejoras adicionales, ya que el sistema puede presentar rendimientos decrecientes. Una vez infectada la totalidad de células diana, la adición de más partículas fágicas no incrementa la lisis (**Battistelli et al., 2024**).

Los estudios recientes indican que los MOI bajos pueden ser eficaces cuando se dispone de tiempo suficiente para la replicación fágica. **Gvaladze et al. (2023)** demostraron que un cóctel de cinco fagos dirigido contra diversos serotipos de *Salmonella*, incluido *S. Infantis*, logró reducir de manera medible las poblaciones bacterianas incluso a un MOI extremadamente bajo de 0,001, especialmente a 25 °C, donde el crecimiento lento de las bacterias permitió la amplificación progresiva de los viriones. Con un cóctel a MOI 0,1, la eliminación fue aún más eficiente, alcanzando reducciones de hasta 5 Log₁₀ en seis horas a temperatura ambiente, mientras que a 8 °C se observaron disminuciones de aproximadamente 1,7 Log₁₀ en 40 horas.

3.1.3. Identificación de combinaciones de bacteriófagos con capacidad lítica complementaria y estabilidad funcional en condiciones simuladas para su posterior análisis de eficacia y efectividad

La formulación de cócteles de bacteriófagos constituye una estrategia ampliamente respaldada para mejorar la eficacia y robustez de las intervenciones basadas en fagos frente a patógenos bacterianos. A diferencia del uso de un fago individual, los cócteles integran múltiples agentes líticos con espectros de acción complementarios, lo que permite ampliar la cobertura frente a variantes bacterianas heterogéneas, reducir la probabilidad de aparición de mutantes resistentes y favorecer una actividad lítica sostenida bajo diversas condiciones ambientales (**Subedi et al., 2025**). Un enfoque que se ha consolidado como una práctica esencial para diversas aplicaciones industriales, donde la variabilidad genética de los patógenos y las fluctuaciones del entorno pueden comprometer la efectividad de tratamientos monofágicos (**Zhang et al., 2025**). En este contexto, la identificación racional de combinaciones sinérgicas y funcionalmente estables representa un paso crítico para garantizar la eficiencia de los cócteles antes de su evaluación experimental.

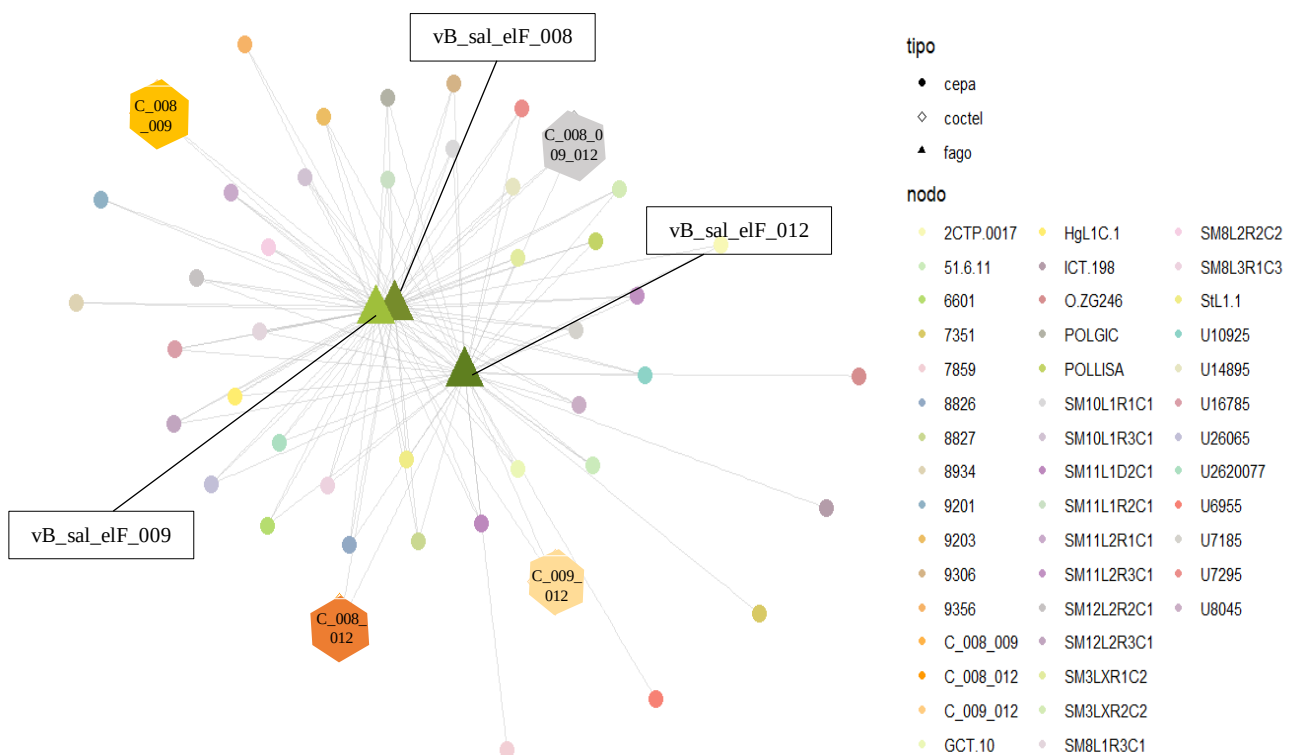
3.1.3.1. Formulación de mezclas experimentales de fagos en diferentes combinaciones

El diseño de combinaciones fágicas se fundamentó en criterios experimentales derivados del análisis de la capacidad lítica individual de los fagos VB_SAL{EIF_008, VB_SAL{EIF_009 y VB_SAL{EIF_011, así como de su estabilidad y comportamiento cinético en condiciones simuladas de

procesamiento avícola. Los resultados mostraron patrones de reducción diferenciados según el MOI y el tiempo, VB_SAL{EIF_008 alcanzó reducciones de hasta 5 Log₁₀ UFC/mL con MOI 100, VB_SAL{EIF_009 mantuvo una actividad estable en rangos intermedios de MOI, y VB_SAL{EIF_011 evidenció un rendimiento superior con MOI 10, con reducciones de hasta 1,76 Log₁₀ a las 24 horas. Estas diferencias, sumadas a la complementariedad en los perfiles de lisis representados en la **Figura 3** y la necesidad de mitigar el riesgo de resistencia bacteriana, guiaron la selección de combinaciones binarias (VB_SAL{EIF_008+VB_SAL{EIF_009, VB_SAL{EIF_008+VB_SAL{EIF_011, VB_SAL{EIF_009+VB_SAL{EIF_011) y un cóctel ternario (VB_SAL{EIF_008+VB_SAL{EIF_009+VB_SAL{EIF_011). De este modo, el diseño integró tanto la potencia lítica individual como la contribución estratégica de cada fago a la cobertura global.

Figura 8

Red de interacción entre fagos, cócteles formulados y cepas de S. Infantis.



Nota. El grafico muestra las conexiones entre los bacteriófagos individuales (triángulos), los cócteles formulados (polígonos) y las cepas de S. Infantis (círculos). Cada arista representa un evento de infección o susceptibilidad, permitiendo visualizar la amplitud de hospedadores, solapamiento entre fagos y el grado de cobertura proporcionado por cada cóctel.

La red bipartita de la **Figura 8** se utilizó para visualizar la interacción entre los bacteriófagos seleccionados (triángulos verdes), las cepas de *S. Infantis* evaluadas (nodos circulares) y las combinaciones fágicas formuladas experimentalmente (polígonos). Cada arista representa un evento de sensibilidad, lo que permite identificar patrones de conexión y redundancia funcional dentro del sistema. Se evidencia solapamiento entre los fagos VB_SAL{EIF_008, VB_SAL{EIF_009, lo cual indica espectros de lisis similares entre ambos. A diferencia de VB_SAL{EIF_011 el cual muestran grados variables de conectividad y en su espectro de hospedadores. Lo cual lo convierte en un agente complementario adecuado. Aspecto fundamental para diseñar cócteles robustos. La ubicación central de los fagos y la distribución periférica de las cepas reflejan que la mayor parte de los perfiles de sensibilidad se concentran en puntos comunes, mientras que algunos nodos periféricos corresponden a cepas más restringidas, cuya cobertura depende de combinaciones específicas.

Los nodos poligonales correspondientes a los cócteles muestran una mayor conectividad en comparación con los fagos individuales, indicando que la integración de dos o más fagos incrementa el número total de cepas susceptibles. El aumento de cobertura refleja la complementariedad lítica a la vez que respalda la estrategia de combinar fagos con espectros parcialmente solapados para minimizar la probabilidad de aparición de clones resistentes. En conjunto, la figura evidencia que la formulación de cócteles responde a una selección racional basada integración estratégica de los patrones de sensibilidad observados en la red de interacciones.

A nivel general, la formulación de cócteles fágicos en contexto avícola requiere integrar criterios de selección estrictos, perfiles de huésped cuantitativos y principios de diseño que prevengan la emergencia de resistencia. La literatura enfatiza que los cócteles deben basarse exclusivamente en fagos líticos con genomas libres de genes de lisogenia o factores de virulencia (**T. Brenner et al., 2020**). Su selección se basa en una actividad lítica robusta y su capacidad de amplificación a escala operativa. Criterios que se complementan con la necesidad de evaluar estabilidad funcional frente a pH, temperatura y condiciones propias del procesamiento avícola (**Torkashvand et al., 2024**). Desde esta perspectiva amplia, la formulación se entiende como un proceso basado tanto en seguridad genómica como en viabilidad biofísica.

Sobre esta base conceptual, el análisis del rango de huésped se convierte en el eje que define la cobertura real del cóctel. El uso de paneles representativos de *S. Infantis* procedentes de ambientes diversos permite cuantificar la eficacia comparativa de cada fago (**T. Brenner et al., 2020**). Estos ensayos permiten identificar solapamientos funcionales, susceptibilidades diferenciales y patrones de

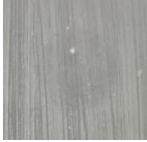
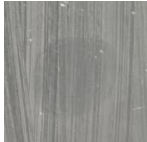
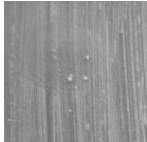
resistencia cruzada que deben evitarse durante la etapa de combinación **(Aguilera et al., 2023)**. Así, la caracterización fenotípica y molecular del huésped actúa como filtro que orienta la selección hacia combinaciones efectivamente complementarias.

Finalmente, los principios específicos de sinergia y estabilidad determinan qué fagos pasan de candidatos individuales a componentes reales del cóctel. La evidencia demuestra que combinar fagos que reconocen receptores distintos mejora la cobertura acumulativa y reduce la probabilidad de aparición de mutantes resistentes **(Sevilla-Navarro et al., 2024)**. Mientras que la evaluación empírica de pares y tríos permite descartar interacciones antagonistas **(T. Brenner et al., 2020)**. Al mismo tiempo, los filtros de estabilidad como suelen ser pH, temperatura, salinidad, encapsulación y almacenamiento, deben aplicarse antes de definir la mezcla final para asegurar que todos los componentes mantienen su actividad bajo condiciones reales **(Aguilera et al., 2023)**. El diseño experimental óptimo se plantea como un proceso iterativo donde cribado, evaluación funcional, resistencia cruzada y estabilidad se integran de manera secuencial hasta converger en un cóctel mínimo, eficaz y estable **(T. Brenner et al., 2020)**.

3.1.3.2. Evaluación de la eficacia del cóctel frente al panel de cepas

Las cepas empleadas en la evaluación de eficacia fueron seleccionadas previamente a partir del ensayo de sensibilidad antimicrobiana mediante el método de Kirby-Bauer aplicado a la colección inicial de aislados **(Tabla 4)**. Con base en estos resultados, se eligió una cepa representativa de los clados principales, priorizando aquellas que presentan mayores perfiles de resistencia, con el propósito de incluir en el análisis a variantes con características fenotípicas contrastantes. Enfoque que permitió evaluar la eficacia del cóctel fágico frente a cepas con múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos, asegurando que la formulación propuesta fuera evaluada bajo un escenario de relevancia industrial.

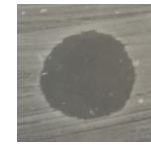
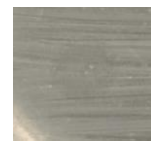
Tabla 6*Cobertura de infección de los cócteles de bacteriófagos frente a S. Infantis*

Cepa	Clado	Tratamiento	Imagen de lisis	Lisis cualitativa	Interpretación
U7195	C3	C_008_009		+	Baja eficacia
U7195	C3	C_008_012		+	Actividad moderada
U7195	C3	C_009_012		**	Crecimiento bacteriano
U7195	C3	C_008_009_012		+	Baja eficacia
U9306	C4	C_008_009		+	Baja eficacia
U9306	C4	C_008_012		++	Actividad moderada
U9306	C4	C_009_012		+	Baja eficacia

Continúa

Tabla 6

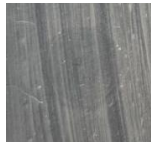
Cobertura de infección de los cócteles de bacteriófagos frente a S. Infantis.

Cepa	Clado	Tratamiento	Imagen de lisis	Lisis cualitativa	Interpretación
U9306	C4	C_008_009_012		++	Actividad moderada
SM11L2R1C1	C9	C_008_009		+++	Efecto potenciado
SM11L2R1C1	C9	C_008_012		*	Buena eficacia
SM11L2R1C1	C9	C_009_012		**	Crecimiento bacteriano
SM11L2R1C1	C9	C_008_009_012		+++	Efecto potenciado
U7195_ U9306_ SM11L2R1C1	C3_C4_C9	C_008_009		+	Baja eficacia
U7195_ U9306_ SM11L2R1C1	C3_C4_C9	C_008_012		+	Baja eficacia
U7195_ U9306_ SM11L2R1C1	C3_C4_C9	C_009_012		++	Actividad moderada

Continúa

Tabla 6

Cobertura de infección de los cócteles de bacteriófagos frente a S. Infantis.

Cepa	Clado	Tratamiento	Imagen de lisis	Lisis cualitativa	Interpretación
U9306	C4	C_008_009_012		++	Actividad moderada

Nota. La clasificación cualitativa de la lisis se determinó a partir del patrón de aclaramiento observado en las placas tratadas con los distintos cócteles fágicos. Los niveles de actividad (+, ++, +++) corresponden a incrementos graduales en la intensidad de lisis, interpretados como baja, moderada o alta eficacia, respectivamente. Las imágenes adjuntas ilustran la morfología típica de la zona de lisis asociada a cada tratamiento.

La evaluación cualitativa del efecto lítico de los diferentes cócteles fágicos reveló variaciones marcadas entre las cepas analizadas y entre los tratamientos aplicados. En la cepa U7195, perteneciente al clado C3, se observó predominantemente un patrón de baja a moderada eficacia. Los tratamientos C_008_009 y C_008_012 generaron un aclaramiento tenue en la superficie del agar, clasificado como +, lo que se traduce en lisis limitada. El cóctel C_008_009_012 mostró un nivel ligeramente superior (++), indicando una lisis moderada, aunque sin alcanzar niveles destacados. No obstante, el cóctel C_009_012 llamó la atención al presentar un crecimiento bacteriano evidente (**), lo que indica ausencia de actividad lítica sobre esta cepa en particular.

En la cepa U9306, clasificada dentro del clado C4, se observó un comportamiento similar al de U7195, caracterizado por una eficacia limitada en la mayoría de los tratamientos. El cóctel C_008_009 produjo únicamente un nivel bajo de aclaramiento (+), mientras que C_009_012 mostró un efecto comparable, también clasificado como baja lisis. En contraste, el cóctel C_008_009_012 generó una respuesta más evidente (++), indicando una lisis moderada y superando a los tratamientos individuales. Aun así, ninguno de los tratamientos evaluados logró inducir un efecto lítico de alto nivel (+++) en esta cepa, lo que sugiere que U9306 presenta una susceptibilidad intermedia frente a las combinaciones experimentales.

Por otro lado, la cepa SM11L2R1C1, perteneciente al clado C9, mostró los niveles más altos de susceptibilidad frente a los cócteles fágicos. El tratamiento C_008_009 produjo un aclaramiento

amplio e intenso, clasificado como +++, lo que representa un efecto lítico potenciado. La combinación C_008_009_012 también alcanzó un nivel equivalente (+++). El cóctel C_008_012 mostró buena eficacia con un nivel intermedio de aclaramiento (*), mientras que C_009_012 presentó un patrón de crecimiento bacteriano con morfología de anillo (**), evidenciando una respuesta heterogénea según la combinación aplicada.

Finalmente, al evaluar el efecto lítico sobre la mezcla de cepas U7195-U9306-SM11L2R1C1 (clados C3_C4_C9), se registró únicamente una lisis baja (+) frente al cóctel C_008_009, sugiriendo que, cuando las tres cepas están presentes simultáneamente, el efecto del tratamiento es menos evidente que cuando se examinan por separado. En conjunto, estos resultados evidencian patrones de susceptibilidad específicos por clado, destacando que los cócteles basados en C_008_009 y C_008_009_012 presentan el mayor potencial lítico, especialmente frente a cepas del clado C9, mientras que las cepas de clados C3 y C4 muestran respuestas más limitadas o heterogéneas.

La combinación C_009_012 con SM11L2R1C1 como hospedador resalta entre los resultados por su morfología. Se conforma de dos fagos que exhiben alta eficiencia lítica de manera individual pero que en conjunto generó un patrón que coincide con la morfología tipo bull's-eye descrita por Mitarai et al. (2016) para ciertos mutantes bacterianos bajo condiciones de alta carga fágica. La literatura señala que esta morfología se caracteriza por un núcleo central con elevada densidad de colonias sobrevivientes, seguido de una zona de agotamiento, un segundo anillo de alta densidad y finalmente un halo claro en la periferia, lo que refleja interacciones espaciales complejas entre infección, replicación fágica y crecimiento bacteriano (**Kaiser, 1955**).

Al combinar fagos, pueden darse efectos sinérgicos o antagónicos. La sinergia suele lograrse cuando los fagos atacan al huésped por vías distintas o eliminando bacterias resistentes generadas contra el otro fago. Los efectos sinérgicos se evidencian cuando la actividad de un fago dentro del cóctel potencia la eficacia de otro. Un ejemplo frecuente se observa en fagos que producen enzimas de polimerasas capaces de degradar cápsulas o exopolisacáridos, lo que elimina barreras físicas que inicialmente impiden la adsorción fágica. Al remover estas estructuras protectoras, dichos fagos facilitan que otros integrantes del cóctel infecten bacterias previamente inaccesibles, produciendo una lisis más completa del cultivo y en los ensayos de placa, halos de inhibición más amplios y homogéneos (**Chen et al., 2024**).

En cambio, el antagonismo fágico ocurre si los virus interfieren entre sí durante la infección de la misma célula. Estudios recientes enfatizan que las interacciones fago-fago pueden alterar el desempeño esperado de un cóctel debido a la competencia por recursos celulares durante infecciones. La coinfección bacteriana por dos o más fagos puede generar diversos mecanismos antagonistas que reducen la eficacia lítica del cóctel. Entre ellos destacan la exclusión por receptor o inmunidad de superinfección, donde la infección inicial vuelve a la célula refractaria a otros fagos, produciendo subpoblaciones no lisadas (**Molina et al., 2022**). A nivel intracelular, múltiples genomas virales compiten por la maquinaria bacteriana y a MOI elevados, disminuye tanto la probabilidad de entrada como la velocidad de replicación de cada fago, retrasando o incompletando la lisis y originando patrones anulares o zonas de aclaramiento parcial en los ensayos de placa (**Nguyen et al., 2023**).

Niu et al. (2021) han demostrado que ciertas combinaciones fágicas presentan antagonismo medible, con placas más turbias y menor lisis total en comparación con cada fago por separado al trabajar con *Escherichia coli*. Concentraciones extremadamente altas pueden inducir lisis desde fuera, donde el daño de membrana mata la célula sin producción de nuevos viriones, generando halos difusos y ausencia de placas definidas, lo que evidencia que la coinfección excesiva puede deteriorar la propagación fágica en lugar de potenciarla (**Panteleev et al., 2025**).

La aparición del patrón *bull's-eye* podría explicarse por la interacción combinada de los dos fagos, que al infectar simultáneamente podrían generar zonas de rápida depleción bacteriana seguidas de regiones donde la replicación fágica disminuye por limitaciones de nutrientes o por estructuras bacterianas más difíciles de colonizar, permitiendo la reaparición de microcolonias y la formación de anillos concéntricos (**Mitarai et al., 2016**). Este resultado indica que, aun cuando los fagos son estrictamente líticos y efectivos de forma individual, su coaplicación puede producir dinámicas espaciales no lineales, subpoblaciones bacterianas transitoriamente tolerantes y patrones de infección que evidencian comportamientos emergentes propios de sistemas ecológicos estructurados, lo cual subraya la importancia de evaluar la sinergia fágica no solo en términos de actividad lítica global sino también mediante análisis finos de morfología de placa y dinámica espacial.

3.1.3.3. Medición de la estabilidad de los cócteles en condiciones de refrigeración, cloro y la multiplicidad de infección (MOI)

En esta sección se evaluó la estabilidad de los cócteles fágicos C_008_009, C_008_012, C_009_012 y C_009_008_012 bajo condiciones que simulan la cadena de frío avícola, combinando diferentes concentraciones de cloro residual (0, 1, 3 y 5 ppm), distintos tiempos de almacenamiento (0, 24, 48 horas) y a un MOI de 100. Se cuantificó de forma paralela la carga de los fagos (Log_{10} PFU/mL) y la carga de *S. Infantis* (Log_{10} UFC/mL), aplicando un ANOVA multifactorial con pruebas post hoc de medias marginales estimadas con test HSD de Tukey para determinar el efecto del tiempo, la concentración de cloro y su interacción sobre ambos parámetros. Los resultados de la estabilidad fágica se resumen en la **Figura 9**, donde se observa que en general, los títulos de los cócteles se mantuvieron elevados ($\approx 8 - 9 \text{ Log}_{10}$ PFU/mL) tras 48 horas, en presencia de cloro con reducciones inferiores a 1 Log_{10} en la mayoría de los cócteles.

En el cóctel C_008_009 (**Figura 9A**) los títulos iniciales se situaron alrededor de 9,2-9,3 Log_{10} PFU/mL para todas las concentraciones de cloro. A lo largo de las 24 horas, los valores se mantuvieron prácticamente inalterados, sin diferencias significativas entre 0, 1, 3 y 5 ppm ni entre 0 y 24 horas, lo que concuerda con el ANOVA, donde el factor de los ppm resultó no significativo y las comparaciones de Tukey entre niveles de cloro muestran valores ajustados de $p > 0,05$ en casi todos los casos (**Anexo 7**). El efecto del tiempo sí fue estadísticamente significativo en el modelo, pero se concentró principalmente en el contraste entre 0 y 48 h, a las 48 h se observó una disminución marcada del título en la condición 0 ppm ($\approx 5,7 \text{ Log}_{10}$ PFU/mL), mientras que en 1-5 ppm el descenso fue moderado ($\approx 0,3-1 \text{ Log}_{10}$). Esta caída puntual en 0 ppm podría estar relacionada con variabilidad experimental o con una mayor adsorción del fago a superficies en ausencia de cloro, ya que no se replica con igual intensidad en las demás concentraciones. En conjunto, C_008_009 se comporta como un cóctel relativamente estable frente al cloro en el rango 1-5 ppm y moderadamente afectado por la prolongación del tiempo de almacenamiento.

Para el cóctel C_008_012 (**Figura 9B**) se aprecia un patrón un poco más dinámico. Los títulos a tiempo 0 se mantienen cercanos a 9,1 Log_{10} PFU/mL en todas las concentraciones, pero a medida que avanzan las 24 y 48 h se observa una disminución progresiva, particularmente evidente a 3 y 5 ppm. El ANOVA confirma este comportamiento, tanto los ppm, el tiempo y su interacción fueron significativos, con tamaños de efecto elevados (η^2 alta para el tiempo y la interacción). Las comparaciones de Tukey muestran diferencias significativas ($p < 0,05-0,001$) entre 0 y 48 h en las condiciones de 3 y 5 ppm, lo

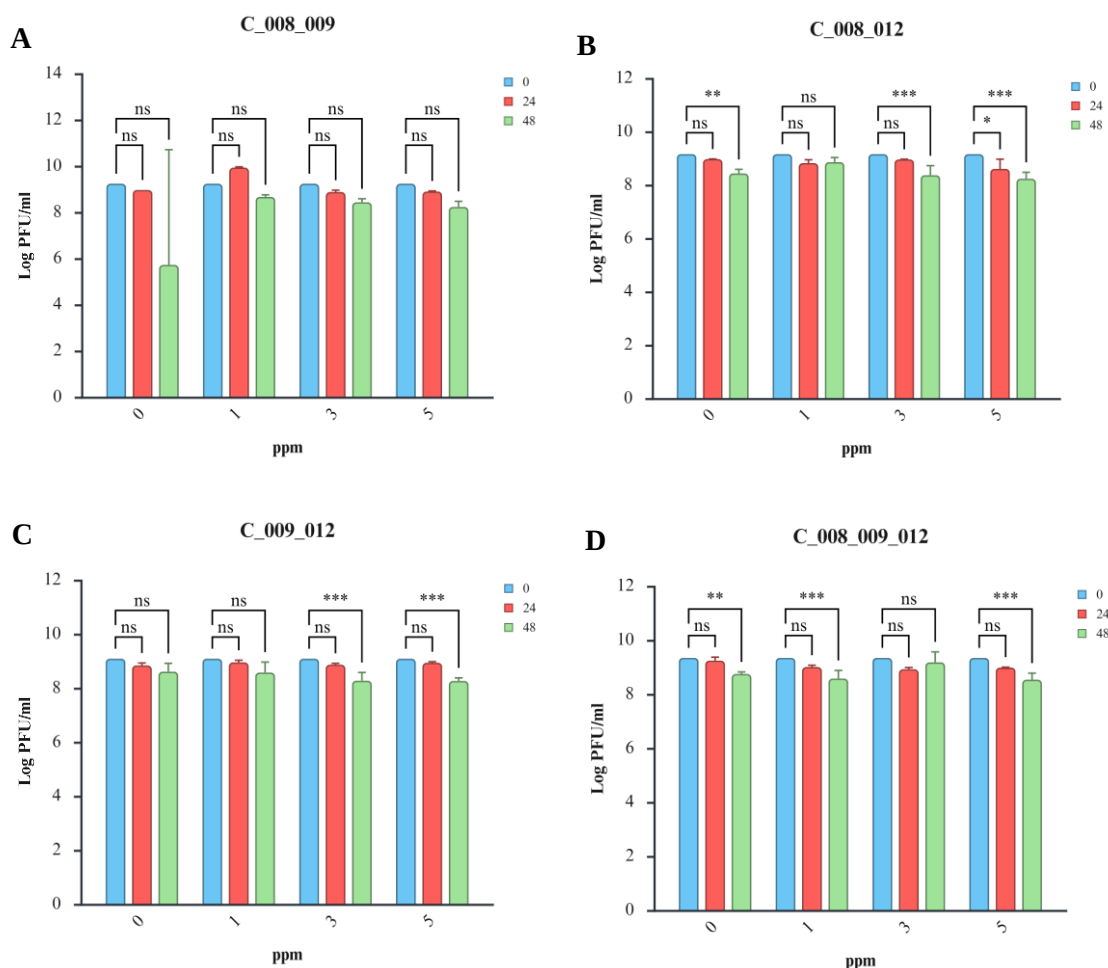
que explica los asteriscos visibles en la **Figura 9B (Anexo 7)**. En términos prácticos, C_008_012 mantiene títulos altos ($> 8,2-8,6 \text{ Log}_{10} \text{ PFU/mL}$) pero es el cóctel donde más claramente se ve que el aumento de cloro y el tiempo prolongado actúan de manera conjunta, reduciendo cerca de 1 Log_{10} el título en las condiciones más exigentes (3-5 ppm, 48 h). Esto sugiere que al menos uno de los fagos de la mezcla es algo más sensible a la combinación de estrés químico y frío, aunque la magnitud de la pérdida sigue siendo moderada.

Referente al cóctel C_009_012 (**Figura 9C**) la respuesta al cloro es todavía más homogénea. Los títulos iniciales rondan los $9,1 \text{ Log}_{10} \text{ PFU/mL}$, aunque se observa una reducción gradual con el tiempo, esta es bastante similar en todas las concentraciones de cloro, a las 48 h los valores se sitúan alrededor de $8,3$ y $8,6 \text{ Log}_{10} \text{ PFU/mL}$. El ANOVA refleja que el factor tiempo es altamente significativo, mientras que los ppm y la interacción no alcanzan una significancia. En consecuencia, los asteriscos del gráfico se concentran en los contrastes entre 0 y 48 h, independientemente de la concentración de cloro, y no entre distintos niveles de ppm para un mismo tiempo. En otras palabras, C_009_012 es muy estable frente al gradiente de cloro de 0-5 ppm, y el ligero descenso observado se atribuye principalmente al almacenamiento prolongado a 4°C . El hecho de que la influencia del cloro sea mínima sugiere que los fagos que componen este cóctel tienen una buena tolerancia a las condiciones de desinfección.

Como última mezcla tenemos al cóctel C_008_009_012 (**Figura 9D**), combina los tres fagos previos y muestra un comportamiento intermedio, pero con una interacción estadística muy marcada. El ANOVA indica efectos significativos de los ppm, tiempo y de forma muy destacada la interacción $\text{ppm} \times \text{tiempo}$ ($\eta^2 \approx 0,52$), lo que significa que el impacto del tiempo depende del nivel de cloro y viceversa (**Anexo 7**). Visualmente, los títulos permanecen prácticamente inalterados entre 0 y 24 h en todo el rango de 0-5 ppm ($\approx 9,0-9,3 \text{ Log}_{10} \text{ PFU/mL}$), mientras que a las 48 h se observa un descenso coherente en todas las concentraciones, algo más acentuado en 3 y 5 ppm ($\approx 8,6-8,8 \text{ Log}_{10} \text{ PFU/mL}$). Las comparaciones de Tukey respaldan este patrón, los contrastes significativos se concentran entre 0, 24 h y 48 h, sobre todo a mayor ppm, lo que explica la presencia de asteriscos en esos pares de barras. Desde el punto de vista funcional, este resultado indica que el cóctel triple mantiene una elevada estabilidad global y que, aun cuando el cloro y el tiempo interactúan reduciendo el título, la pérdida absoluta es relativamente pequeña ($< 1 \text{ Log}_{10}$) si se parte de un MOI alto como el utilizado en este ensayo.

Figura 9

Cinéticas de estabilidad del cóctel de bacteriófagos frente a diferentes concentraciones de cloro y tiempos de incubación



Nota. Las barras muestran los títulos del cóctel de bacteriófagos (Log_{10} PFU/mL) para C_008_009 (A), C_008_012 (B), C_009_012 (C) y C_008_009_012 (D), incubados en soluciones con 0, 1, 3 y 5 ppm de cloro y evaluados a 0, 24 y 48 h, los datos corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes.

La estabilidad observada concuerda con estudios recientes que indican que muchos fagos toleran bien temperaturas de refrigeración y rangos moderados de estrés químico (Pan et al., 2023). Phuong et al. (2022) demostraron que los fagos de *Salmonella* mantenidos en medios a 4 °C conservan títulos elevados durante semanas, con pérdidas inferiores a 1 Log_{10} en la mayoría de las condiciones. Una investigación reciente sobre estabilidad de bacteriófagos se concluye que, siempre que se controle el pH y la matriz, la mayoría de los fagos destinados a aplicaciones industriales son robustos frente a las temperaturas típicas de procesamiento y almacenamiento de alimentos (Braz et al., 2025).

Los resultados de este trabajo muestran que el cóctel fágico formulado ofrece claras ventajas frente al uso de fagos individuales evaluados en la **Figura 5**, aun cuando ambos ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones de cloro y refrigeración. Los fagos simples expuestos a cloro presentaron una supervivencia muy limitada, los títulos virales cayeron rápidamente y aunque se logró una fuerte reducción inicial de *S. Infantis*, los fagos también se vieron afectados. En cambio, en la **Figura 9** la combinación de varios fagos complementarios aplicada a un MOI alto permitió mantener títulos estables en su mayoría de tiempo.

Este tipo comportamiento de los cócteles se da al mezclar fagos con distintos rangos de hospedadores y diferentes mecanismos de reconocimiento, ya que se amplía el espectro de cepas lisadas, se introduce redundancia funcional (si uno es inactivado por el cloro, otros continúan infectando) y se reduce la probabilidad de que surjan rápidamente mutantes resistentes a todos los componentes simultáneamente (**P. Costa et al., 2025**). Estudios recientes en *Salmonella* confirman estas ventajas, ya que cócteles de varios fagos han logrado reducciones de hasta 3 Log₁₀ en piel de pollo y acero inoxidable, superando el desempeño de fagos individuales frente a mezclas de serotipos y manteniendo la eficacia en condiciones de postcosecha comparables a las de la industria avícola (**Pelyuntha & Vongkamjan, 2023**).

Un metaanálisis reciente en carne de pollo mostró que, por cada incremento en la dosis fágica, la reducción de *Salmonella* aumenta de manera significativa, lo que respalda la decisión de trabajar con MOI elevados en formulaciones tipo cóctel (**Shahdadi et al., 2023**). En lo referente a los cócteles fágicos se mantuvieron prácticamente dentro de la misma magnitud, esto respalda que las formulaciones seleccionadas son lo suficiente estables para coexistir con desinfectantes basados en cloro y en condiciones de frío.

En esta sección se analizó el efecto de los cuatro cócteles fágicos (C_008_009, C_008_012, C_009_012 y C_008_009_012) sobre la supervivencia de *S. Infantis* multirresistente bajo condiciones que simulan la etapa de enfriamiento de canales avícolas. A partir de los recuentos expresados en Log₁₀ UFC/mL y del análisis estadístico (ANOVA multifactorial con pruebas post hoc de medias marginales estimadas con test HSD de Tukey), se evaluó tanto la capacidad de cada cóctel para reducir la carga bacteriana en el tiempo como la posible interacción entre la dosis de cloro y la permanencia del tratamiento. De este modo, se comparó el desempeño relativo de las diferentes combinaciones de fagos, identificando aquellas condiciones en las que se alcanzan las mayores reducciones de *S. Infantis* y que resultan más prometedoras para su aplicación en la cadena avícola.

En este cóctel C_008_009 (**Figura 10A**), el tiempo de exposición es claramente el factor dominante sobre la carga de *S. Infantis*, el tiempo presentó $p<0,0001$ y $\eta^2\approx 0,84$, mientras que la concentración de cloro tuvo un efecto principal muy limitado (ppm $p\approx 0,58$; $\eta^2\approx 0,08$), aunque se detectó una interacción ppm×tiempo moderada ($p\approx 0,012$; $\eta^2\approx 0,47$) (**Anexo 8**). Todas las condiciones iniciales se situaron alrededor de 5,0 Log₁₀ UFC/mL y, tras 48 h, se observaron reducciones de aproximadamente 1,2-2,0 Log₁₀ UFC/mL, con el valor mínimo en 1 ppm-48 h (~2,9 Log₁₀ UFC/mL), mientras que 0, 3 y 5 ppm quedaron en torno a 3,6-3,8 Log₁₀ UFC/mL.

La prueba de Tukey confirma que las comparaciones que involucran 1 ppm-48 h frente a los tiempos iniciales son las más significativas ($p<0,01$ -0,0001), lo que indica que este cóctel reduce de forma consistente la población bacteriana fundamentalmente por el efecto acumulado del tiempo, con una ligera mejora en torno a 1 ppm de cloro, pero sin un gradiente claro de beneficio al incrementar la concentración hasta 3-5 ppm (**Anexo 10**). En términos aplicados, esto sugiere que C_008_009 puede contribuir a disminuir la carga inicial de *S. Infantis* en condiciones de refrigeración, aunque su desempeño no depende fuertemente de la dosis de cloro utilizada dentro del rango evaluado.

En C_008_012 (**Figura 10B**), tanto el cloro como el tiempo influyen de manera marcada en la respuesta bacteriana, los ppm mostraron $p<0,0001$ y $\eta^2\approx 0,74$, tiempo $p<0,0001$ y $\eta^2\approx 0,91$, y la interacción ppm×tiempo $p\approx 0,008$; $\eta^2\approx 0,49$ (**Anexo 8 y Anexo 10**). Los recuentos de *S. Infantis* partieron de alrededor de 5,0 Log₁₀ UFC/mL y descendieron hasta valores comprendidos entre 3,2 y 3,9 Log₁₀ UFC/mL a las 48 h, dibujando un gradiente dosis-respuesta en el que las condiciones de 3 ppm y de 5 ppm alcanzan los recuentos más bajos (~3,27 Log₁₀ UFC/mL en 5 ppm-48 h), mientras que 0 ppm-48 h se mantiene más alto (~3,75 Log₁₀ UFC/mL).

El Tukey muestra diferencias significativas entre 0 ppm y 3-5 ppm a 24 y 48 h ($p<0,001$ -0,0001), evidenciando que este cóctel responde particularmente bien a concentraciones medias-altas de cloro (**Anexo 9**). En conjunto, C_008_012 se comporta como un cóctel cuya eficacia se ve claramente potenciada por el desinfectante, la combinación de tiempos prolongados de refrigeración y a la exposición a 3-5 ppm de cloro permite maximizar la reducción de *S. Infantis* (~1,5-2,0 Log₁₀ UFC/mL), lo que resulta especialmente relevante para aplicaciones en etapas de enfriamiento donde se trabaja con cloro residual.

Para C_009_012 (**Figura 10C**), se repite un patrón de fuerte dependencia de ambos factores, aunque con una respuesta menos lineal a la dosis de cloro, ppm presentó $p < 0,0001$ y $\eta^2 \approx 0,74$, tiempo $p < 0,0001$ y $\eta^2 \approx 0,91$ la interacción ppm×tiempo $p < 0,0001$ y $\eta^2 \approx 0,61$ (**Anexo 9**). En ausencia de cloro (0 ppm), la reducción con el tiempo es moderada (de $\approx 5,0$ a $\sim 4,44$ Log₁₀ UFC/mL a las 48 h), mientras que a 1 y sobre todo 3 ppm-48 h los recuentos descienden hasta $\sim 3,7$ y $\sim 3,14$ Log₁₀ UFC/mL, esto supone reducciones cercanas a 2,0 Log₁₀ UFC/mL. En cambio, 5 ppm-48 h se mantiene alrededor de 3,4-3,5 Log₁₀ UFC/mL.

El análisis de Tukey confirma que las comparaciones que involucran 3 ppm-48 h frente a concentraciones más bajas son altamente significativas ($p < 0,0001$), mientras que 5 ppm no mejora de forma consistente la reducción alcanzada a 3 ppm (**Anexo 9**). De este modo, C_009_012 parece presentar una ventana óptima alrededor de 3 ppm de cloro, en la cual se obtiene el máximo efecto bactericida conjunto (fago + cloro), mientras que el incremento a 5 ppm no se traduce en una ganancia adicional proporcional en términos de disminución de *S. Infantis*.

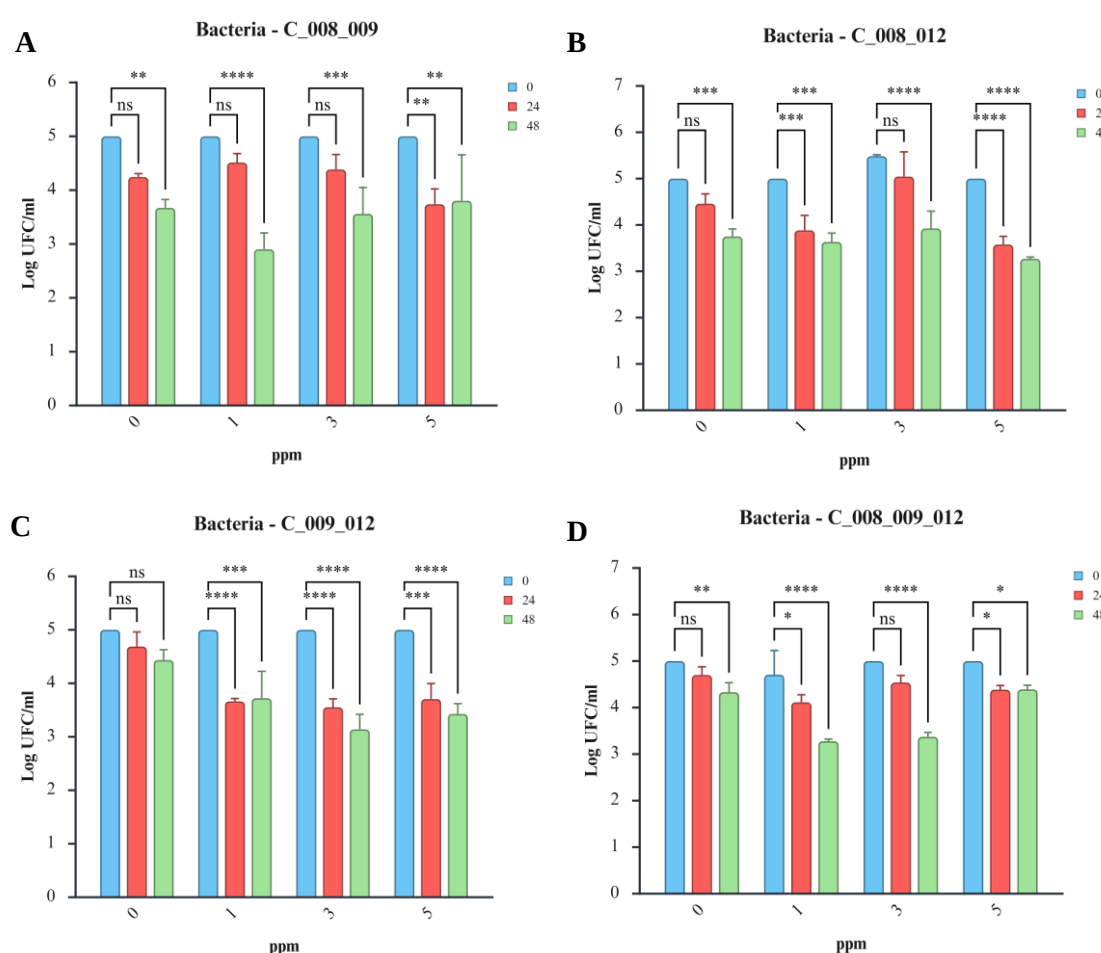
En el cóctel triple C_008_009_012 (**Figura 10D**), los tres términos analizados son muy influyentes, ppm mostró $p < 0,0001$ y $\eta^2 \approx 0,74$, tiempo $p < 0,0001$ y $\eta^2 \approx 0,89$, ppm×tiempo $p < 0,0001$ y $\eta^2 \approx 0,67$, lo que indica que buena parte de la variabilidad en la carga de *S. Infantis* se explica por la combinación de cloro y tiempo (**Anexo 8**). Los recuentos iniciales se situaron alrededor de 5,0 Log₁₀ UFC/mL, pero a las 48 h-0 ppm se mantiene en $\sim 4,33$ Log₁₀ UFC/mL, mientras que 1 y 3 ppm-48 h descienden hasta $\approx 3,28$ -3,37 Log₁₀ UFC/mL, esto indica reducciones de aproximadamente 1,7-1,8 Log₁₀ UFC/mL, en contraste, 5 ppm-48 h se sitúa cerca de 4,39 Log₁₀ UFC/mL, sin mejora apreciable respecto a 0 ppm. El Tukey muestra diferencias significativas entre 1-3 ppm-48 h y 0-5 ppm-48 h ($p < 0,001$ -0,0001), pero no entre 0 y 5 ppm-48 h (**Anexo 9**). Esto indica que el cóctel con tres fagos es muy eficaz para reducir *S. Infantis* cuando se trabaja con concentraciones moderadas de cloro (1-3 ppm) y tiempos de refrigeración prolongados, mientras que niveles más altos de desinfectante no incrementan la eficacia y terminan comportándose, en términos de recuentos finales (Log₁₀ UFC/mL), de forma similar a la condición sin cloro, probablemente por un compromiso entre inactivación fágica y acción bactericida del cloro.

De forma conjunta la estabilidad del cóctel fágico y la reducción de *S. Infantis*, el cóctel C_008_009_012 se perfila como la alternativa más robusta, ya que mantiene títulos virales elevados en presencia de cloro y logra descensos bacterianos cercanos a 1,5-2 log₁₀ UFC/mL en la mayoría de las combinaciones de 1-3 ppm y 24-48 h, además esta posee 3 fagos con perfiles de lisis complementarios

que podrían ampliar el espectro. No obstante, C_008_009 y C_008_012 también mostraron un desempeño destacado, con buenas reducciones de la carga bacteriana y una buena estabilidad fágica, por lo que pueden considerarse como formulaciones eficaces en las condiciones evaluadas. En contraste, el cóctel C_009_012 tendió a mostrar respuestas algo menos consistentes en referencia a la reducción de *S. Infantis* en algunos tratamientos, por lo que, aunque sigue siendo activo, resultaría menos ventajoso como candidato principal frente a las otras combinaciones.

Figura 10

Supervivencia bacteriana tras el tratamiento con el cóctel de bacteriófagos en presencia de cloro



Nota. Las barras muestran la concentración de *S. Infantis* (Log_{10} UFC/mL), tras el tratamiento con los cócteles C_008_009 (A), C_008_012 (B), C_009_012 (C) y C_008_009_012 (D) a un MOI de 100, en presencia de 0, 1, 3 y 5 ppm de cloro y evaluados a 0, 24 y 48 h, los valores corresponden a la media $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes.

Ahora referente a la variación del segundo ensayo **Figura 6** (fagos individuales) y del tercer ensayo (cócteles) **Figura 9** en relación a las bacterias, se realizaron bajo las mismas condiciones fisicoquímicas (misma concentración de cloro, temperatura de refrigeración y tiempo de incubación), el comportamiento de *S. Infantis* fue diferente, en el segundo ensayo la población bacteriana cayó rápidamente por debajo del límite de detección, mientras que en el tercero se observaron reducciones de 1-2 Log₁₀ UFC/mL, pero con supervivencia residual al final del ensayo. Esta diferencia se explica por la combinación de un aumento del MOI fágico y un incremento del inóculo bacteriano.

En la **Figura 5** y **Figura 6** se trabajó con un MOI de 1 y un inóculo bacteriano menor. En estas condiciones, el cloro actuó fuertemente sobre ambas poblaciones, redujo la bacteria y al mismo tiempo inactivó una fracción importante de los fagos. Sin embargo, como la carga bacteriana inicial era relativamente baja, bastó con uno o dos ciclos líticos para que la población fágica se amplificara y agotara casi por completo las células disponibles. Este tipo de eliminación rápida se ha descrito en ensayos in vitro con *Salmonella* donde, aun con MOI moderados, los fagos logran reducciones de ≥ 4 -5 Log₁₀ cuando el inóculo inicial es bajo y las condiciones favorecen la replicación viral (**Li et al., 2020; Pelyuntha et al., 2021**).

En cambio, para la **Figura 9** y **Figura 10** se trabajó con MOI de 100 incrementando ligeramente la cantidad inicial de bacterias para mantener la relación fago-bacteria deseada, generando un escenario distinto en el que hay muchas más células susceptibles que pueden actuar como huéspedes, por lo que siempre queda una fracción que escapa a la infección inicial. Al mismo tiempo, el cloro continúa inactivando parte del inóculo fágico, de modo que el MOI efectivo desciende rápidamente tras el contacto a pesar de partir de un valor teórico de 100. Estudios recientes indican que el cloro puede reducir varios órdenes logarítmicos la viabilidad de fagos de *Salmonella* en pocas horas, incluso en rangos de ppm compatibles con la industria alimentaria, como consecuencia al existir más bacterias disponibles y una población fágica parcialmente inactivada, el sistema tiende a un equilibrio en el que se observa una caída inicial pronunciada de aproximadamente 1-2 Log₁₀ UFC/mL seguida de una meseta de supervivencia, tal como se evidencia en las gráficas de dicha figura (**Wessels et al., 2021**).

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se evaluó la capacidad lítica de 18 bacteriófagos frente a un panel de 46 cepas de *Salmonella*, correspondiendo el 76,08 % al serovar Infantis y el 23,92 % a los serovares I 1,4,[5],12:i:-, Typhimurium, Derby, Hadar, Amsterdam, Enteritidis y Uganda. Mediante el análisis cuantitativo de la matriz fago-hospedador obtenida de los resultados del test de la gota. Se reveló que los 17 fagos evaluados presentan actividad lítica frente a *S. Infantis*, mostrando al menos una interacción de lisis parcial o completa con las cepas analizadas. el espectro de actividad varió entre fagos, con 6 de ellos alcanzando un rango amplio de infección $\geq 50\%$ de las cepas (vB_Sal_eIF_007, vB_Sal_eIF_008, vB_Sal_eIF_009, vB_Sal_eIF_010, vB_Sal_eIF_011, vB_Sal_eIF_012). 8 mostrando actividad moderada (20–49%) (vB_Sal_eIF_003, vB_Sal_eIF_005, vB_Sal_eIF_006, vB_Sal_eIF_013, vB_Sal_eIF_015, vB_Sal_eIF_016, vB_Sal_eIF_017, vB_Sal_eIF_019) y 3 exhibiendo un espectro estrecho ($<20\%$) (vB_Sal_eIF_004, vB_Sal_eIF_014, vB_Sal_eIF_018). Resultados que confirman que el grupo de fagos incluye tanto candidatos de amplio rango, adecuados para cócteles generalistas, como fagos especializados que aportan complementariedad frente a subpoblaciones específicas del patógeno.
- La evaluación de estabilidad biológica demostró que los fagos mantienen viabilidad aceptable bajo condiciones de refrigeración (4 °C) durante el periodo analizado, preservando su capacidad infectiva con reducciones moderadas en el título fágico. Sin embargo, la exposición a cloro evidenció una susceptibilidad diferencial entre fagos, con algunos aislados mostrando una marcada pérdida de viabilidad (vB_Sal_eIF_007, vB_Sal_eIF_010, vB_Sal_eIF_011) incluso a bajas concentraciones. Mientras que aquellos que conservaron su actividad con reducciones mínimas (vB_Sal_eIF_008, vB_Sal_eIF_009, vB_Sal_eIF_012) demostraron ser candidatos aptos para la formación de cócteles. En conjunto, estos resultados confirman que la estabilidad de los fagos depende tanto de sus características intrínsecas como de la intensidad y duración del tratamiento químico, lo que permite identificar cuáles presentan un desempeño robusto frente a condiciones típicas del procesamiento avícola.

- La identificación de combinaciones de bacteriófagos con capacidad lítica complementaria permitió seleccionar mezclas con perfiles de acción más amplios y estables frente a *S. Infantis*, considerando condiciones simuladas del entorno avícola. El análisis comparativo de infectividad, estabilidad en refrigeración y tolerancia al cloro evidenció que no todas las combinaciones presentan un desempeño sinérgico. De hecho, la mezcla C_009_012 mostró comportamientos antagónicos, manifestando reducción de la lisis, interferencia entre fagos o pérdida de estabilidad funcional. Esta combinación fue descartada con la finalidad de evitar efectos negativos sobre la eficacia. En contraste, las mezclas con actividad complementaria, sin interferencias detectables y con estabilidad conservada bajo condiciones operativas son C_008_009, C_008_012 y C_008_009_012 las cuales fueron priorizadas como candidatas robustas para su evaluación posterior en ensayos de eficacia.
- La evidencia generada en este estudio permitió concluir que es posible diseñar cócteles de bacteriófagos con sinergia lítica y estabilidad funcional adecuados para el control de *S. Infantis* de origen avícola ecuatoriano. Por medio de la selección progresiva de fagos con amplio espectro de infectividad, elevada capacidad de reducción bacteriana y tolerancia diferenciada a condiciones de refrigeración y cloro residual. Se estableció un conjunto de candidatos con desempeño consistentemente superior. El análisis de compatibilidad entre fagos permitió, además, identificar y descartar combinaciones con interacciones antagónicas, asegurando que los cócteles finales aprovecharan efectos complementarios y evitaran pérdidas de eficacia. En conjunto, los resultados confirman que la formulación racional basada en criterios de infectividad, estabilidad y compatibilidad constituye una estrategia sólida para el desarrollo de intervenciones fágicas dirigidas en la cadena avícola, aportando una alternativa prometedora frente a cepas multirresistentes y contribuyendo al fortalecimiento de la inocuidad alimentaria en el contexto nacional.

4.2 Recomendaciones

- Evaluar los genes de resistencia y otros determinantes genéticos presentes en las cepas de *S. Infantis* que mostraron tolerancia parcial o ausencia de lisis frente a ciertas combinaciones de fagos, con el fin de identificar posibles genes asociados a modificaciones de receptores, mecanismos de inmunidad bacteriana (como sistemas RM o CRISPR-Cas), mutaciones adaptativas que podrían comprometer la eficacia del cóctel y de esta forma ajustar la composición del cóctel de manera más dirigida.
- Realizar ensayos adicionales del cóctel fágico en matrices cárnicas reales (piel, músculo y superficies de contacto), mediante diseños experimentales que simulen el proceso industrial. La comparación entre el comportamiento in vitro y en matrices reales permitirá validar el potencial del cóctel en entornos complejos y definir su aplicabilidad como herramienta complementaria a los desinfectantes convencionales usados en la cadena avícola.
- Implementar análisis bioinformáticos complementarios de los genomas fágicos seleccionados orientados a descartar la presencia de genes de virulencia o lisogenicidad, garantizando la seguridad del cóctel y fortaleciendo su potencial uso como herramienta biotecnológica en la industria avícola.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

- Acton, L., Pye, H. V., Thilliez, G., Kolenda, R., Matthews, M., Turner, A. K., Yasir, M., Holden, E., Al-Khanaq, H., Webber, M., Adriaenssens, E. M., & Kingsley, R. A. (2024). Collateral sensitivity increases the efficacy of a rationally designed bacteriophage combination to control *Salmonella enterica*. *Journal of Virology*, 98(3). <https://doi.org/10.1128/jvi.01476-23>
- Agapé, L., Menanteau, P., Kempf, F., Morinet, M., Nicolas, M., Boulesteix, O., Riou, M., Virlogeux-Payant, I., Schouler, C., & Velge, P. (2025). Characterization of *Salmonella* adaptation in response to phage treatment in broiler chickens. *Veterinary Research*, 56(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s13567-025-01589-7>
- AGROCALIDAD. (2010). Guía General de carácter voluntario, referente a la adopción y Certificación de Buenas Prácticas Avícolas (BPA). FAOLEX (LEX-FAOC096517). <https://faolex.fao.org/docs/pdf/ecu96517.pdf>
- Aguilera, M., Tobar-Calfucoy, E., Rojas-Martínez, V., Norambuena, R., Serrano, M. J., Cifuentes, O., Zamudio, M. S., San Martín, D., Lara, P., Sabag, A., Zabner, M., Tichy, D., Camejo, P., León, L., Pino, M., Ulloa, S., Rojas, F., Pieringer, C., Muster, C., ... Cifuentes Muñoz, N. (2023). Development and characterization of a bacteriophage cocktail with high lytic efficacy against field-isolated *Salmonella enterica*. *Poultry Science*, 102(12), 103125. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103125>
- Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Carfora, V., Amoruso, R., Cordaro, G., Di Matteo, P., Ianzano, A., Iurescia, M., Diaconu, E. L., Study Group, E.-E.-A. N., Pedersen, S. K., Guerra, B., Hendriksen, R. S., Franco, A., & Battisti, A. (2020). Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic *pESI-like* megaplasmid. *Microbial Genomics*, 6(5), 1–12. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000365>
- 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*, 3(1), 15–27. <https://doi.org/10.1089/phage.2021.0017>
- Alvarado, Z. A. F. (2024). Efecto del plasma frio en la eliminación de microorganismos patógenos en la carne de cerdo. *Cátedra Villarreal Posgrado*, 3(2), 109–121. <https://doi.org/10.62428/RCVP2024321895>

- Alvarez, D. M., Barrón-Montenegro, R., Conejeros, J., Rivera, D., Undurraga, E. A., & Moreno-Switt, A. I. (2023). A review of the global emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar *Infantis*. *International Journal of Food Microbiology*, 403, 110297. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2023.110297>
- Aviv, G., Tsyba, K., Steck, N., Salmon-Divon, M., Cornelius, A., Rahav, G., Grassl, G. A., & Gal-Mor, O. (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar *Infantis* strain. *Environmental Microbiology*, 16(4), 977–994. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12351>
- Baer, A., & Kehn-Hall, K. (2014). Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 93. <https://doi.org/10.3791/52065>
- Bai, Y., Ding, X., Zhao, Q., Sun, H., Li, T., Li, Z., Wang, H., Zhang, L., Zhang, C., & Xu, S. (2022). Development of an organic acid compound disinfectant to control food-borne pathogens and its application in chicken slaughterhouses. *Poultry Science*, 101(6), 101842. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2022.101842>
- Battistelli, N., Tittarelli, F., Ruffini, F., Gavazzi, L., Scattolini, S., Acciari, V. A., Romualdi, T., Curini, V., Di Carlo, S., D'Alterio, N., Migliorati, G., Pomilio, F., & Aprea, G. (2024). In vitro characterization and genome sequencing of two novel lytic phages against *Salmonella* *Infantis* isolated from poultry feces. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1479700>
- Betiku, E., Ogundipe, T. T., Kalapala, T., & Obe, T. (2025). A Mini-Review on Multi-Hurdle Control of *Salmonella* Along Poultry Production Continuum. *Animals* 2025, Vol. 15, Page 875, 15(6), 875. <https://doi.org/10.3390/ANI15060875>
- Bezek, K., Avberšek, J., Zorman Rojs, O., & Barlič-Maganja, D. (2023). Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Commonly Used Disinfectants on *Salmonella* *Infantis* Isolates. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 301, 11(2), 301. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11020301>
- Bolohan, I., Lazăr, R., Mădescu, B. M., Davidescu, M. A., & Boișteanu, P. C. (2025). Microbiological Risks in the Poultry Meat Production and Processing Chain: A Systematic Review of the Literature. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 58.
- Bonilla-Caballero, M. A., Lozano-Puentes, M. P., Ospina, M. A., & Varón-López, M. (2022). First report of multidrug-resistant *Salmonella* *Infantis* in broiler litter in Tolima, Colombia. *Veterinary World*, 15(6), 1557. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2022.1557-1565>

- Braz, M., Pereira, C., Freire, C. S. R., & Almeida, A. (2025). A Review on Recent Trends in Bacteriophages for Post-Harvest Food Decontamination. *Microorganisms*, 13(3), 515. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS13030515>
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>
- Brenner, T., Fong, K., Lee, S., & Wang, S. (2020). A Dynamic Method for Broad-Spectrum Bacteriophage Cocktail Formulation Against Poultry-Associated *Salmonella enterica*. *PHAGE*, 1(2), 109–117. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.0002>
- Broeker, N. K., & Barbirz, S. (2017). Not a barrier but a key: How bacteriophages exploit host's O-antigen as an essential receptor to initiate infection. *Molecular Microbiology*, 105(3), 353–357. <https://doi.org/10.1111/MMI.13729>
- Byun, K. H., Han, S. H., Yoon, J. won, Park, S. H., & Ha, S. Do. (2021). Efficacy of chlorine-based disinfectants (sodium hypochlorite and chlorine dioxide) on *Salmonella* Enteritidis planktonic cells, biofilms on food contact surfaces and chicken skin. *Food Control*, 123, 107838. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107838>
- Cao, S., Yang, W., Zhu, X., Liu, C., Lu, J., Si, Z., Pei, L., Zhang, L., Hu, W., Li, Y., Wang, Z., Pang, Z., Xue, X., & Li, Y. (2022). Isolation and identification of the broad-spectrum high-efficiency phage vB_SalP_LDW16 and its therapeutic application in chickens. *BMC Veterinary Research* 2022 18:1, 18(1), 386-. <https://doi.org/10.1186/S12917-022-03490-3>
- Cao, Z. Z., Xu, J. W., Gao, M., Li, X. S., Zhai, Y. J., Yu, K., Wan, M., & Luan, X. H. (2020). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from goose farms in Northeast China. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 21(4), 287. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2020.37804.5498>
- Carstens, G., Roesler, U., Reich, F., & Friese, A. (2024). Efficacy of organic acids, lactic and formic acid, and peracetic acid in decontaminating process water and carcasses in chicken slaughter. *Journal of Food Safety*, 44(4). <https://doi.org/10.1111/jfs.13153>
- Chen, H., Liu, H., Gong, Y., Dunstan, R. A., Ma, Z., Zhou, C., Zhao, D., Tang, M., Lithgow, T., & Zhou, T. (2024). A *Klebsiella*-phage cocktail to broaden the host range and delay bacteriophage resistance both in vitro and in vivo. *npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1), 127. <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00603-8>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. <https://clsi.org/>

- Costa, A. R., van den Berg, D. F., Esser, J. Q., van den Bossche, H., Pozhydaieva, N., Kalogeropoulos, K., & Brouns, S. J. J. (2025). Bacteriophage genomes encode both broad and specific counter-defense repertoires to overcome bacterial defense systems. *Cell Host & Microbe*, 33(7), 1161-1172.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2025.06.010>
- Costa, P., Pereira, C., Romalde, J. L., & Almeida, A. (2025). From Isolation to Application: Designing a Multi-Target Phage Cocktail for Bivalve Safety. *Microorganisms* 2025, Vol. 13, Page 2708, 13(12), 2708. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS13122708>
- Cristobal-Cueto, P., García-Quintanilla, A., Esteban, J., & García-Quintanilla, M. (2021). Phages in Food Industry Biocontrol and Bioremediation. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 786, 10(7), 786. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070786>
- Da Silva, J. L., Serpa Vieira, B., Carvalho, F. T., César, R., Carvalho, T., & Eustáquio De Souza Figueiredo, E. (2022). *Salmonella* Behavior in Meat during Cool Storage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Animals* 2022, Vol. 12, Page 2902, 12(21), 2902. <https://doi.org/10.3390/ANI12212902>
- Dhulipalla, H., Basavegowda, N., Haldar, D., Syed, I., Ghosh, P., Rana, S. S., Somu, P., Naidu, R., Yadav, A. K., Lee, M. J., & Baek, K. (2025). Integrating phage biocontrol in food production: industrial implications and regulatory overview. *Discover Applied Sciences* 2025 7:4, 7(4), 314-. <https://doi.org/10.1007/S42452-025-06754-3>
- Di Marcantonio, L., Romantini, R., Marotta, F., Chiaverini, A., Zilli, K., Abass, A., Di Giannatale, E., Garofolo, G., & Janowicz, A. (2022). The Current Landscape of Antibiotic Resistance of *Salmonella* Infantis in Italy: The Expansion of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producers on a Local Scale. *Frontiers in Microbiology*, 13, 812481. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.812481/FULL>
- Díaz-Galián, M. V., Vega-Rodríguez, M. A., & Molina, F. (2022). PhageCocktail: An R package to design phage cocktails from experimental phage-bacteria infection networks. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 221, 106865. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2022.106865>
- Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P. J., & Brouns, S. J. J. (2021). Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), fuab048. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAB048>
- Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P. J., & Brouns, S. J. J. (2022). Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1). <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAB048>

- Endersen, L., & Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.10.006>
- Esmael, A., Azab, E., Gobouri, A. A., Nasr-eldin, M. A., Moustafa, M. M. A., Mohamed, S. A., Badr, O. A. M., & Abdelatty, A. M. (2021). Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages Infecting a Multi-Drug Resistant *Salmonella* Typhimurium and Their Efficacy to Combat Salmonellosis in Ready-to-Use Foods. *Microorganisms*, 9(2), 423. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020423>
- Ethèves, M. A., Choisis, N., Alvarez, S., Dalleau, F., Hascoat, J., Gallard, V., & Cardinale, E. (2021). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* persistence in broiler-chicken flocks on Reunion Island. *Heliyon*, 7(3), e06278. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2021.E06278>
- Fadipe, E. O., Hölzle, L. E., & Ayinde, J. O. (2025). Prevalence of *Salmonella* outbreak in poultry farms: a comparative study of Osun and Ogun States, Nigeria. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*, 15(1), 115–126. <https://doi.org/10.3329/ijarit.v15i1.82797>
- Fong, K., Wong, C. W. Y., Wang, S., & Delaquis, P. (2021). How Broad Is Enough: The Host Range of Bacteriophages and Its Impact on the Agri-Food Sector. <https://home.liebertpub.com/phage>, 2(2), 83–91. <https://doi.org/10.1089/PHAGE.2020.0036>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). *Meat Market Review Emerging trends and outlook 2023*.
- Franco, A., Leekitcharoenphon, P., Feltrin, F., Alba, P., Cordaro, G., Iurescia, M., Tolli, R., D’Incau, M., Staffolani, M., Di Giannatale, E., Hendriksen, R. S., & Battisti, A. (2015). Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* Infantis Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. *PLOS ONE*, 10(12), e0144802. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0144802>
- Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2020). Host range, morphological and genomic characterisation of bacteriophages with activity against clinical *Streptococcus agalactiae* isolates. *PLoS ONE*, 15(6), e0235002. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0235002>
- Fuseini, A., Miele, M., & Lever, J. (2023). Poultry Welfare at Slaughter. *Poultry 2023, Vol. 2, Pages 98-110*, 2(1), 98–110. <https://doi.org/10.3390/POULTRY2010010>
- García-Soto, S., Abdel-Glil, M. Y., Tomaso, H., Linde, J., & Methner, U. (2020). Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar Infantis of Multilocus Sequence Type 2283 in German Broiler Farms. *Frontiers in Microbiology*, 11, 547030. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01741>

- Georganas, A., Graziosi, G., Catelli, E., & Lupini, C. (2024). *Salmonella enterica* Serovar Infantis in Broiler Chickens: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Animals*, 14(23), 3453. <https://doi.org/10.3390/ani14233453>
- Gheorghe-Barbu, I., Czobor Barbu, I., Dragomir, R. I., Marinaş, I. C., Stan, M. S., Pericleanu, R., Dumbravă, A. Ştefania, Rotaru, L. I., Paraschiv, S., Bănică, L. M., Pecete, I., Oţelea, D., Cristea, V. C., Popa, M. I., Țânțu, M. M., & Surleac, M. (2025). Emerging Resistance and Virulence Patterns in *Salmonella enterica*: Insights into Silver Nanoparticles as an Antimicrobial Strategy. *Antibiotics*, 14(1), 46. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS14010046>
- Grigore, D.-M., Mircea, M.-L., & Narcisa Pogurschi, E. (2025). Toward Sustainable Broiler Production: Evaluating Microbial Protein as Supplementation for Conventional Feed Proteins. *Agriculture* 2025, Vol. 15, Page 1486, 15(14), 1486. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE15141486>
- Guerrero, T., Bayas-Rea, R., Erazo, E., & Zapata Mena, S. (2022). Nontyphoidal *Salmonella* in Food from Latin America: A Systematic Review. *Foodborne Pathogens and Disease*, 19(2), 85–103. <https://doi.org/10.1089/FPD.2020.2925>
- Gummalla, V. S., Zhang, Y., Liao, Y. Te, & Wu, V. C. H. (2023). The Role of Temperate Phages in Bacterial Pathogenicity. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 541, 11(3), 541. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11030541>
- Guzel, M., Yucefaydali, A., Yetiskin, S., Deniz, A., Yaşar Tel, O., Akçelik, M., & Soyer, Y. (2024). Genomic analysis of *Salmonella* bacteriophages revealed multiple endolysin ORFs and importance of ligand-binding site of receptor-binding protein. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(7), 79. <https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIAE079>
- Guzinski, J., Potter, J., Tang, Y., Davies, R., Teale, C., & Petrovska, L. (2024). Geographical and temporal distribution of multidrug-resistant *Salmonella* Infantis in Europe and the Americas. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1244533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1244533>
- Gvaladze, T., Lehnherr, H., Große-Kleimann, J., & Hertwig, S. (2023). A Bacteriophage Cocktail Reduces Five Relevant *Salmonella* Serotypes at Low Multiplicities of Infection and Low Temperatures. *Microorganisms*, 11(9), 2298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092298>
- Gvaladze, T., Lehnherr, H., & Hertwig, S. (2024). A bacteriophage cocktail can efficiently reduce five important *Salmonella* serotypes both on chicken skin and stainless steel. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1354696. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1354696>
- Hagedoorn, N. N., Murthy, S., Birkhold, M., Marchello, C. S., & Crump, J. A. (2023). Prevalence and distribution of non-typhoidal *Salmonella enterica* serogroups and serovars isolated from normally

- sterile sites: A global systematic review. *Epidemiology and Infection*, 152, e4. <https://doi.org/10.1017/S0950268823001693>
- Han, J., Aljahdali, N., Zhao, S., Tang, H., Harbottle, H., Hoffmann, M., Frye, J. G., & Foley, S. L. (2024). Infection biology of *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus*, 12(1), eesp-0001-2023. <https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0001-2023>
- He, J., Wong, C. W. Y., Schultze, D. M., & Wang, S. (2024). Inactivation of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg yolk and egg white using bacteriophage cocktails. *Current Research in Food Science*, 8, 100703. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100703>
- Hussein, A. H., Makky, S., Hager, R., Connerton, I. F., & El-Shibiny, A. (2025). Characterization and therapeutic potential of phage vB_Eco_ZCEC08 against multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 25(1), 221. <https://doi.org/10.1186/S12866-025-03903-X>
- Hyla, K., Dusza, I., & Skaradzińska, A. (2022). Recent Advances in the Application of Bacteriophages against Common Foodborne Pathogens. *Antibiotics 2022*, Vol. 11, Page 1536, 11(11), 1536. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11111536>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Imran, A., Shehzadi, U., Islam, F., Afzaal, M., Ali, R., Ali, Y. A., Chauhan, A., Biswas, S., Khurshid, S., Usman, I., Hussain, G., Zahra, S. M., Shah, M. A., & Rasool, A. (2023). Bacteriophages and food safety: An updated overview. *Food Science & Nutrition*, 11(7), 3621–3630. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3360>
- INEN. (2011). Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 056:2011 Carne y Productos Cárnicos (1st ed.). *Instituto Ecuatoriano de Normalización*.
- Jeon, G., & Ahn, J. (2021). Evaluation of phage adsorption to *Salmonella* Typhimurium exposed to different levels of pH and antibiotic. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104726. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104726>
- Jiang, H., Dong, Y., Jiao, X., Tang, B., Feng, T., Li, P., & Fang, J. (2024). In vivo fitness of sul gene-dependent sulfonamide-resistant *Escherichia coli* in the mammalian gut. *mSystems*, 9(9), e00836-24. <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00836-24>
- Jin, Y., & Adhikari, A. (2025). Emerging and Innovative Technologies for the Sanitization of Fresh Produce: Advances, Mechanisms, and Applications for Enhancing Food Safety and Quality. *Foods 2025*, Vol. 14, Page 1924, 14(11), 1924. <https://doi.org/10.3390/FOODS14111924>

- Jones, B. D. (2005). *Salmonella* Invasion Gene Regulation: A Story of Environmental Awareness. En *The Journal of Microbiology* (Vol. 43).
- Jordá, J., Lorenzo-Rebenaque, L., Montoro-Dasi, L., Marco-Fuertes, A., Vega, S., & Marin, C. (2023). Phage-Based Biosanitation Strategies for Minimizing Persistent *Salmonella* and *Campylobacter* Bacteria in Poultry. *Animals*, 13(24), 3826. <https://doi.org/10.3390/ani13243826>
- Kaiser, A. D. (1955). A genetic study of the temperate coliphage λ . *Virology*, 1(4), 424–443. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(55\)90036-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(55)90036-2)
- Kang, H. S., Ali, M. S., Na, S. H., Moon, B. Y., Kim, J. I., Hwang, Y. J., Yoon, S. S., Park, S. C., & Lim, S. K. (2024). Nationwide surveillance and characterization of the third-generation cephalosporin-resistant *Salmonella* enterica serovar infantis isolated from chickens in South Korea between 2010 and 2022. *Heliyon*, 10(17). <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2024.E37124>
- Kannoly, S., Oken, G., Shadan, J., Musheyev, D., Singh, K., Singh, A., & Dennehy, J. J. (2023). Single-Cell Approach Reveals Intercellular Heterogeneity in Phage-Producing Capacities. *Microbiology Spectrum*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02663-21>
- Kataria, J., & Morey, A. (2020). Antimicrobial Interventions in Poultry Processing to Improve Shelf Life and Safety of Poultry Meat: A Review with Special Attention to *Salmonella* spp. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. <https://doi.org/10.18502/jfqhc.7.2.2884>
- Khan, A., & Joshi, H. (2025). Isolation and Characterization of Stress-Tolerant Bacteriophages for Effective Biocontrol of Foodborne Pathogen. *Food and Bioprocess Technology*, 18(8), 7443–7457. <https://doi.org/10.1007/s11947-025-03885-8>
- Khan, A., & Joshi, H. M. (2024). Combating chlorine-resistant marine *Klebsiella pneumoniae* biofilms with chlorine-tolerant bacteriophages. *Chemosphere*, 368, 143782. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143782>
- Khan, A. S., Georges, K., Rahaman, S., Abebe, W., & Adesiyun, A. A. (2021). Characterization of *Salmonella* isolates recovered from stages of the processing lines at four broiler processing plants in Trinidad and Tobago. *Microorganisms*, 9(5), 1048. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9051048>
- Khan, M. A. S., Islam, Z., Barua, C., Sarkar, Md. M. H., Ahmed, Md. F., & Rahman, S. R. (2024). Phenotypic characterization and genomic analysis of a *Salmonella* phage L223 for biocontrol of *Salmonella* spp. in poultry. *Scientific Reports*, 14(1), 15347. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64999-1>

- Kim, M. B., Jung, H. R., & Lee, Y. J. (2024). Emergence of *Salmonella* Infantis carrying the *pESI* megaplasmid in commercial farms of five major integrated broiler operations in Korea. *Poultry Science*, 103(4), 103516. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2024.103516>
- Kim, M. K., Chen, Q., Echterhof, A., Pennetzdorfer, N., McBride, R. C., Banaei, N., Burgener, E. B., Milla, C. E., & Bollyky, P. L. (2024). A blueprint for broadly effective bacteriophage-antibiotic cocktails against bacterial infections. *Nature Communications*, 15(1), 9987. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53994-9>
- Kim, S., Son, B., Kim, H., Shin, H., & Ryu, S. (2024). Precision Phage Cocktail Targeting Surface Appendages for Biocontrol of *Salmonella* in Cold-Stored Foods. *Antibiotics*, 13(9), 799. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090799>
- Kranjc, K., Avberšek, J., Šemrov, N., Zorman-Rojs, O., & Barlič-Maganja, D. (2024). *Salmonella* Infantis Adhesion to Various Surfaces and In Vitro Antimicrobial Efficacy of Commercial Disinfectants. *Pathogens*, 13(11), 999. <https://doi.org/10.3390/pathogens13110999>
- Kumar, G., Kumar, S., Jangid, H., Dutta, J., & Shidiki, A. (2025). The rise of non-typhoidal *Salmonella*: an emerging global public health concern. *Frontiers in Microbiology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1524287>
- Kürekci, C., Sahin, S., Iwan, E., Kwit, R., Bomba, A., & Wasyl, D. (2021). Whole-genome sequence analysis of *Salmonella* Infantis isolated from raw chicken meat samples and insights into *pESI*-like megaplasmid. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108956. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108956>
- Kuźmińska-Bajor, M., Śliwka, P., Ugorski, M., Korzeniowski, P., Skaradzińska, A., Kuczkowski, M., Narajczyk, M., Wieliczko, A., & Kolenda, R. (2021). Genomic and functional characterization of five novel *Salmonella*-targeting bacteriophages. *Virology Journal*, 18(1), 183. <https://doi.org/10.1186/S12985-021-01655-4>
- Lamichhane, B., Mawad, A. M. M., Saleh, M., Kelley, W. G., Harrington, P. J., Lovestad, C. W., Amezcu, J., Sarhan, M. M., El Zowalaty, M. E., Ramadan, H., Morgan, M., & Helmy, Y. A. (2024). Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. *Antibiotics 2024, Vol. 13, Page 76*, 13(1), 76. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS13010076>
- Laranja, D. C., da Silva Malheiros, P., Cacciatore, F. A., de Oliveira Elias, S., Milnitsky, B. P., & Tondo, E. C. (2021). *Salmonella* inactivation and changes on texture and color of chicken skin treated with antimicrobials and ultrasound. *LWT*, 149, 111836. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111836>

- Lee, W. W. Y., Mattock, J., Greig, D. R., Langridge, G. C., Baker, D., Bloomfield, S., Mather, A. E., Wain, J. R., Edwards, A. M., Hartman, H., Dallman, T. J., Chattaway, M. A., & Nair, S. (2021). Characterization of a *pESI-like* plasmid and analysis of multidrug-resistant *Salmonella enterica* infantis isolates in England and Wales. *Microbial Genomics*, 7(10), 000658. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000658/CITE/REFWORKS>
- Li, M., Lin, H., Jing, Y., & Wang, J. (2020). Broad-host-range *Salmonella* bacteriophage STP4-a and its potential application evaluation in poultry industry. *Poultry Science*, 99(7), 3643. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2020.03.051>
- Lu, H., Li, Z., Elbaz, A., & Ni, S.-Q. (2023). Synergistic action of phages and lytic proteins with antibiotics: a combination strategy to target bacteria and biofilms. *BMC Microbiology*, 23(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02881-2>
- Lu, Z., Marchant, J., Thompson, S., Melgarejo, H., Ignatova, D., Kopic, S., Damaj, R., Trejo, H., Paramo, R., Reed, A., Breidt, F., & Kathariou, S. (2022). Bacteriophages Isolated From Turkeys Infecting Diverse *Salmonella* Serovars. *Frontiers in Microbiology*, 13, 933751. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.933751/BIBTEX>
- Luo, Y., Mahillon, J., Sun, L., You, Z., & Hu, X. (2025). Isolation, characterization and liposome-loaded encapsulation of a novel virulent *Salmonella* phage vB-SeS-01. *Frontiers in Microbiology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1494647>
- Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., & Díaz-Muñoz, S. L. (2021). Black box of phage-bacterium interactions: Exploring alternative phage infection strategies. *Open Biology*, 11(9). <https://doi.org/10.1098/RSOB.210188/91092>
- Mattock, J., Chattaway, M. A., Hartman, H., Dallman, T. J., Smith, A. M., Keddy, K., Petrovska, L., Manners, E. J., Duze, S. T., Smouse, S., Tau, N., Timme, R., Baker, D. J., Mather, A. E., Wain, J., & Langridge, G. C. (2024). A One Health Perspective on *Salmonella enterica* Seroovar Infantis, an Emerging Human Multidrug-Resistant Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 30(4). <https://doi.org/10.3201/eid3004.231031>
- Mayorga-Ramos, A., Carrera-Pacheco, S. E., Barba-Ostria, C., & Guamán, L. P. (2024). Bacteriophage-mediated approaches for biofilm control. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1428637. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2024.1428637>
- McMillan, E. A., Adams, E. S., Mitchell, T. R., Hawkins, J. A., Read, Q. D., Pokoo-Aikins, A., Berrang, M. E., Harris, C. E., Hughes, M. D., Glenn, A. E., & Meinersmann, R. J. (2024). Susceptibility of *pESI* positive *Salmonella* to treatment with biocide chemicals approved for use in poultry meat

- processing as compared to *Salmonella* without the *pESI* plasmid. *Letters in Applied Microbiology*, 77(7). <https://doi.org/10.1093/lambio/ovae067>
- Mejía, L., Medina, J. L., Bayas, R., Salazar, C. S., Villavicencio, F., Zapata, S., Matheu, J., Wagenaar, J. A., González-Candelas, F., & Vinueza-Burgos, C. (2020). Genomic Epidemiology of *Salmonella* Infantis in Ecuador: From Poultry Farms to Human Infections. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 547891. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547891>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology and Infection*, 38(6), 732–749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- Mitarai, N., Brown, S., & Sneppen, K. (2016). Population Dynamics of Phage and Bacteria in Spatially Structured Habitats Using Phage λ and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 198(12), 1783–1793. <https://doi.org/10.1128/JB.00965-15>
- Mkangara, M. (2023). Prevention and Control of Human *Salmonella* enterica Infections: An Implication in Food Safety. *International Journal of Food Science*, 2023(1), 8899596. <https://doi.org/10.1155/2023/8899596>
- Molina, F., Menor-Flores, M., Fernández, L., Vega-Rodríguez, M. A., & García, P. (2022). Systematic analysis of putative phage-phage interactions on minimum-sized phage cocktails. *Scientific Reports*, 12(1), 2458. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06422-1>
- Montoro-Dasi, L., Lorenzo-Rebenaque, L., Marco-Fuertes, A., Vega, S., & Marin, C. (2023). Holistic Strategies to Control *Salmonella* Infantis: An Emerging Challenge in the European Broiler Sector. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 1765, 11(7), 1765. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11071765>
- Mosimann, S., Desiree, K., & Ebner, P. (2021). Efficacy of phage therapy in poultry: a systematic review and meta-analysis. *Poultry Science*, 100(12), 101472. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2021.101472>
- Moutiq, R., Misra, N. N., Mendonça, A., & Keener, K. (2020). In-package decontamination of chicken breast using cold plasma technology: Microbial, quality and storage studies. *Meat Science*, 159, 107942. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2019.107942>
- Mushegian, A. R. (2020). Are There 10³¹ Virus Particles on Earth, or More, or Fewer? *Journal of Bacteriology*, 202(9), e00052-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>
- Nagpala, M. J. M., Mora, J. F. B., Pavon, R. D. N., & Rivera, W. L. (2025). Genomic characterization of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* in chicken meat from wet markets in Metro Manila,

- Philippines. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1496685. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2025.1496685>
- Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., Maltese, P. E., Cristofoli, F., Antoni, L. De, Beccari, T., Dundar, M., & Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Bio Medica : Atenei Parmensis*, 91(Suppl 13), e2020024. <https://doi.org/10.23750/ABM.V91I13-S.10819>
- Ng, R. N., Grey, L. J., Vaitekenas, A., McLean, S. A., Rudrum, J. D., Laucirica, D. R., Poh, M. W. P., Hillas, J., Winslow, S. G., Iszatt, J. J., Iosifidis, T., Tai, A. S., Agudelo-Romero, P., Chang, B. J., Stick, S. M., & Kicic, A. (2021). Development and validation of a miniaturized bacteriophage host range screening assay against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*, 190, 106346. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2021.106346>
- Nguyen, T. V. P., Wu, Y., Yao, T., Trinh, J. T., Zeng, L., Chemla, Y. R., & Golding, I. (2023). Co-infecting phages impede each other's entry into the cell. <https://doi.org/10.1101/2023.06.05.543643>
- Niu, Y. D., Liu, H., Du, H., Meng, R., Sayed Mahmoud, E., Wang, G., McAllister, T. A., & Stanford, K. (2021). Efficacy of Individual Bacteriophages Does Not Predict Efficacy of Bacteriophage Cocktails for Control of *Escherichia coli* O157. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616712>
- Obe, T., Boltz, T., Kogut, M., Ricke, S. C., Brooks, L. A., Macklin, K., & Peterson, A. (2023). Controlling *Salmonella*: strategies for feed, the farm, and the processing plant. *Poultry Science*, 102(12), 103086. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2023.103086>
- Obe, T., Kiess, A. S., & Nannapaneni, R. (2024). Antimicrobial Tolerance in *Salmonella*: Contributions to Survival and Persistence in Processing Environments. *Animals 2024*, Vol. 14, Page 578, 14(4), 578. <https://doi.org/10.3390/ANI14040578>
- Obe, T., Nannapaneni, R., Schilling, W., Zhang, L., & Kiess, A. (2021). Antimicrobial tolerance, biofilm formation, and molecular characterization of *Salmonella* isolates from poultry processing equipment. *Journal of Applied Poultry Research*, 30(4), 100195. <https://doi.org/10.1016/J.JAPR.2021.100195>
- Ohashi, I., Kobayashi, S., Tamamura-Andoh, Y., Arai, N., & Takamatsu, D. (2022). Disinfectant resistance of *Salmonella* in in vitro contaminated poultry house models and investigation of efficient disinfection methods using these models. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(12), 1633–1644. <https://doi.org/10.1292/JVMS.22-0311>

- Olsen, N. S., Hendriksen, N. B., Hansen, L. H., & Kot, W. (2020). A New High-Throughput Screening Method for Phages: Enabling Crude Isolation and Fast Identification of Diverse Phages with Therapeutic Potential. *Phage*, 1(3), 137. <https://doi.org/10.1089/PHAGE.2020.0016>
- Pan, H., Shu, M., Li, T. J., Shen, K. S., Zhao, Y. Y., Liao, N. B., Zhong, C., & Wu, G. P. (2023). Isolation and characterization of two lytic phages against multidrug-resistant *Salmonella* and their application as a cocktail for biocontrol in foods. *LWT*, 185, 115184. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115184>
- Panteleev, V., Kulbachinskiy, A., & Gelfenbein, D. (2025). Evaluating phage lytic activity: from plaque assays to single-cell technologies. *Frontiers in Microbiology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1659093>
- Papadatou, M., Robson, S. C., Dobretsov, S., Watts, J. E. M., Longyear, J., & Salta, M. (2021). Marine biofilms on different fouling control coating types reveal differences in microbial community composition and abundance. *MicrobiologyOpen*, 10(4). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1231>
- Papić, B., Kušar, D., Mićunović, J., Pirš, M., Ocepek, M., & Avberšek, J. (2022). Clonal Spread of *pESI*-Positive Multidrug-Resistant ST32 *Salmonella enterica* Serovar Infantis Isolates among Broilers and Humans in Slovenia. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02481-22. <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02481-22>
- Paranos, P., Pournaras, S., & Meletiadiis, J. (2024). A single-layer spot assay for easy, fast, and high-throughput quantitation of phages against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 62(8). <https://doi.org/10.1128/jcm.00743-24>
- Pelyuntha, W., Narkpao, T., Yamik, D. Y., Kiatwuthinon, P., Sanguankiat, A., Kovitvadhi, A., & Vongkamjan, K. (2025). Efficiency, cytotoxicity, and survivability evaluation of *Salmonella* phage cocktail against *Salmonella* derived from broiler sources. *Veterinary World*, 475–483. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2025.475-483>
- Pelyuntha, W., Ngasaman, R., Yingkajorn, M., Chukiatsiri, K., Benjakul, S., & Vongkamjan, K. (2021). Isolation and Characterization of Potential *Salmonella* Phages Targeting Multidrug-Resistant and Major Serovars of *Salmonella* Derived From Broiler Production Chain in Thailand. *Frontiers in Microbiology*, 12, 662461. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.662461>
- Pelyuntha, W., & Vongkamjan, K. (2023). Control of *Salmonella* in Chicken Meat by a Phage Cocktail in Combination with Propionic Acid and Modified Atmosphere Packaging. *Foods* 2023, Vol. 12, Page 4181, 12(22), 4181. <https://doi.org/10.3390/FOODS12224181>
- Phuong, L. N. N., Anh, L. H., Huan, P. K. N., Loc, H. T., Trang, C. T. H., Mo, T. T. H., Xuan, N. H., & Ngu, N. T. (2022). The effect of different media and temperature conditions for *Salmonella*

- bacteriophage preservation. *Veterinary Integrative Sciences*, 20(2), 489–496. <https://doi.org/10.12982/VIS.2022.036>
- Piña-Iturbe, A., Díaz-Gavidia, C., Álvarez, F. P., Barron-Montenegro, R., Álvarez-Espejo, D. M., García, P., Solís, D., Constenla-Albornoz, R., Toro, M., Olivares-Pacheco, J., Reyes-Jara, A., Meng, J., Bell, R. L., & Moreno-Switt, A. I. (2024). Genomic characterisation of the population structure and antibiotic resistance of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Chile, 2009–2022. *Lancet Regional Health - Americas*, 32, 100711. <https://doi.org/10.1016/J.LANA.2024.100711>
- Ramírez, O. J. C., & Cano-Buendía, J. A. (2020). Applications of Electrolyzed Water as a Sanitizer in the Food and Animal-By Products Industry. *Processes*, 8(5), 534. <https://doi.org/10.3390/pr8050534>
- Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, M. F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, V., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D. V., Khedkar, G. D., Raposo, A., Han, H., & Puniya, A. K. (2024). Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. *npj Science of Food* 2024 8:1, 8(1), 1-. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8>
- Rastegar, S., Skurnik, M., Tadjrobehkar, O., Samareh, A., Samare-Najaf, M., Lotfian, Z., Khajedadian, M., Hosseini-Nave, H., & Sabouri, S. (2024). Synergistic effects of bacteriophage cocktail and antibiotics combinations against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 1208. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-10081-0>
- Rogovski, P., Cadamuro, R. D., da Silva, R., de Souza, E. B., Bonatto, C., Viancelli, A., Michelon, W., Elmahdy, E. M., Treichel, H., Rodríguez-Lázaro, D., & Fongaro, G. (2021). Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. *Frontiers in Microbiology*, 12, 793135. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.793135>
- Russo, I., Fischer, J., Uelze, L., Napoleoni, M., Schiavano, G. F., Andreoni, F., Brandi, G., & Amagliani, G. (2024). From farm to fork: Spread of a multidrug resistant *Salmonella* Infantis clone encoding blaCTX-M-1 on *pESI-like* plasmids in Central Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 410, 110490. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2023.110490>
- Sallami, I., Ammeri, rim W., Turki-Ghodbane, Y., & Hassan, A. (2024). Application of a cocktail of three bacteriophages for the biocontrol of *Salmonella* in raw fresh milk. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4572288/v1>
- Sarrami, Z., Sedghi, M., Mohammadi, I., Bedford, M., Miranzadeh, H., & Ghasemi, R. (2023). Effects of bacteriophage on *Salmonella* Enteritidis infection in broilers. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 12198-. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38791-6>

- Sevilla-Navarro, S., Torres-Boncompagni, J., Garcia-Llorens, J., Bernab u-Gimeno, M., Domingo-Calap, P., & Catal -Gregori, P. (2024). Fighting *Salmonella* Infantis: bacteriophage-driven cleaning and disinfection strategies for broiler farms. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1401479. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1401479>
- Sezer, B., & Boyaci, I. H. (2024). Evaluation of long- and short-term storage conditions and efficiency of a novel microencapsulated *Salmonella* phage cocktail for controlling *Salmonella* in chicken meat. *Food Science and Biotechnology*, 33(2), 475–483. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01374-2>
- Shahdadi, M., Safarirad, M., Berizi, E., Mazloomi, S. M., Hosseinzadeh, S., Zare, M., Derakhshan, Z., & Rajabi, S. (2023). A systematic review and modeling of the effect of bacteriophages on *Salmonella* spp. Reduction in chicken meat. *Heliyon*, 9(4), e14870. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E14870>
- Silva, J., Dias, R., Junior, J. I., Marcelino, M., Silva, M., Carmo, A., Sousa, M., Silva, C., & de Paula, S. (2021). A Rapid Method for Performing a Multivariate Optimization of Phage Production Using the RCCD Approach. *Pathogens*, 10(9), 1100. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091100>
- Stephan, M. S., Broeker, N. K., Saragliadis, A., Roos, N., Linke, D., & Barbirz, S. (2020). In vitro Analysis of O-Antigen-Specific Bacteriophage P22 Inactivation by *Salmonella* Outer Membrane Vesicles. *Frontiers in Microbiology*, 11, 510638. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.510638>
- Subedi, D., Gordillo Altamirano, F., Deehan, R., Perera, A., Patwa, R., Kostoulas, X., Korneev, D., Blakeway, L., Macesic, N., Peleg, A. Y., & Barr, J. J. (2025). Rational design of a hospital-specific phage cocktail to treat Enterobacter cloacae complex infections. *Nature Microbiology*, 10(11), 2702–2719. <https://doi.org/10.1038/s41564-025-02130-4>
- Tajer, L., Paillart, J. C., Dib, H., Sabatier, J. M., Fajloun, Z., & Abi Khattar, Z. (2024). Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides in the Modern Era: An Updated Review. *Microorganisms* 2024, Vol. 12, Page 1259, 12(7), 1259. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12071259>
- Taslem, M. J., Awe, A., Guo, W., Batra, H., Ganesh, H., Wu, X., & Zhu, J. (2022). Understanding Bacteriophage Tail Fiber Interaction with Host Surface Receptor: The Key “Blueprint” for Reprogramming Phage Host Range. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 12146, 23(20), 12146. <https://doi.org/10.3390/IJMS232012146>
- Tekin, Y., Yazgan, H., Gokmen, T. G., Gungor, N., & Uprak, N. S. (2025). Integrated Analysis of *Salmonella* Infantis in Chicken Meat: Epidemiological Surveillance, Antibiotic Resistance, and

- Potential Bioactive Control Agents. *Pathogens* 2025, Vol. 14, Page 1178, 14(11), 1178. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS14111178>
- Thames, H. T., Fancher, C. A., Colvin, M. G., McAnally, M., Tucker, E., Zhang, L., Kiess, A. S., Dinh, T. T. N., & Sukumaran, A. T. (2022). The Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* on Broiler Meat at Different Stages of Commercial Poultry Processing. *Animals* 2022, Vol. 12, Page 2460, 12(18), 2460. <https://doi.org/10.3390/ANI12182460>
- Thames, H. T., & Sukumaran, A. T. (2020). A Review of *Salmonella* and *Campylobacter* in Broiler Meat: Emerging Challenges and Food Safety Measures. *Foods* 2020, Vol. 9, Page 776, 9(6), 776. <https://doi.org/10.3390/FOODS9060776>
- Torkashvand, N., Kamyab, H., Aarabi, P., Shahverdi, A. R., Torshizi, M. A. K., Khoshayand, M. R., & Sepehrizadeh, Z. (2024). Evaluating the effectiveness and safety of a novel phage cocktail as a biocontrol of *Salmonella* in biofilm, food products, and broiler chicken. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1505805>
- Tung, C. W., Julianingsih, D., Phan, A., Canagarajah, C., Alvarado-Martínez, Z., & Biswas, D. (2025). Limitation of the Lytic Effect of Bacteriophages on *Salmonella* and Other Enteric Bacterial Pathogens and Approaches to Overcome. *International Journal of Microbiology*, 2025(1), 5936070. <https://doi.org/10.1155/IJM/5936070>
- Vaz, C. S. L., Voss-Rech, D., da Fonseca, F. N., & Coldebella, A. (2025). Disinfectant-Based and Chlorinated Water Inactivation of Wild-Type *Salmonella enterica* Bacteriophages. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1177/15353141251366377>
- Weerasooriya, G., Dulakshi, H. M. T., de Alwis, P. S., Bandara, S., Premarathne, K. R. P. S., Dissanayake, N., Liyanagunawardena, N., Wijemuni, M. I., & Priyantha, M. A. R. (2024). Persistence of *Salmonella* and *Campylobacter* on Whole Chicken Carcasses under the Different Chlorine Concentrations Used in the Chill Tank of Processing Plants in Sri Lanka. *Pathogens* 2024, Vol. 13, Page 664, 13(8), 664. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS13080664>
- 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), 1742. <https://doi.org/10.3390/FOODS10081742>
- Wiebe, K. G., Cook, B. W. M., Lightly, T. J., Court, D. A., & Theriault, S. S. (2024). Investigation into scalable and efficient enterotoxigenic *Escherichia coli* bacteriophage production. *Scientific Reports*, 14(1), 3618. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53276-w>
- Yi, S.-W., Jung, Y.-H., Oh, S.-I., Lee, H. G., Do, Y. J., Bok, E.-Y., Hur, T.-Y., & Kim, E. (2022). Synergistic antibacterial effect of disinfectants and microbubble water to *Salmonella*

- Typhimurium. *Korean Journal of Veterinary Service*, 45(4), 277–284. <https://doi.org/10.7853/KJVS.2022.45.4.277>
- Yi, Y., Abdelhamid, A. G., Xu, Y., & Yousef, A. E. (2021). Characterization of broad-host lytic *Salmonella* phages isolated from livestock farms and application against *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg. *LWT*, 144, 111269. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111269>
- Zhang, M., Song, Q., Liu, Z., Clokie, M. R. J., Sicheritz-Pontén, T., Petersen, B., Wang, X., Zhang, Q., Xu, X., Luo, Y., Lv, P., Liu, Y., & Li, L. (2025). Design of Lytic Phage Cocktails Targeting *Salmonella*: Synergistic Effects Based on In Vitro Lysis, In Vivo Protection, and Biofilm Intervention. *Viruses*, 17(10), 1363. <https://doi.org/10.3390/v17101363>
- Zizza, A., Fallucca, A., Guido, M., Restivo, V., Roveta, M., & Trucchi, C. (2024). Foodborne Infections and *Salmonella*: Current Primary Prevention Tools and Future Perspectives. *Vaccines* 2025, Vol. 13, Page 29, 13(1), 29. <https://doi.org/10.3390/VACCINES13010029>

ANEXOS

Anexo 1

Tabla ANOVA de los efectos principales e interacciones entre fago, tiempo de incubación y concentración de cloro (ppm) sobre la variación del título fágico

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Fago	5	49.5	9.9	41.731	< 2e-16
Tiempo_h	2	2373.8	1186.9	5002.883	< 2e-16
ppm	3	211.8	70.6	297.535	< 2e-16
Fago:Tiempo_h	10	33.0	3.3	13.894	< 2e-16
Fago:ppm	15	33.5	2.2	9.414	4.26e-15
Tiempo_h:ppm	6	108.2	18.0	75.993	< 2e-16
Fago:Tiempo_h:ppm	30	28.4	0.9	3.990	1.11e-08
Residuals	144	34.2	0.2		

```

Fago      ****
Tiempo_h  ****
ppm       ****
Fago:Tiempo_h  ****
Fago:ppm   ****
Tiempo_h:ppm  ****
Fago:Tiempo_h:ppm ****
Residuals

```

Signif. codes:

0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo 2

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos bajo condiciones del experimento

Tiempo_h = 0, ppm = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	0.1622	0.398	144	0.408	0.9985
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	0.3680	0.398	144	0.925	0.9394
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	0.4332	0.398	144	1.089	0.8849
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-0.0210	0.398	144	-0.053	1.0000
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	0.2279	0.398	144	0.573	0.9926
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	0.2059	0.398	144	0.518	0.9954
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.2711	0.398	144	0.682	0.9837
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.1832	0.398	144	-0.461	0.9974
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	0.0658	0.398	144	0.165	1.0000
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.0652	0.398	144	0.164	1.0000
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-0.3890	0.398	144	-0.978	0.9242
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.1401	0.398	144	-0.352	0.9993
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-0.4543	0.398	144	-1.142	0.8628
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-0.2053	0.398	144	-0.516	0.9955
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.2489	0.398	144	0.626	0.9889

Continúa

Anexo 2

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos bajo condiciones del experimento

Tiempo_h = 24, ppm = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	-0.3977	0.398 144	-1.000	0.9173	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	0.4396	0.398 144	1.105	0.8785	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	0.4930	0.398 144	1.240	0.8166	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-0.1082	0.398 144	-0.272	0.9998	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	-0.2539	0.398 144	-0.638	0.9879	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	0.8373	0.398 144	2.105	0.2904	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.8907	0.398 144	2.240	0.2263	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	0.2895	0.398 144	0.728	0.9782	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	0.1438	0.398 144	0.362	0.9992	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.0534	0.398 144	0.134	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-0.5478	0.398 144	-1.377	0.7404	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.6935	0.398 144	-1.744	0.5054	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-0.6013	0.398 144	-1.512	0.6572	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-0.7469	0.398 144	-1.878	0.4198	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	-0.1457	0.398 144	-0.366	0.9991	

Tiempo_h = 48, ppm = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	0.1712	0.398 144	0.430	0.9981	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	0.6737	0.398 144	1.694	0.5379	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	2.3402	0.398 144	5.884	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	0.2817	0.398 144	0.708	0.9807	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	0.2817	0.398 144	0.708	0.9807	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	0.5026	0.398 144	1.264	0.8041	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	2.1690	0.398 144	5.454	<.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	0.1105	0.398 144	0.278	0.9998	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	0.1105	0.398 144	0.278	0.9998	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	1.6664	0.398 144	4.190	0.0007	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-0.3920	0.398 144	-0.986	0.9218	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.3920	0.398 144	-0.986	0.9218	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-2.0585	0.398 144	-5.176	<.0001	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-2.0585	0.398 144	-5.176	<.0001	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.0000	0.398 144	0.000	1.0000	

Tiempo_h = 0, ppm = 1:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	0.1622	0.398 144	0.408	0.9985	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	0.3680	0.398 144	0.925	0.9394	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	0.4332	0.398 144	1.089	0.8849	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-0.0210	0.398 144	-0.053	1.0000	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	0.2279	0.398 144	0.573	0.9926	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	0.2059	0.398 144	0.518	0.9954	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.2711	0.398 144	0.682	0.9837	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.1832	0.398 144	-0.461	0.9974	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	0.0658	0.398 144	0.165	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.0652	0.398 144	0.164	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-0.3890	0.398 144	-0.978	0.9242	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.1401	0.398 144	-0.352	0.9993	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-0.4543	0.398 144	-1.142	0.8628	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-0.2053	0.398 144	-0.516	0.9955	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.2489	0.398 144	0.626	0.9889	

Continúa

Anexo 2

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos bajo condiciones del experimento

Tiempo_h = 24, ppm = 1:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	-2.2240	0.398 144	-5.592	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	-2.2408	0.398 144	-5.635	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	-2.0762	0.398 144	-5.221	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-2.9985	0.398 144	-7.540	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	-2.3427	0.398 144	-5.891	<.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	-0.0168	0.398 144	-0.042	1.0000	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.1478	0.398 144	0.372	0.9991	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.7745	0.398 144	-1.948	0.3778	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	-0.1186	0.398 144	-0.298	0.9997	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.1646	0.398 144	0.414	0.9984	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-0.7577	0.398 144	-1.905	0.4032	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.1018	0.398 144	-0.256	0.9998	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-0.9223	0.398 144	-2.319	0.1932	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-0.2664	0.398 144	-0.670	0.9849	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.6559	0.398 144	1.649	0.5675	

Tiempo_h = 48, ppm = 1:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	-2.2650	0.398 144	-5.695	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	-2.7444	0.398 144	-6.901	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	-2.4173	0.398 144	-6.078	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-2.3597	0.398 144	-5.934	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	-3.0778	0.398 144	-7.739	<.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	-0.4794	0.398 144	-1.205	0.8337	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	-0.1523	0.398 144	-0.383	0.9989	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.0947	0.398 144	-0.238	0.9999	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	-0.8128	0.398 144	-2.044	0.3230	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.3271	0.398 144	0.822	0.9630	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	0.3846	0.398 144	0.967	0.9275	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.3335	0.398 144	-0.838	0.9598	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	0.0575	0.398 144	0.145	1.0000	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-0.6606	0.398 144	-1.661	0.5598	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	-0.7181	0.398 144	-1.806	0.4654	

Tiempo_h = 0, ppm = 3:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	0.1622	0.398 144	0.408	0.9985	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	0.3680	0.398 144	0.925	0.9394	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	0.4332	0.398 144	1.089	0.8849	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-0.0210	0.398 144	-0.053	1.0000	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	0.2279	0.398 144	0.573	0.9926	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	0.2059	0.398 144	0.518	0.9954	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.2711	0.398 144	0.682	0.9837	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.1832	0.398 144	-0.461	0.9974	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	0.0658	0.398 144	0.165	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.0652	0.398 144	0.164	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-0.3890	0.398 144	-0.978	0.9242	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.1401	0.398 144	-0.352	0.9993	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-0.4543	0.398 144	-1.142	0.8628	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-0.2053	0.398 144	-0.516	0.9955	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.2489	0.398 144	0.626	0.9889	

Continúa

Anexo 2

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos bajo condiciones del experimento

Tiempo_h = 24, ppm = 3:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	-1.9414	0.398 144	-4.882	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	-2.1796	0.398 144	-5.481	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	1.4943	0.398 144	3.757	0.0033	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-2.1481	0.398 144	-5.401	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	-1.7318	0.398 144	-4.355	0.0004	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	-0.2383	0.398 144	-0.599	0.9909	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	3.4357	0.398 144	8.639	<.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.2067	0.398 144	-0.520	0.9953	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	0.2095	0.398 144	0.527	0.9950	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	3.6739	0.398 144	9.238	<.0001	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	0.0316	0.398 144	0.079	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	0.4478	0.398 144	1.126	0.8699	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-3.6424	0.398 144	-9.159	<.0001	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-3.2261	0.398 144	-8.112	<.0001	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.4162	0.398 144	1.047	0.9012	

Tiempo_h = 48, ppm = 3:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	-0.4706	0.398 144	-1.183	0.8442	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	-1.2803	0.398 144	-3.219	0.0194	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	1.5734	0.398 144	3.956	0.0016	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-0.7864	0.398 144	-1.977	0.3604	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	-1.2600	0.398 144	-3.168	0.0226	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	-0.8096	0.398 144	-2.036	0.3274	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	2.0440	0.398 144	5.140	<.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.3158	0.398 144	-0.794	0.9682	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	-0.7894	0.398 144	-1.985	0.3561	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	2.8537	0.398 144	7.176	<.0001	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	0.4939	0.398 144	1.242	0.8155	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	0.0203	0.398 144	0.051	1.0000	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-2.3598	0.398 144	-5.934	<.0001	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-2.8334	0.398 144	-7.125	<.0001	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	-0.4736	0.398 144	-1.191	0.8406	

Tiempo_h = 0, ppm = 5:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	0.1622	0.398 144	0.408	0.9985	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	0.3680	0.398 144	0.925	0.9394	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	0.4332	0.398 144	1.089	0.8849	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-0.0210	0.398 144	-0.053	1.0000	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	0.2279	0.398 144	0.573	0.9926	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	0.2059	0.398 144	0.518	0.9954	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.2711	0.398 144	0.682	0.9837	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-0.1832	0.398 144	-0.461	0.9974	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	0.0658	0.398 144	0.165	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.0652	0.398 144	0.164	1.0000	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-0.3890	0.398 144	-0.978	0.9242	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-0.1401	0.398 144	-0.352	0.9993	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-0.4543	0.398 144	-1.142	0.8628	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-0.2053	0.398 144	-0.516	0.9955	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.2489	0.398 144	0.626	0.9889	

Anexo 2

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos bajo condiciones del experimento

Tiempo_h = 24, ppm = 5:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	-1.5475	0.398 144	-3.891	0.0021	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	-1.4358	0.398 144	-3.610	0.0055	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	-0.7879	0.398 144	-1.981	0.3583	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	-3.4417	0.398 144	-8.654	<.0001	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	-3.0004	0.398 144	-7.545	<.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	0.1117	0.398 144	0.281	0.9998	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.7597	0.398 144	1.910	0.4002	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	-1.8942	0.398 144	-4.763	0.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	-1.4529	0.398 144	-3.653	0.0048	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	0.6480	0.398 144	1.629	0.5806	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	-2.0059	0.398 144	-5.044	<.0001	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-1.5646	0.398 144	-3.934	0.0018	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	-2.6539	0.398 144	-6.673	<.0001	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-2.2126	0.398 144	-5.563	<.0001	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	0.4413	0.398 144	1.110	0.8767	

Tiempo_h = 48, ppm = 5:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_008	0.0000	0.398 144	0.000	1.0000	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_009	-1.4358	0.398 144	-3.610	0.0055	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_010	0.0000	0.398 144	0.000	1.0000	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_011	0.0000	0.398 144	0.000	1.0000	
VB_SAL{EIF_007 - VB_SAL{EIF_012	-2.6306	0.398 144	-6.615	<.0001	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_009	-1.4358	0.398 144	-3.610	0.0055	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_010	0.0000	0.398 144	0.000	1.0000	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_011	0.0000	0.398 144	0.000	1.0000	
VB_SAL{EIF_008 - VB_SAL{EIF_012	-2.6306	0.398 144	-6.615	<.0001	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_010	1.4358	0.398 144	3.610	0.0055	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_011	1.4358	0.398 144	3.610	0.0055	
VB_SAL{EIF_009 - VB_SAL{EIF_012	-1.1948	0.398 144	-3.004	0.0364	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_011	0.0000	0.398 144	0.000	1.0000	
VB_SAL{EIF_010 - VB_SAL{EIF_012	-2.6306	0.398 144	-6.615	<.0001	
VB_SAL{EIF_011 - VB_SAL{EIF_012	-2.6306	0.398 144	-6.615	<.0001	

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 6 estimates

Anexo 3

Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para los fagos

Tiempo_h = 0, ppm = 0:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	10.211236	0.2812116	144	9.655400	10.767071
VB_SAL{EIF_008	10.049073	0.2812116	144	9.493237	10.604909
VB_SAL{EIF_009	9.843195	0.2812116	144	9.287359	10.399031
VB_SAL{EIF_010	9.777990	0.2812116	144	9.222155	10.333826
VB_SAL{EIF_011	10.232241	0.2812116	144	9.676405	10.788077
VB_SAL{EIF_012	9.983309	0.2812116	144	9.427473	10.539145

Tiempo_h = 24, ppm = 0:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	5.392034	0.2812116	144	4.836198	5.947870
VB_SAL{EIF_008	5.789739	0.2812116	144	5.233904	6.345575
VB_SAL{EIF_009	4.952449	0.2812116	144	4.396613	5.508285
VB_SAL{EIF_010	4.899013	0.2812116	144	4.343177	5.454848
VB_SAL{EIF_011	5.500269	0.2812116	144	4.944433	6.056105
VB_SAL{EIF_012	5.645955	0.2812116	144	5.090119	6.201791

Tiempo_h = 48, ppm = 0:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	5.673731	0.2812116	144	5.117895	6.229567
VB_SAL{EIF_008	5.502575	0.2812116	144	4.946739	6.058411
VB_SAL{EIF_009	5.000004	0.2812116	144	4.444169	5.555840
VB_SAL{EIF_010	3.333572	0.2812116	144	2.777736	3.889408
VB_SAL{EIF_011	5.392033	0.2812116	144	4.836197	5.947868
VB_SAL{EIF_012	5.392033	0.2812116	144	4.836197	5.947868

Tiempo_h = 0, ppm = 1:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	10.211236	0.2812116	144	9.655400	10.767071
VB_SAL{EIF_008	10.049073	0.2812116	144	9.493237	10.604909
VB_SAL{EIF_009	9.843195	0.2812116	144	9.287359	10.399031
VB_SAL{EIF_010	9.777990	0.2812116	144	9.222155	10.333826
VB_SAL{EIF_011	10.232241	0.2812116	144	9.676405	10.788077
VB_SAL{EIF_012	9.983309	0.2812116	144	9.427473	10.539145

Tiempo_h = 24, ppm = 1:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	1.693904	0.2812116	144	1.138068	2.249739
VB_SAL{EIF_008	3.917931	0.2812116	144	3.362095	4.473767
VB_SAL{EIF_009	3.934730	0.2812116	144	3.378894	4.490565
VB_SAL{EIF_010	3.770122	0.2812116	144	3.214286	4.325958
VB_SAL{EIF_011	4.692450	0.2812116	144	4.136614	5.248286
VB_SAL{EIF_012	4.036567	0.2812116	144	3.480731	4.592402

Tiempo_h = 48, ppm = 1:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	0.916321	0.2812116	144	0.360485	1.472157
VB_SAL{EIF_008	3.181322	0.2812116	144	2.625486	3.737157
VB_SAL{EIF_009	3.660674	0.2812116	144	3.104838	4.216509
VB_SAL{EIF_010	3.333579	0.2812116	144	2.777744	3.889415
VB_SAL{EIF_011	3.276034	0.2812116	144	2.720199	3.831870
VB_SAL{EIF_012	3.994135	0.2812116	144	3.438299	4.549971

Continúa

Anexo 3

Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para los fagos

Tiempo_h = 0, ppm = 3:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	10.211236	0.2812116	144	9.655400	10.767071
VB_SAL{EIF_008	10.049073	0.2812116	144	9.493237	10.604909
VB_SAL{EIF_009	9.843195	0.2812116	144	9.287359	10.399031
VB_SAL{EIF_010	9.777990	0.2812116	144	9.222155	10.333826
VB_SAL{EIF_011	10.232241	0.2812116	144	9.676405	10.788077
VB_SAL{EIF_012	9.983309	0.2812116	144	9.427473	10.539145

Tiempo_h = 24, ppm = 3:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	1.494296	0.2812116	144	0.938460	2.050132
VB_SAL{EIF_008	3.435652	0.2812116	144	2.879816	3.991488
VB_SAL{EIF_009	3.673936	0.2812116	144	3.118100	4.229772
VB_SAL{EIF_010	0.000000	0.2812116	144	-0.555836	0.555836
VB_SAL{EIF_011	3.642351	0.2812116	144	3.086515	4.198186
VB_SAL{EIF_012	3.226130	0.2812116	144	2.670294	3.781966

Tiempo_h = 48, ppm = 3:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	1.573444	0.2812116	144	1.017609	2.129280
VB_SAL{EIF_008	2.044049	0.2812116	144	1.488214	2.599885
VB_SAL{EIF_009	2.853694	0.2812116	144	2.297858	3.409530
VB_SAL{EIF_010	0.000000	0.2812116	144	-0.555836	0.555836
VB_SAL{EIF_011	2.359812	0.2812116	144	1.803976	2.915647
VB_SAL{EIF_012	2.833427	0.2812116	144	2.277591	3.389263

Tiempo_h = 0, ppm = 5:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	10.211236	0.2812116	144	9.655400	10.767071
VB_SAL{EIF_008	10.049073	0.2812116	144	9.493237	10.604909
VB_SAL{EIF_009	9.843195	0.2812116	144	9.287359	10.399031
VB_SAL{EIF_010	9.777990	0.2812116	144	9.222155	10.333826
VB_SAL{EIF_011	10.232241	0.2812116	144	9.676405	10.788077
VB_SAL{EIF_012	9.983309	0.2812116	144	9.427473	10.539145

Tiempo_h = 24, ppm = 5:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	0.000000	0.2812116	144	-0.555836	0.555836
VB_SAL{EIF_008	1.547524	0.2812116	144	0.991689	2.103360
VB_SAL{EIF_009	1.435839	0.2812116	144	0.880003	1.991675
VB_SAL{EIF_010	0.787871	0.2812116	144	0.232035	1.343706
VB_SAL{EIF_011	3.441736	0.2812116	144	2.885900	3.997572
VB_SAL{EIF_012	3.000434	0.2812116	144	2.444598	3.556270

Tiempo_h = 48, ppm = 5:

Fago	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
VB_SAL{EIF_007	0.000000	0.2812116	144	-0.555836	0.555836
VB_SAL{EIF_008	0.000000	0.2812116	144	-0.555836	0.555836
VB_SAL{EIF_009	1.435839	0.2812116	144	0.880003	1.991675
VB_SAL{EIF_010	0.000000	0.2812116	144	-0.555836	0.555836
VB_SAL{EIF_011	0.000000	0.2812116	144	-0.555836	0.555836
VB_SAL{EIF_012	2.630607	0.2812116	144	2.074772	3.186443

Confidence level used: 0.95

Anexo 4

Tabla ANOVA de los efectos principales e interacciones entre fago, tiempo de incubación y MOI sobre la variación del título fágico

	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F value
Fago	2.1099	1.0550	2	36	70.550
MOI	3.0660	1.0220	3	36	68.347
Tiempo_h	28.3688	14.1844	2	36	948.571
Fago:MOI	6.2419	1.0403	6	36	69.571
Fago:Tiempo_h	3.8837	0.9709	4	36	64.929
MOI:Tiempo_h	5.6381	0.9397	6	36	62.841
Fago:MOI:Tiempo_h	12.9722	1.0810	12	36	72.292
Pr(>F)					
Fago	3.512e-13	***			
MOI	6.190e-15	***			
Tiempo_h	< 2.2e-16	***			
Fago:MOI	< 2.2e-16	***			
Fago:Tiempo_h	5.797e-16	***			
MOI:Tiempo_h	< 2.2e-16	***			
Fago:MOI:Tiempo_h	< 2.2e-16	***			

Signif. codes:					
0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Anexo 5

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos

Fago = VB_SAL{EIF_008, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI0.1 - MOI10	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI0.1 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI1 - MOI10	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI1 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI10 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000

Fago = VB_SAL{EIF_009, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI0.1 - MOI10	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI0.1 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI1 - MOI10	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI1 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI10 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000

Fago = VB_SAL{EIF_011, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI0.1 - MOI10	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI0.1 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI1 - MOI10	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI1 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000
MOI10 - MOI100	0.0000	0.122	35	0.000	1.0000

Continúa

Anexo 5

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de fagos

Fago = VB_SAL{EIF_008, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	0.1328	0.122	35	1.086	0.7003
MOI0.1 - MOI10	-0.1801	0.122	35	-1.473	0.4644
MOI0.1 - MOI100	-0.0645	0.122	35	-0.527	0.9519
MOI1 - MOI10	-0.3129	0.122	35	-2.559	0.0682
MOI1 - MOI100	-0.1973	0.122	35	-1.613	0.3845
MOI10 - MOI100	0.1156	0.122	35	0.945	0.7808

Fago = VB_SAL{EIF_009, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	0.3327	0.122	35	2.721	0.0473
MOI0.1 - MOI10	0.0230	0.122	35	0.188	0.9976
MOI0.1 - MOI100	0.1993	0.122	35	1.630	0.3758
MOI1 - MOI10	-0.3098	0.122	35	-2.533	0.0720
MOI1 - MOI100	-0.1335	0.122	35	-1.092	0.6969
MOI10 - MOI100	0.1763	0.122	35	1.442	0.4826

Fago = VB_SAL{EIF_011, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	-0.1586	0.122	35	-1.297	0.5710
MOI0.1 - MOI10	0.2281	0.122	35	1.865	0.2614
MOI0.1 - MOI100	0.1171	0.122	35	0.958	0.7739
MOI1 - MOI10	0.3866	0.122	35	3.162	0.0163
MOI1 - MOI100	0.2757	0.122	35	2.255	0.1286
MOI10 - MOI100	-0.1109	0.122	35	-0.907	0.8012

Fago = VB_SAL{EIF_008, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	0.1109	0.122	35	0.907	0.8012
MOI0.1 - MOI10	0.1700	0.122	35	1.390	0.5139
MOI0.1 - MOI100	4.3116	0.122	35	35.259	<.0001
MOI1 - MOI10	0.0590	0.122	35	0.483	0.9624
MOI1 - MOI100	4.2007	0.122	35	34.352	<.0001
MOI10 - MOI100	4.1417	0.122	35	33.869	<.0001

Fago = VB_SAL{EIF_009, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	0.3512	0.122	35	2.872	0.0332
MOI0.1 - MOI10	0.3235	0.122	35	2.646	0.0562
MOI0.1 - MOI100	0.3848	0.122	35	3.147	0.0169
MOI1 - MOI10	-0.0277	0.122	35	-0.227	0.9958
MOI1 - MOI100	0.0335	0.122	35	0.274	0.9927
MOI10 - MOI100	0.0613	0.122	35	0.501	0.9583

Fago = VB_SAL{EIF_011, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
MOI0.1 - MOI1	-0.2758	0.122	35	-2.255	0.1285
MOI0.1 - MOI10	0.4065	0.122	35	3.324	0.0107
MOI0.1 - MOI100	-0.2450	0.122	35	-2.004	0.2060
MOI1 - MOI10	0.6822	0.122	35	5.579	<.0001
MOI1 - MOI100	0.0307	0.122	35	0.251	0.9943
MOI10 - MOI100	-0.6515	0.122	35	-5.328	<.0001

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

Anexo 6

Parámetros de reducción bacteriana: valores logarítmicos iniciales y finales y disminución ΔLog_{10} para cada combinación experimental

Fago	MOI	Tiempo_h	log10_tf	log10_t0	reduccion_log10
<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
1 VB_SAL{EIF_008	0.1	24	3.54	5	1.46
2 VB_SAL{EIF_008	0.1	48	4.31	5	0.688
3 VB_SAL{EIF_008	1	24	3.41	5	1.59
4 VB_SAL{EIF_008	1	48	4.20	5	0.799
5 VB_SAL{EIF_008	10	24	3.72	5	1.28
6 VB_SAL{EIF_008	10	48	4.14	5	0.858
7 VB_SAL{EIF_008	100	24	3.60	5	1.40
8 VB_SAL{EIF_008	100	48	0	5	5
9 VB_SAL{EIF_009	0.1	24	3.80	5	1.20
10 VB_SAL{EIF_009	0.1	48	4.59	5	0.412
11 VB_SAL{EIF_009	1	24	3.47	5	1.53
12 VB_SAL{EIF_009	1	48	4.24	5	0.763
13 VB_SAL{EIF_009	10	24	3.78	5	1.22
14 VB_SAL{EIF_009	10	48	4.26	5	0.735
15 VB_SAL{EIF_009	100	24	3.60	5	1.40
16 VB_SAL{EIF_009	100	48	4.20	5	0.797
17 VB_SAL{EIF_011	0.1	24	3.47	5	1.53
18 VB_SAL{EIF_011	0.1	48	3.98	5	1.02
19 VB_SAL{EIF_011	1	24	3.63	5	1.37
20 VB_SAL{EIF_011	1	48	4.26	5	0.745
21 VB_SAL{EIF_011	10	24	3.24	5	1.76
22 VB_SAL{EIF_011	10	48	3.57	5	1.43
23 VB_SAL{EIF_011	100	24	3.35	5	1.65
24 VB_SAL{EIF_011	100	48	4.22	5	0.775

Anexo 7

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de los cócteles de fagos bajo condiciones del experimento

ppm = 0, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.102538	0.601 94	-0.171	
C_008_009 - C_008_012	0.082974	0.601 94	0.138	
C_008_009 - C_009_012	0.150874	0.601 94	0.251	
C_008_009_012 - C_008_012	0.185512	0.601 94	0.309	
C_008_009_012 - C_009_012	0.253413	0.601 94	0.422	
C_008_012 - C_009_012	0.067900	0.601 94	0.113	
p.value				
0.9982				
0.9991				
0.9944				
0.9897				
0.9747				
0.9995				

Continúa

Anexo 7

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de los cócteles de fagos bajo condiciones del experimento

ppm = 1, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.102538	0.601 94		-0.171
C_008_009 - C_008_012	0.082974	0.601 94		0.138
C_008_009 - C_009_012	0.150874	0.601 94		0.251
C_008_009_012 - C_008_012	0.185512	0.601 94		0.309
C_008_009_012 - C_009_012	0.253413	0.601 94		0.422
C_008_012 - C_009_012	0.067900	0.601 94		0.113

p.value

0.9982
0.9991
0.9944
0.9897
0.9747
0.9995

ppm = 3, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.102538	0.601 94		-0.171
C_008_009 - C_008_012	0.082974	0.601 94		0.138
C_008_009 - C_009_012	0.150874	0.601 94		0.251
C_008_009_012 - C_008_012	0.185512	0.601 94		0.309
C_008_009_012 - C_009_012	0.253413	0.601 94		0.422
C_008_012 - C_009_012	0.067900	0.601 94		0.113

p.value

0.9982
0.9991
0.9944
0.9897
0.9747
0.9995

ppm = 5, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.102538	0.601 94		-0.171
C_008_009 - C_008_012	0.082974	0.601 94		0.138
C_008_009 - C_009_012	0.150874	0.601 94		0.251
C_008_009_012 - C_008_012	0.185512	0.601 94		0.309
C_008_009_012 - C_009_012	0.253413	0.601 94		0.422
C_008_012 - C_009_012	0.067900	0.601 94		0.113

p.value

0.9982
0.9991
0.9944
0.9897
0.9747
0.9995

ppm = 0, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.273239	0.601 94		-0.455
C_008_009 - C_008_012	-0.001297	0.601 94		-0.002
C_008_009 - C_009_012	0.129837	0.601 94		0.216
C_008_009_012 - C_008_012	0.271942	0.601 94		0.452
C_008_009_012 - C_009_012	0.403077	0.601 94		0.671
C_008_012 - C_009_012	0.131134	0.601 94		0.218

p.value

0.9686 1.0000 0.9964 0.9690 0.9079 0.9963

Continúa

Anexo 7

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de los cócteles de fagos bajo condiciones del experimento

ppm = 1, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	0.929372	0.601 94	1.546	
C_008_009 - C_008_012	1.113875	0.601 94	1.853	
C_008_009 - C_009_012	0.981980	0.601 94	1.634	
C_008_009_012 - C_008_012	0.184503	0.601 94	0.307	
C_008_009_012 - C_009_012	0.052608	0.601 94	0.088	
C_008_012 - C_009_012	-0.131896	0.601 94	-0.219	
p.value				
	0.4143			
	0.2553			
	0.3648			
	0.9899			
	0.9998			
	0.9962			

ppm = 3, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.042328	0.601 94	-0.070	
C_008_009 - C_008_012	-0.076786	0.601 94	-0.128	
C_008_009 - C_009_012	0.015269	0.601 94	0.025	
C_008_009_012 - C_008_012	-0.034458	0.601 94	-0.057	
C_008_009_012 - C_009_012	0.057596	0.601 94	0.096	
C_008_012 - C_009_012	0.092054	0.601 94	0.153	
p.value				
	0.9999			
	0.9992			
	1.0000			
	0.9999			
	0.9997			
	0.9987			

ppm = 5, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.082705	0.601 94	-0.138	
C_008_009 - C_008_012	0.297047	0.601 94	0.494	
C_008_009 - C_009_012	-0.036985	0.601 94	-0.062	
C_008_009_012 - C_008_012	0.379752	0.601 94	0.632	
C_008_009_012 - C_009_012	0.045720	0.601 94	0.076	
C_008_012 - C_009_012	-0.334032	0.601 94	-0.556	
p.value				
	0.9991			
	0.9602			
	0.9999			
	0.9215			
	0.9998			
	0.9448			

Continúa

Anexo 7

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de los cócteles de fagos bajo condiciones del experimento

ppm = 0, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-3.022316	0.601 94		-5.029
C_008_009 - C_008_012	-2.708313	0.601 94		-4.506
C_008_009 - C_009_012	-2.882606	0.601 94		-4.796
C_008_009_012 - C_008_012	0.314003	0.601 94		0.522
C_008_009_012 - C_009_012	0.139710	0.601 94		0.232
C_008_012 - C_009_012	-0.174293	0.601 94		-0.290
p.value				
	<.0001			
	0.0001			
	<.0001			
	0.9535			
	0.9955			
	0.9915			

ppm = 1, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	0.091000	0.601 94		0.151
C_008_009 - C_008_012	-0.188090	0.601 94		-0.313
C_008_009 - C_009_012	0.091567	0.601 94		0.152
C_008_009_012 - C_008_012	-0.279091	0.601 94		-0.464
C_008_009_012 - C_009_012	0.000567	0.601 94		0.001
C_008_012 - C_009_012	0.279658	0.601 94		0.465
p.value				
	0.9988			
	0.9893			
	0.9987			
	0.9666			
	1.0000			
	0.9664			

ppm = 3, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.743483	0.601 94		-1.237
C_008_009 - C_008_012	0.068040	0.601 94		0.113
C_008_009 - C_009_012	0.159040	0.601 94		0.265
C_008_009_012 - C_008_012	0.811523	0.601 94		1.350
C_008_009_012 - C_009_012	0.902523	0.601 94		1.502
C_008_012 - C_009_012	0.091000	0.601 94		0.151
p.value				
	0.6050			
	0.9995			
	0.9935			
	0.5336			
	0.4406			
	0.9988			

ppm = 5, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.301030	0.601 94		-0.501
C_008_009 - C_008_012	0.000000	0.601 94		0.000
C_008_009 - C_009_012	-0.032303	0.601 94		-0.054
C_008_009_012 - C_008_012	0.301030	0.601 94		0.501
C_008_009_012 - C_009_012	0.268727	0.601 94		0.447
C_008_012 - C_009_012	-0.032303	0.601 94		-0.054
p.value				
	0.9587			
	1.0000			
	0.9999			
	0.9587			
	0.9700			

0.9999 Degrees-of-freedom method: kenward-roger

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

Anexo 8

Tabla ANOVA de los efectos principales e interacciones entre bacterias, tiempo de incubación y concentración de cloro (ppm)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Coctel	3	1.882	0.627	12.55	5.44e-07 ***
ppm	3	12.386	4.129	82.56	< 2e-16 ***
Tiempo_h	2	25.240	12.620	252.37	< 2e-16 ***
Coctel:ppm	9	23.903	2.656	53.11	< 2e-16 ***
Coctel:Tiempo_h	6	14.870	2.478	49.56	< 2e-16 ***
ppm:Tiempo_h	6	8.567	1.428	28.55	< 2e-16 ***
Coctel:ppm:Tiempo_h	18	29.304	1.628	32.56	< 2e-16 ***
Residuals	96	4.800	0.050		

Signif. codes:

0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo 9

Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para las bacterias

Coctel	ppm	Tiempo_h	emmean	SE	df	lower.CL
C_008_009	0	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009_012	0	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_012	0	0	5.00	0.129	96	4.744
C_009_012	0	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009	1	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009_012	1	0	0.00	0.129	96	-0.256
C_008_012	1	0	5.00	0.129	96	4.744
C_009_012	1	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009	3	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009_012	3	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_012	3	0	5.00	0.129	96	4.744
C_009_012	3	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009	5	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009_012	5	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_012	5	0	5.00	0.129	96	4.744
C_009_012	5	0	5.00	0.129	96	4.744
C_008_009	0	24	4.24	0.129	96	3.988
C_008_009_012	0	24	4.70	0.129	96	4.446
C_008_012	0	24	4.46	0.129	96	4.204
C_009_012	0	24	4.69	0.129	96	4.431
C_008_009	1	24	4.51	0.129	96	4.258
C_008_009_012	1	24	4.11	0.129	96	3.858
C_008_012	1	24	3.88	0.129	96	3.627
C_009_012	1	24	3.66	0.129	96	3.404
C_008_009	3	24	4.38	0.129	96	4.128
C_008_009_012	3	24	4.54	0.129	96	4.283
C_008_012	3	24	5.38	0.129	96	5.122
C_009_012	3	24	3.55	0.129	96	3.296
C_008_009	5	24	3.74	0.129	96	3.483

Continúa

Anexo 9

Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para las bacterias

C_008_009_012	5	24	4.39	0.129	96	4.130
C_008_012	5	24	3.58	0.129	96	3.321
C_009_012	5	24	3.70	0.129	96	3.448
C_008_009	0	48	3.67	0.129	96	3.415
C_008_009_012	0	48	4.33	0.129	96	4.075
C_008_012	0	48	3.75	0.129	96	3.495
C_009_012	0	48	4.44	0.129	96	4.179
C_008_009	1	48	2.90	0.129	96	2.647
C_008_009_012	1	48	3.28	0.129	96	3.021
C_008_012	1	48	3.63	0.129	96	3.378
C_009_012	1	48	3.72	0.129	96	3.465
C_008_009	3	48	3.56	0.129	96	3.304
C_008_009_012	3	48	3.37	0.129	96	3.118
C_008_012	3	48	3.92	0.129	96	3.668
C_009_012	3	48	3.14	0.129	96	2.883
C_008_009	5	48	3.80	0.129	96	3.546
C_008_009_012	5	48	4.39	0.129	96	4.136
C_008_012	5	48	3.27	0.129	96	3.014
C_009_012	5	48	3.43	0.129	96	3.170

Coctel = C_008_009, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm0 - ppm3	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm0 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm1 - ppm3	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm1 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm3 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000

Coctel = C_008_009_012, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	5.0000	0.183	94	27.385	<.0001
ppm0 - ppm3	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm0 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm1 - ppm3	-5.0000	0.183	94	-27.385	<.0001
ppm1 - ppm5	-5.0000	0.183	94	-27.385	<.0001
ppm3 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000

Coctel = C_008_012, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm0 - ppm3	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm0 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm1 - ppm3	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm1 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm3 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000

Coctel = C_009_012, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm0 - ppm3	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm0 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm1 - ppm3	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm1 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000
ppm3 - ppm5	0.0000	0.183	94	0.000	1.0000

Anexo 9

Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para las bacterias

Coctel = C_008_009, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	-0.2697	0.183	94	-1.477	0.4552
ppm0 - ppm3	-0.1405	0.183	94	-0.769	0.8681
ppm0 - ppm5	0.5050	0.183	94	2.766	0.0340
ppm1 - ppm3	0.1293	0.183	94	0.708	0.8937
ppm1 - ppm5	0.7747	0.183	94	4.243	0.0003
ppm3 - ppm5	0.6454	0.183	94	3.535	0.0035

Coctel = C_008_009_012, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.5879	0.183	94	3.220	0.0094
ppm0 - ppm3	0.1628	0.183	94	0.892	0.8092
ppm0 - ppm5	0.3159	0.183	94	1.730	0.3139
ppm1 - ppm3	-0.4251	0.183	94	-2.328	0.0989
ppm1 - ppm5	-0.2720	0.183	94	-1.490	0.4478
ppm3 - ppm5	0.1531	0.183	94	0.839	0.8359

Coctel = C_008_012, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.5767	0.183	94	3.159	0.0113
ppm0 - ppm3	-0.9179	0.183	94	-5.027	<.0001
ppm0 - ppm5	0.8833	0.183	94	4.838	<.0001
ppm1 - ppm3	-1.4946	0.183	94	-8.186	<.0001
ppm1 - ppm5	0.3065	0.183	94	1.679	0.3405
ppm3 - ppm5	1.8011	0.183	94	9.865	<.0001

Coctel = C_009_012, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	1.0266	0.183	94	5.623	<.0001
ppm0 - ppm3	1.1349	0.183	94	6.216	<.0001
ppm0 - ppm5	0.9825	0.183	94	5.381	<.0001
ppm1 - ppm3	0.1084	0.183	94	0.593	0.9338
ppm1 - ppm5	-0.0441	0.183	94	-0.241	0.9950
ppm3 - ppm5	-0.1524	0.183	94	-0.835	0.8378

Coctel = C_008_009, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.7677	0.183	94	4.205	0.0003
ppm0 - ppm3	0.1104	0.183	94	0.605	0.9304
ppm0 - ppm5	-0.1319	0.183	94	-0.723	0.8878
ppm1 - ppm3	-0.6573	0.183	94	-3.600	0.0028
ppm1 - ppm5	-0.8997	0.183	94	-4.927	<.0001
ppm3 - ppm5	-0.2423	0.183	94	-1.327	0.5480

Coctel = C_008_009_012, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	1.0543	0.183	94	5.774	<.0001
ppm0 - ppm3	0.9576	0.183	94	5.245	<.0001
ppm0 - ppm5	-0.0606	0.183	94	-0.332	0.9873
ppm1 - ppm3	-0.0966	0.183	94	-0.529	0.9518
ppm1 - ppm5	-1.1149	0.183	94	-6.106	<.0001
ppm3 - ppm5	-1.0182	0.183	94	-5.577	<.0001

Continúa

Anexo 9

Estimaciones de EMMs y sus intervalos de confianza para las bacterias

Coctel = C_008_012, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.1172	0.183	94	0.642	0.9180
ppm0 - ppm3	-0.1734	0.183	94	-0.949	0.7782
ppm0 - ppm5	0.4812	0.183	94	2.635	0.0476
ppm1 - ppm3	-0.2906	0.183	94	-1.592	0.3884
ppm1 - ppm5	0.3639	0.183	94	1.993	0.1979
ppm3 - ppm5	0.6545	0.183	94	3.585	0.0030

Coctel = C_009_012, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
ppm0 - ppm1	0.7142	0.183	94	3.911	0.0010
ppm0 - ppm3	1.2963	0.183	94	7.100	<.0001
ppm0 - ppm5	1.0087	0.183	94	5.524	<.0001
ppm1 - ppm3	0.5822	0.183	94	3.189	0.0103
ppm1 - ppm5	0.2945	0.183	94	1.613	0.3764
ppm3 - ppm5	-0.2877	0.183	94	-1.576	0.3974

Degrees-of-freedom method: kenward-roger

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

Anexo 10

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de bacterias en los cócteles

Coctel = C_008_009, ppm = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.75587	0.183	94	4.140	0.0002
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.32919	0.183	94	7.280	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.57333	0.183	94	3.140	0.0063

Coctel = C_008_009_012, ppm = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.29796	0.183	94	1.632	0.2374
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	0.66861	0.183	94	3.662	0.0012
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.37065	0.183	94	2.030	0.1107

Coctel = C_008_012, ppm = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.53993	0.183	94	2.957	0.0109
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.24876	0.183	94	6.839	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.70883	0.183	94	3.882	0.0006

Coctel = C_009_012, ppm = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.31285	0.183	94	1.713	0.2055
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	0.56479	0.183	94	3.093	0.0073
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.25194	0.183	94	1.380	0.3555

Coctel = C_008_009, ppm = 1:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.48614	0.183	94	2.663	0.0245
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	2.09691	0.183	94	11.485	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	1.61077	0.183	94	8.822	<.0001

Continúa

Anexo 10

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de bacterias en los cócteles

Coctel = C_008_009_012, ppm = 1:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	-4.11414	0.183	94	-22.533	<.0001
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	-3.27714	0.183	94	-17.949	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.83700	0.183	94	4.584	<.0001

Coctel = C_008_012, ppm = 1:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	1.11664	0.183	94	6.116	<.0001
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.36600	0.183	94	7.482	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.24936	0.183	94	1.366	0.3630

Coctel = C_009_012, ppm = 1:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	1.33942	0.183	94	7.336	<.0001
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.27895	0.183	94	7.005	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	-0.06048	0.183	94	-0.331	0.9414

Coctel = C_008_009, ppm = 3:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.61540	0.183	94	3.371	0.0031
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.43959	0.183	94	7.885	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.82419	0.183	94	4.514	0.0001

Coctel = C_008_009_012, ppm = 3:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.46075	0.183	94	2.524	0.0352
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.62621	0.183	94	8.907	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	1.16546	0.183	94	6.383	<.0001

Coctel = C_008_012, ppm = 3:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	-0.37793	0.183	94	-2.070	0.1017
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.07540	0.183	94	5.890	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	1.45334	0.183	94	7.960	<.0001

Coctel = C_009_012, ppm = 3:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	1.44778	0.183	94	7.929	<.0001
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.86112	0.183	94	10.193	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.41334	0.183	94	2.264	0.0660

Coctel = C_008_009, ppm = 5:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	1.26084	0.183	94	6.906	<.0001
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.19725	0.183	94	6.557	<.0001
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	-0.06359	0.183	94	-0.348	0.9354

Coctel = C_008_009_012, ppm = 5:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	0.61388	0.183	94	3.362	0.0032
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	0.60797	0.183	94	3.330	0.0035
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	-0.00591	0.183	94	-0.032	0.9994

Continúa

Anexo 10

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de bacterias en los cócteles

Coctel = C_008_012, ppm = 5:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	1.42318	0.183 94	7.795	<.0001	
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.72992	0.183 94	9.475	<.0001	
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.30674	0.183 94	1.680	0.2182	

Coctel = C_009_012, ppm = 5:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Tiempo_h0 - Tiempo_h24	1.29535	0.183 94	7.095	<.0001	
Tiempo_h0 - Tiempo_h48	1.57344	0.183 94	8.618	<.0001	
Tiempo_h24 - Tiempo_h48	0.27809	0.183 94	1.523	0.2848	

Degrees-of-freedom method: kenward-roger

P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

Anexo 11

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de las bacterias

ppm = 0, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
C_008_009 - C_008_009_012	0.0000	0.183 94	0.000		
C_008_009 - C_008_012	0.0000	0.183 94	0.000		
C_008_009 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000		
C_008_009_012 - C_008_012	0.0000	0.183 94	0.000		
C_008_009_012 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000		
C_008_012 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000		

ppm = 1, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
C_008_009 - C_008_009_012	5.0000	0.183 94	27.385		
C_008_009 - C_008_012	0.0000	0.183 94	0.000		
C_008_009 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000		
C_008_009_012 - C_008_012	-5.0000	0.183 94	-27.385		
C_008_009_012 - C_009_012	-5.0000	0.183 94	-27.385		
C_008_012 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000		

Continúa

Anexo 11

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de las bacterias

ppm = 3, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009 - C_008_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009_012 - C_008_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009_012 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_012 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	

p.value

1.0000
1.0000
1.0000
1.0000
1.0000
1.0000

ppm = 5, Tiempo_h = 0:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009 - C_008_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009_012 - C_008_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_009_012 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	
C_008_012 - C_009_012	0.0000	0.183 94	0.000	

p.value

1.0000
1.0000
1.0000
1.0000
1.0000
1.0000

ppm = 0, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.4579	0.183 94	-2.508	
C_008_009 - C_008_012	-0.2159	0.183 94	-1.183	
C_008_009 - C_009_012	-0.4430	0.183 94	-2.426	
C_008_009_012 - C_008_012	0.2420	0.183 94	1.325	
C_008_009_012 - C_009_012	0.0149	0.183 94	0.082	
C_008_012 - C_009_012	-0.2271	0.183 94	-1.244	

p.value

0.0652
0.6392
0.0790
0.5493
0.9998
0.6008

ppm = 1, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	0.3997	0.183 94	2.189	
C_008_009 - C_008_012	0.6305	0.183 94	3.453	
C_008_009 - C_009_012	0.8533	0.183 94	4.673	
C_008_009_012 - C_008_012	0.2308	0.183 94	1.264	
C_008_009_012 - C_009_012	0.4536	0.183 94	2.484	
C_008_012 - C_009_012	0.2228	0.183 94	1.220	

p.value

0.1337
0.0045
0.0001
0.5880
0.0690

Continúa

Anexo 11

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de las bacterias

ppm = 3, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.1546	0.183	94	-0.847
C_008_009 - C_008_012	-0.9933	0.183	94	-5.440
C_008_009 - C_009_012	0.8324	0.183	94	4.559
C_008_009_012 - C_008_012	-0.8387	0.183	94	-4.593
C_008_009_012 - C_009_012	0.9870	0.183	94	5.406
C_008_012 - C_009_012	1.8257	0.183	94	9.999

p.value
0.8318
<.0001
0.0001
0.0001
<.0001
<.0001

ppm = 5, Tiempo_h = 24:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.6470	0.183	94	-3.543
C_008_009 - C_008_012	0.1623	0.183	94	0.889
C_008_009 - C_009_012	0.0345	0.183	94	0.189
C_008_009_012 - C_008_012	0.8093	0.183	94	4.433
C_008_009_012 - C_009_012	0.6815	0.183	94	3.732
C_008_012 - C_009_012	-0.1278	0.183	94	-0.700

p.value
0.0034
0.8105
0.9976
0.0001
0.0018
0.8968

ppm = 0, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.6606	0.183	94	-3.618
C_008_009 - C_008_012	-0.0804	0.183	94	-0.441
C_008_009 - C_009_012	-0.7644	0.183	94	-4.187
C_008_009_012 - C_008_012	0.5802	0.183	94	3.177
C_008_009_012 - C_009_012	-0.1038	0.183	94	-0.569
C_008_012 - C_009_012	-0.6840	0.183	94	-3.746

p.value
0.0027
0.9713
0.0004
0.0107
0.9412
0.0017

ppm = 1, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.3741	0.183	94	-2.049
C_008_009 - C_008_012	-0.7309	0.183	94	-4.003
C_008_009 - C_009_012	-0.8180	0.183	94	-4.480
C_008_009_012 - C_008_012	-0.3569	0.183	94	-1.955
C_008_009_012 - C_009_012	-0.4439	0.183	94	-2.431
C_008_012 - C_009_012	-0.0871	0.183	94	-0.477

p.value
0.1778
0.0007
0.0001
0.2128
0.0782

Continúa

Anexo 11

Pruebas de Tukey basadas en EMMs para la comparación de las bacterias

ppm = 3, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	0.1866	0.183 94	1.022	
C_008_009 - C_008_012	-0.3642	0.183 94	-1.995	
C_008_009 - C_009_012	0.4215	0.183 94	2.309	
C_008_009_012 - C_008_012	-0.5508	0.183 94	-3.017	
C_008_009_012 - C_009_012	0.2349	0.183 94	1.287	
C_008_012 - C_009_012	0.7857	0.183 94	4.303	

p.value

0.7369

0.1974

0.1033

0.0170

0.5737

0.0002

ppm = 5, Tiempo_h = 48:

contrast	estimate	SE	df	t.ratio
C_008_009 - C_008_009_012	-0.5893	0.183 94	-3.227	
C_008_009 - C_008_012	0.5327	0.183 94	2.917	
C_008_009 - C_009_012	0.3762	0.183 94	2.060	
C_008_009_012 - C_008_012	1.1220	0.183 94	6.145	
C_008_009_012 - C_009_012	0.9655	0.183 94	5.288	
C_008_012 - C_009_012	-0.1565	0.183 94	-0.857	

p.value

0.0092

0.0225

0.1738

<.0001

<.0001

0.8268