



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



---

**Prospección de bacteriófagos líticos de *Salmonella* en muestras ambientales de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi, y su efecto sobre microorganismos patógenos.**

---

Trabajo de Titulación, modalidad de proyecto de investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Proyecto de investigación:** Evaluación de la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos emergentes en aguas de riego y superficiales del Ecuador, años 2018- 2019.  
Resolución: 0192-CU-P-2018

**Autor:** Vanessa Elizabeth Sailema Guevara  
**Tutor:** PhD. William Ricardo Calero Cáceres

Ambato – Ecuador

Agosto – 2020

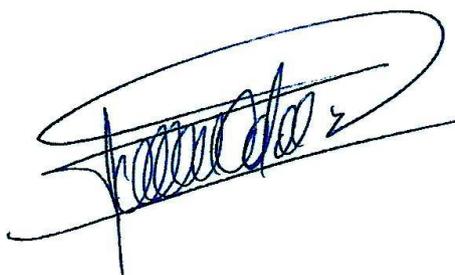
## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

**CERTIFICA**

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

Ambato, 27 de Mayo del 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'William Ricardo Calero Cáceres', is written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large, sweeping flourish at the end.

-----  
PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

TUTOR

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Vanessa Elizabeth Sailema Guevara, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



-----  
Srta. Vanessa Elizabeth Sailema Guevara

180454518-2

Autora

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

ORESTES DARIO  
LOPEZ  
HERNANDEZ

Firmado digitalmente por  
ORESTES DARIO LOPEZ  
HERNANDEZ  
Fecha: 2020.09.12 12:42:14  
-05'00'

---

Presidente del Tribunal

Dr. Orestes Darío López Hernández



Firmado electrónicamente por:

MARIO DANIEL  
GARCIA SOLIS

---

Ing. Mario Daniel García Solís, PhD

CI: 1103605471



Firmado electrónicamente por:

DAVID ANDRES  
TERAN MERA

---

Dr. David Andrés Terán Mera

CI: 1716569726

Ambato, 5 de julio del 2020

## **DEDICATORIA**

*Dedico el presente trabajo de investigación a mi familia, amigos y a cada una de las personas que de una u otra forma me han brindado su apoyo incondicional, ya que cada una ha cumplido una labor muy importante en este proceso y han contribuido para que esta nueva etapa profesional inicie.*

*Pero en especial está dedicada con mucho amor y cariño a mis padres que han sido quienes han guiado mi camino hacia la superación y a mis hermanas que han confiado plenamente en mis capacidades.*

## AGRADECIMIENTO

*En primera instancia me permito agradecer a Dios que con su infinita bondad me ha regalado cada día más de vida, y me ha ayudado a crecer como persona ya que cada día ha puesto a prueba mi perseverancia y mis ganas por salir adelante.*

*Agradezco de una manera muy particular a mis padres Ramiro Sailema y Lorena Guevara por ser una pieza crucial en esta etapa, ya que me han brindado su apoyo económico y moral en todo momento. También doy gracias a mis hermanas Johanna que siempre me ha brindado su apoyo y Camila, que a su corta edad ha estado siempre junto a mí a pesar de las adversidades; a mis amigas Jessica M. y Vanessa V. que sin esperar nada a cambio, de una u otra manera han contribuido para que este trabajo de investigación llegue a su culminación de la mejor manera, ya que ellas siempre me brindaron su ayuda. También doy gracias a una persona muy especial, Jaime Alomaliza que llegó de repente a mi vida, y desde aquel instante me ha brindado su apoyo desinteresado.*

*Doy gracias a mi tutor de tesis el Dr. William Calero, quien ha sido mi guía en este proceso, pero sobre todo por su infinita paciencia y por sus enseñanzas.*

*Gracias a todos por ser parte de esta etapa tan importante en mi vida.*

## Índice

Índice .....	vii
Índice de tablas .....	viii
Índice de Gráficos .....	ix
Resumen .....	x
Abstract .....	xi
<b>CAPITULO I</b> .....	12
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	12
<b>1.1. Antecedentes investigativos</b> .....	12
<b>1.1.1. <i>Salmonella</i></b> .....	12
<b>1.1.2. Resistencia antimicrobiana</b> .....	13
<b>1.1.3. Bacteriófagos</b> .....	16
<b>1.2. Objetivos</b> .....	20
<b>CAPÍTULO II</b> .....	21
<b>2. Metodología</b> .....	21
<b>2.1. Materiales</b> .....	21
<b>2.2. Métodos</b> .....	22
<b>2.3. Trabajo de laboratorio</b> .....	24
<b>2.3.1. Aislamiento y purificación de bacteriófagos de <i>Salmonella</i></b> .....	24
<b>2.3.2. Conservación de bacteriófagos de <i>Salmonella</i></b> .....	25
<b>2.3.3. Determinación de los perfiles de lisis de los bacteriófagos de <i>Salmonella</i></b> ....	25
<b>2.3.4. Cinéticas de inactivación de los bacteriófagos de <i>Salmonella</i></b> .....	27
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	29
<b>Verificación de Hipótesis</b> .....	45
<b>4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	46
<b>4.1. Conclusiones</b> .....	46
<b>4.2. Recomendaciones</b> .....	47
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	48
<b>ANEXOS</b> .....	54

## Índice de tablas

<b>Tabla N°1:</b> Detalle de los puntos de muestreo.....	23
<b>Tabla N°2:</b> Bacteriófagos según el punto de muestreo y el huésped .....	29
<b>Tabla N°3:</b> Datos promedio de la prueba de la gota .....	31

## Índice de Gráficos

<b>Figura N° 1:</b> Ciclos de vida de los bacteriófagos.....	17
<b>Figura N° 2:</b> Test de la gota.....	27
<b>Figura N° 3:</b> Mapa de calor de los perfiles de lisis de los bacteriófagos.....	32
<b>Figura N° 4:</b> Dendograma de perfiles de lisis de los bacteriófagos.....	33
<b>Figura N° 5:</b> Cinética de lisis por fagos de <i>S. Infantis</i> .....	34
<b>Figura N° 6:</b> Cinética fagos de <i>S. Pullorum</i> (11 y 12).....	35
<b>Figura N° 7:</b> Cinética fagos de <i>S. Pullorum</i> (13 y 16).....	35
<b>Figura N° 8:</b> Cinética fagos de <i>S. Enteritidis</i> .....	36
<b>Figura N° 9:</b> Cinética fagos de <i>S. Typhimurium</i> .....	37
<b>Figura N° 10:</b> Cinética de inactivación de f UTA 02.....	38
<b>Figura N° 11:</b> Cinética de inactivación de f UTA 07.....	38
<b>Figura N° 12:</b> Cinética de inactivación de f UTA 12.....	39
<b>Figura N° 13:</b> Cinética de inactivación de f UTA 13.....	40
<b>Figura N° 14:</b> Cinética de inactivación de f UTA 19.....	40
<b>Figura N° 15:</b> Cinética de inactivación de f UTA 21.....	41
<b>Figura N° 16:</b> Cinética de inactivación de f UTA 28.....	42

## Resumen

De acuerdo a la OMS, la resistencia antimicrobiana representa uno de los principales problemas para la salud pública a nivel mundial. La *Salmonella* es uno de los patógenos alimentarios más importantes y su alta prevalencia en el sector avícola representa un peligro potencial para la salud pública. Por tal razón, como solución alterna a los antibióticos se ha recurrido al estudio de bacteriófagos, debido a que por su especificidad son empleados como agentes de biocontrol.

Se aislaron 26 bacteriófagos de muestras de agua de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi, por medio de un aislamiento por la técnica de doble capa. Posteriormente, se evaluaron los perfiles líticos de los bacteriófagos frente a cepas patógenas y con estos resultados se realizó un análisis de tipo mapa de calor para evaluar la similitud entre perfiles. Además, se elaboró un dendograma, donde se distinguen dos clústeres de acuerdo a su perfil lítico. Finalmente, se evaluó las cinéticas de inactivación de bacteriófagos más representativos de cada clúster de lisis; para lo cual, se eligieron 7 bacteriófagos, entre los cuales destacaron por su actividad lítica los fagos f UTA 02 en *S. Infantis*, f UTA 19 y f UTA 20 en *S. Enteritidis*, que causaron un efecto de eliminación de la totalidad de la concentración del huésped después de 48 horas.

**Palabras claves:** *Salmonella*, resistencia antimicrobiana, bacteriófagos, microbiología ambiental.

## Abstract

According to the WHO, antimicrobial resistance (AMR) represents one of the main problems for public health worldwide. The genus *Salmonella* represents one of the most critical food pathogens, and its high prevalence in the Ecuadorian poultry sector poses a threat to public health. Considering the rising levels of AMR and the lack of new antibiotic molecules, the study of bacteriophages as potential tools against bacterial pathogens is regarded as an interesting alternative, due to their specificity and security.

Twenty-six bacteriophages were isolated from water samples from the provinces of Tungurahua and Cotopaxi. The double-layer technique was applied. Subsequently, the lytic profiles of the bacteriophages against pathogenic strains were evaluated. Hierarchical clustering was performed to assess the similarity between lytic patterns. Two clusters were distinguished according to their lytic pattern. The inactivation kinetics of the most representative bacteriophages of each lysis cluster were evaluated. The phages f UTA 02 (*S. Infantis*), f UTA 19, and f UTA 20 (*S. Enteritidis*) showed an interesting lytic effect, causing an entire elimination of their host after 48 hours.

**Keywords:** *Salmonella*, antimicrobial resistance, bacteriophages, environmental microbiology.

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Antecedentes investigativos

##### 1.1.1. *Salmonella*

El género *Salmonella* representa uno de los principales patógenos que causan enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Su reservorio natural son los animales y el medio ambiente (Hungaro et al., 2013). Este género representa uno de los más diversos de la familia *Enterobacteriaceae*, siendo agrupados en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Schatten & Eisenstark, 2015). La mayor diversidad genética posee la especie *S. enterica*, la cual se divide en seis subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *indica*; esta nomenclatura refleja la comprensión actual de la taxonomía de *Salmonella* (Guibourdenche et al., 2010). De acuerdo con el sistema de identificación Kauffmann-White-Le Minor, se han diferenciado 2610 serovares, de los cuales 1547 pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (Akiba et al., 2008). Desde la perspectiva clínica, estos serovares presentan claras diferencias en las infecciones causadas al huésped y su manifestación clínica (Uzzau et al., 2000).

La gravedad de los cuadros clínicos difiere entre los serovares, de acuerdo con la especificidad del huésped (Singh, 2013); por lo que serovares no adaptados como *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* manifiestan cuadros de gastroenteritis aguda en diferentes hospedadores (Stevens et al., 2009); mientras que los serovares adaptados a huéspedes como: *S. Typhi*, *S. Dublin* o *S. Gallinarum* se especializan exclusivamente en humanos, bovinos y aves, respectivamente (Barrow, 2013).

La *Salmonella* es uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial, es el causante de aproximadamente 93 millones de casos de gastroenteritis y 150,000 muertes anualmente, entre la población humana a nivel mundial (Majowicz et al., 2010). En Estados Unidos, causa aproximadamente 1 millón de casos anuales y es una de las principales causa reportada de muerte y hospitalización por ETAs (Scallan et al., 2011). Mientras en Europa, el país con mayor número de casos confirmados de

salmonelosis es Alemania con 13.293 casos en el año 2018 (OMS, 2018). En Ecuador, en el año 2018 se reportaron 1.515 casos de personas infectadas con fiebre tifoidea y paratifoidea, mientras que la tendencia de infecciones debidas a *Salmonella* no-tifoidea alcanzan una cifra de 2.647 personas (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2018).

En el país, se han reportado brotes clínicos relacionados con el serovar Infantis, el cual muestra perfiles de multirresistencia a antibióticos (Cartelle Gestal et al., 2016). El sector avícola del país también muestra una elevada prevalencia de *Salmonella*, en el cual se han detectado a los serovares Infantis, Corvallis y Enteritidis en pollos broiler en Pichincha (Vinueza-Burgos et al., 2016); y en el centro del país, los serovares Infantis, Typhimurium y serovares no tipificados en gallinas ponedoras (Salazar et al., 2019). La alta prevalencia de *Salmonella* en el sector avícola del país representa un peligro potencial para la salud pública (Sánchez-Salazar et al., 2019); así como para el sector industrial debido a que la salmonelosis clínica puede producir la muerte del animal y de manera simultánea, causar una disminución en las producciones (ganancia de peso en pollo de carne y cantidad y calidad de huevos en gallinas ponedoras) (Barrow, 2013).

### **1.1.2. Resistencia antimicrobiana**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la emergencia de la resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas para la salud pública a nivel mundial (OMS, 2014). Entre las principales causas de la aceleración del ritmo evolutivo bacteriano, está el elevado uso de antibióticos en el sector humano y animal. A nivel mundial, los animales de producción representan el principal consumidor de antibióticos (Economou & Gousia, 2015; Roca et al., 2015) y en países como Estados Unidos, donde la producción pecuaria se realiza a gran escala, la venta de antibióticos para uso veterinario es 4 veces mayor en comparación con aquellos que son empleados para humanos (Maron et al., 2013).

Los antibióticos son usados como componentes de piensos, para que estos a su vez actúen como:

- Promotores de crecimiento, favoreciendo el control de la microbiota intestinal, mejorando el aprovechamiento de los nutrientes y el incremento de peso de los animales (van den Bogaard & Stobberingh, 1999).

- Terapéuticos y profilácticos, en forma de pre mezclas (sólidas o líquidas) en altas concentraciones (WHO, 2017).

En la actualidad, no existen reportes oficiales sobre el empleo de antibióticos, su cuantificación y razones de uso en la producción avícola en nuestro país. Los pocos estudios realizados sobre la resistencia antimicrobiana, proporcionan una idea sobre como los antibióticos están siendo usados dentro de la producción avícola. En un estudio realizado en 388 granjas, se ha identificado que el 67.9% de las granjas usan enrofloxacina como medida terapéutica, también emplean tiamulina en un 10.2% como profiláctico, tilosina lo emplean en un 8.1% como profiláctico. Además a la tilmicosina la emplean en un 6.7% como profiláctico y el 56.2% como terapéutico y para finalizar usan florfenicol en un 35.9% como medida curativa y la sulfametoxazol más trimetoprim lo usan en 8.8% como medida curativa (Vinueza, 2017).

Debido al uso generalizado y desmedido de agentes antimicrobianos en la producción animal de alimentos, se ha convertido en un factor crucial en la aparición de patógenos zoonóticos resistentes como la *Salmonella* (Rincón Acero et al., 2011), la misma que se ha visto favorecida por el empleo generalizado de agentes antimicrobianos en animales de abasto, lo que ha resultado como un problema para la salud pública a nivel mundial (Rahmani et al., 2013). Un ejemplo claro de esta problemática se evidencia en diferentes estudios donde se demuestran que diferentes cepas de *Salmonella* aisladas en la industria avícola presentan resistencia a por lo menos a un agente antibacteriano, entre estos estudios se encuentran uno realizado en la Unión Europea (UE) donde se han aislado cepas de *Salmonella* resistentes al ácido nalidíxico, sulfonamidas y tetraciclinas (EFSA & ECDC, 2013). En Brasil, cepas aisladas de granjas de pollos presentaron multiresistencia a varios antibióticos, entre ellos trimetoprim/sulfametoxazol (Voss-Rech et al., 2015), mientras que en Colombia más del 96% de los aislamientos de *Salmonella* recuperados de granjas (hisopados de barrido y heces) presentaron resistencia a tetraciclinas (Donado-Godoy et al., 2012). Adicionalmente, en muestras de carcasas de pollo, carne se han hallado cepas de *Salmonella* resistentes a ácido nalidíxico y tetraciclinas (Sodagari, et al. 2015, Vinueza-Burgos, et al. 2016).

Las frecuencias y patrones de resistencia a antimicrobianos (RAM) para *Salmonella* varían en función del tiempo, la región, el serovar, la granja particular y el agente antimicrobiano. La resistencia se produce por transmisión clonal y horizontal de RAM,

además existe preocupación por la propagación de elementos genéticos móviles que albergan genes de resistencia a antibióticos emergentes (Gyles, 2008).

La resistencia a los antimicrobianos se puede realizar mediante dos vías, a las que se las denomina de la siguiente manera:

- Resistencia intrínseca, la misma que se a la mutación espontánea de material genético que le confiere alguna nueva adaptación, permitiéndole al organismo a resistir los efectos letales de los agentes antimicrobianos.
- Resistencia adquirida, los factores de resistencia en forma de plásmidos, transposones o integrones se mueven entre las bacterias mediante conjugación, transformación o transducción (Sebola & Mlambo, 2018).

La presencia de *Salmonella* multiresistente (resistencia a más de tres familias de antibióticos) en el sector avícola del país es considerable, siendo detectada en diferentes sectores productivos (broiler y ponedoras), así como en diferentes provincias del país como Pichincha, Pastaza, Napo, Tungurahua y Cotopaxi (Egas, 2018; Sánchez-Salazar et al., 2019; Vinuesa-Burgos et al., 2016). La detección frecuente de aislamientos con estos fenotipos representa una alerta desde el punto de vista sanitario, ya que codifican mecanismos de resistencia a antibióticos de interés clínico como ceftriaxona, ampicilina, cefepime, entre otros.

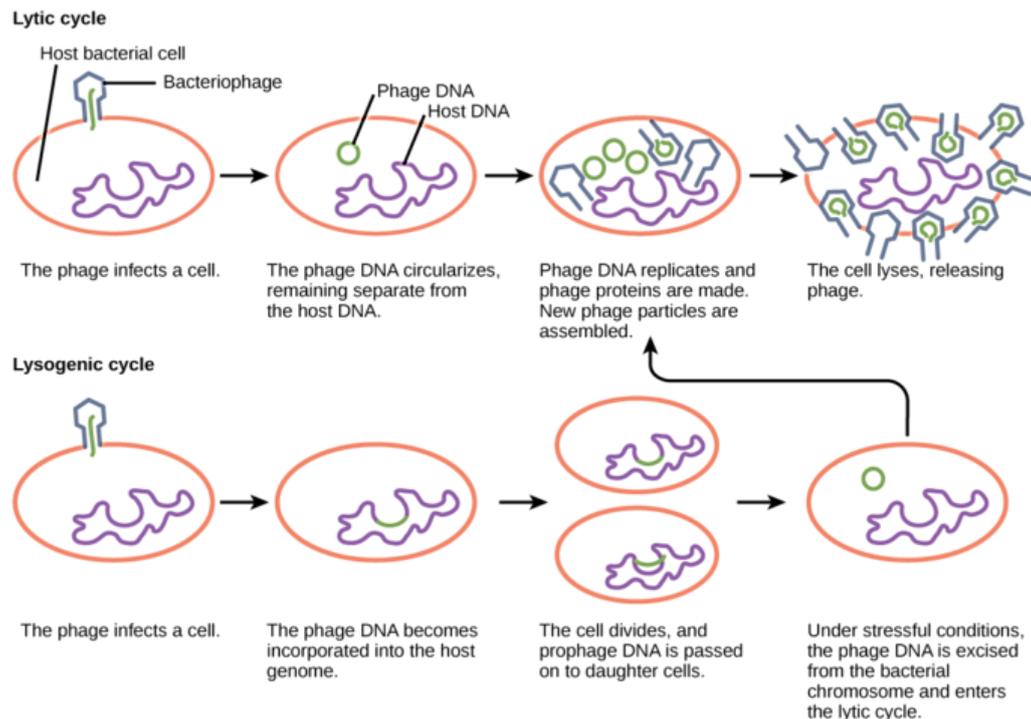
Debido a la creciente evolución de bacterias multiresistentes y con la finalidad de reducir el consumo de antibióticos, se ha retomado la investigación sobre el uso de bacteriófagos como agentes de biocontrol de patógenos; considerando su alto grado de especificidad, por lo que no alteran la microbiota natural, evitando efectos negativos en el sistema inmune (Jassim & Limoges, 2017; O'Sullivan et al., 2016; Petsong et al., 2019). En estudios de control biológico, se ha comprobado que presentan una elevada efectividad en contraste con antibióticos (Hungaro et al., 2013; Quiroz et al., 2016). Por lo que, la investigación enfocada a la prospección biológica de fagos se encuentra en auge, considerando su potencial uso como alternativa a los antibióticos.

### 1.1.3. Bacteriófagos

Los bacteriófagos son virus que infectan a las bacterias y arqueas. Representan el grupo más abundante y diverso de entidades biológicas en el planeta (Rohwer, 2003). A nivel general, cumplen roles fundamentales en el control biológico de las poblaciones bacterianas, en los ciclos biogeoquímicos y en la evolución bacteriana (Pratama & van Elsas, 2018). Se estima que alrededor del 20% del total de los genomas bacterianos han sido adquiridos por medio de bacteriófagos (Brüssow et al., 2004). El desarrollo de las tecnologías ómicas está permitiendo conocer de manera profunda sus implicaciones funcionales de manera acelerada (Keen & Dantas, 2018).

Los bacteriófagos poseen dos ciclos de vida diferenciados:

- El ciclo lítico: el fago infecta a una bacteria, la secuestra para producir virus de prole, los fagos se adsorben a receptores específicos en la superficie bacteriana (proteínas de la membrana externa, lipopolisacáridos, etc.) (Kropinski, 2009). En el caso de los virus con cola, inyectan su ADN a través de la pared celular bacteriana y una vez en la célula, el genoma del fago impide la replicación y transcripción de la bacteria, haciéndola producir ácidos nucleicos y proteínas virales, posteriormente las nuevas partículas de fago se liberan debido a la acción combinada de una proteína formadora de poros de membrana (holina) y una lisina que degrada el peptidoglicano a través de la lisis del huésped (Newton et al., 2004).
- El ciclo lisogénico: Un fago sintetiza una enzima de integración (integrasa), desactiva la transcripción viral adicional y se inserta en el ADN de la bacteria, que continúa creciendo y multiplicándose, los genes del fago se replican como parte del cromosoma bacteriano (Borie et al., 2008; Broudy & Fischetti, 2003). Una bacteria que contiene un conjunto completo de genes de fago se llama lisógeno, mientras que el ADN viral integrado se llama profago. Un lisógeno puede replicar el profago asociado de forma continua y estable; sin embargo, bajo determinadas circunstancias (estrés ambiental o inducción espontánea), el profago se activa e inicia un ciclo lítico (Kazi & Annapure, 2016; Penades et al., 2015).



**Figura N° 1:** Ciclos de vida de los bacteriófagos (Alberts, 2002)

Los fagos transductores son aquellos que pueden empaquetar el ADN del huésped. Los fagos transductores generalizados producen partículas que contienen solo ADN bacteriano, mientras que los fagos transductores especializados ocasionalmente producen partículas que contienen secuencias de ADN bacteriano y de fagos (O'Sullivan et al., 2016).

La especificidad de los fagos para un serovar o para aislamientos del mismo serovar puede diferir drásticamente, y a su vez depende de varios factores, como la capacidad del fago para adsorberse a las estructuras superficiales del huésped. Ciertos fagos muestran un alto grado de especificidad de huéspedes, mientras que otros tienen un amplio rango (Hooton et al., 2011). La interacción de los bacteriófagos con su huésped bacteriano es más o menos específica para el serovar de *Salmonella*. Los serotipos a menudo identifican estructuras superficiales del aislado de *Salmonella* que son únicas para la unión por bacteriófagos específicos (Schatten & Eisenstark, 2015).

Debido a la alta especificidad de los bacteriófagos, su uso con fines terapéuticos ha renovado interés en los últimos años, debido a la dificultad de tratar con cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Los bacteriófagos líticos son capaces de matar bacterias resistentes a los antibióticos al final del ciclo de infección por fagos y por lo tanto, el

desarrollo de la terapia con fagos es potencialmente una forma de mejorar el tratamiento de las infecciones bacterianas (Cisek et al., 2017).

A continuación, se muestran varios estudios realizados en diferentes países, donde se muestra la eficacia de los fagos frente a bacterias resistentes.

En la lista de fagos de *Salmonella*, elaborada por Hans-Wolfgang Ackermann, casi 250 virus han sido caracterizados morfológicamente, entre los virus de cola del orden *Caudovirales*: *Myoviridae* (fagos con colas contráctiles), 64; *Siphoviridae* (virus con largas colas no contráctiles), 94; y *Podoviridae* (colas cortas no contráctiles), 71 (Moreno Switt et al., 2013).

Un estudio realizado en Reino Unido evaluó el efecto de bacteriófagos (fago *S. Enteritidis* PT4), en la reducción de la concentración de *S. enterica* serovar Enteritidis en cecas de pollos de engorde. Después de cinco días, los pollos infectados con *S. Enteritidis* PT4, mostraron una reducción de 3,5 órdenes de magnitud en las UFC de *S. Enteritidis* PT4 por gramo de contenido cecal; por lo que se puede evidenciar el efecto *in vivo* de los bacteriófagos en las reducciones de *Salmonella* en huéspedes aviares (Fiorentin et al., 2005).

En otra investigación, realizada en Barcelona se aisló un bacteriófago lítico de *S. enterica* CECT 4138; en este estudio, se determinaron sus características morfológicas, determinando que este pertenece a la familia *Myoviridae*, que su cabeza mide 60 nm de diámetro, la cola no es contráctil y tiene 6 fibras, además se le denominó como MRH6 y no perdió la capacidad lítica frente a *S. enterica* CECT 4138, por lo que se le considera como un potencial agente de biocontrol (Hernández, 2019).

En un proyecto realizado en la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, se aislaron bacteriófagos con la finalidad de emplearlos como un método de biocontrol para el tratamiento de infecciones causadas por *Salmonella* enteropatógena. En este proyecto se evaluaron cuatro cócteles de bacteriófagos líticos (PSEA-2, SSEA, PSIA-2, SSIA) procedentes de aguas residuales de las industrias de procesamiento de aves de corral. Para controlar *S. Enteritidis* (SE) y *S. Infantis* (SI), bajo condiciones de laboratorio. Se encontraron que los cócteles PSEA-2 y PSIA-2 fueron específicos para *S. Enteritidis* y *S. Infantis*. Mientras que los cócteles SSEA y SSIA, también causaron lisis en

*Pseudomonas*. Las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) reveló la presencia de fagos de cola de las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae* (Quiroz et al., 2016).

En la actualidad, existen en el mercado diferentes productos basados en fagos para el control de *Salmonella*; como por ejemplo SalmoFresh (Intralytix, USA), el cual cuenta con la aprobación de la FDA para su uso directo en avicultura, piscicultura y horticultura (Zhang et al., 2019). Este producto consiste en un cóctel de seis fagos con la capacidad de lisar diferentes serovares (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport, Hadar, Kentucky, Thompson, Georgia, Agona, Grampian, Senftenberg, Alachua, Infantis, Reading, y Schwarzengrund). Otros productos comerciales formulados con fagos de *Salmonella* son Salmonex (Micros Food Safety, Países Bajos), Armament (OmniLytics, USA) y Biotector (CheilJedang Corporation, Corea del Sur) (Jurač, Nabergoj, & Podgornik, 2019; LeLièvre et al., 2019).

El aislamiento de nuevos bacteriófagos con diferentes características biológicas podría ayudar a expandir la diversidad de los recursos fágicos existentes. Cabe mencionar que las bacterias pueden adquirir resistencia a la lisis fágica (Labrie, Samson, & Moineau, 2010); y disminuir la eficacia de ciertos productos comerciales en base a fagos. Motivo por el cual, en la presente investigación planteamos la prospección preliminar de bacteriófagos líticos para diferentes serovares de *Salmonella* de interés avícola y sanitario, y evaluar si poseen actividad lítica frente a otros patógenos; a partir de muestras de origen ambiental.

## 1.2. Objetivos

### 1.2.1. General

Realizar una prospección de bacteriófagos líticos de *Salmonella* a partir de muestras ambientales de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi para evaluar su efecto en microorganismos patógenos.

### 1.2.2. Específico

- Aislar selectivamente bacteriófagos de *Salmonella* a partir de muestras ambientales de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi.
- Evaluar los perfiles líticos de los bacteriófagos frente a cepas patógenas de cinco serovares de *S. enterica* (Infantis, Enteritidis, Kentucky, Pullorum, Typhimurium); y frente a las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*.
- Evaluar la estabilidad y las cinéticas de inactivación de bacteriófagos representativos de cada clúster de lisis.

## Hipótesis

H0: No se detectaron bacteriófagos líticos de *Salmonella* en las muestras ambientales de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi, ni se pudo evaluar su efecto frente a microorganismos patógenos.

H1: Se detectaron bacteriófagos líticos de *Salmonella* en las muestras ambientales de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi, y se evaluó su efecto frente a microorganismos patógenos.

## CAPÍTULO II

### 2. Metodología

#### 2.1. Materiales

- Agar verde brillante
- Agar XLD
- Agar Nutritivo
- Medio de cultivo Mac Conkey
- Medio de cultivo MSA (Modified Scholten's Agar)
- Medio de cultivo MSB (Modified Scholten's Broth)
- Solución tampón PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Discos de antibiótico OXOID
- McFarland estándares de equivalencia de turbidez del kit Remel
- Glicerol
- Crioviales
- Cajas Petri
- Botellas Schott de 1000 mL, 500 mL y 100 mL.
- Tubos de centrifuga de 15mL y 50 mL
- Pipetas
- Pera de succión
- Micropipetas
- Balanza
- Tubos de ensayo con tapa de 10 mL y 20 mL.
- Microtubos de 1,5 mL
- Frascos plásticos estériles para recolección de muestras
- Filtros PES de 0.22  $\mu\text{m}$
- Jeringuillas de 5 y 10 mL
- Asas de plástico
- Plancha de calentamiento
- Centrifuga

- Balanza
- Termostato
- Incubadora
- Refrigeradora
- Espectrofotómetro UV-Visible

## **2.2.Métodos**

### **2.2.1. Trabajo de campo**

#### **2.2.1.1.Recolección de las muestras**

Los puntos de muestreo se determinaron mediante un previo análisis como complemento del Proyecto de investigación: “Evaluación de la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos emergentes en aguas de riego y superficiales en el Ecuador, años 2018-2019”. Resolución: 0192-CU-P-2018. La recolección de muestras y el aislamiento de bacteriófagos están contemplados dentro del Contrato Modificatorio al Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica denominado "Recursos Agrobiológicos y Agricultura Sustentable" celebrado entre el Ministerio del Ambiente a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural y la Universidad Técnica de Ambato (Resolución HCU 1359-CU-P-2019).

**Tabla N°1:** Detalle de los puntos de muestreo

<b>N°</b>	<b>Muestra</b>	<b>Localidad</b>	<b>Cantón - Provincia</b>
1	Agua	Río Cutuchi (El Camal)	Salcedo – Latacunga
2	Agua	Canal de riego (San Andrés de Pilalo)	Salcedo – Latacunga
3	Agua	Canal de riego río Cutuchi (La Gloria)	Salcedo – Latacunga
4	Agua	Laguna de Yambo	Salcedo – Latacunga
5	Agua	Canal de riego (San Pedro de Pishilata)	Ambato – Tungurahua
6	Agua	Canal de riego (Picaihua centro)	Ambato – Tungurahua
7	Agua	Río Pachanlica (Mollepamba, Picaihua)	Ambato – Tungurahua
8	Agua	Canal de riego (San Juan Picaihua)	Ambato – Tungurahua
9	Agua	Río Ambato (Manantiales)	Ambato – Tungurahua
10	Agua	Canal de riego (Puerto Arturo)	Ambato – Tungurahua
11	Agua	Río Ambato (Las Viñas)	Ambato – Tungurahua
12	Agua	Río Ambato (Parque Luis A. Martínez)	Ambato – Tungurahua
13	Agua	Canal de riego (Parque Provincial de la Familia)	Ambato – Tungurahua
14	Agua	Canal de riego (Ficoa)	Ambato – Tungurahua
15	Agua	Río Pachanlica (Centro de Salud de Totoras)	Ambato – Tungurahua
16	Agua	Río Pachanlica (El Rosario)	Ambato – Tungurahua
17	Agua	Asequia Lalama (Mercado Mayorista)	Ambato – Tungurahua
18	Agua	Canal de riego (Vía Patate Pelileo)	Patate – Tungurahua
19	Agua	Canal de riego (Salasaca centro)	Pelileo – Tungurahua
20	Agua	Canal de Riego (El Tambo)	Pelileo – Tungurahua
21	Agua	Canal de Riego (Huambaló Centro)	Pelileo – Tungurahua
22	Agua	Río Culapachán (Vía Pillaro)	Píllaro – Tungurahua
23	Agua	Cascada Jun Jun (Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca)	Cevallos – Tungurahua
24	Agua	Canal de riego (Universidad Técnica de Ambato, Campus Querochaca, vía a San Pedro)	Cevallos – Tungurahua
25	Agua	Río Bascún (El Salado)	Baños – Tungurahua
26	Agua	Cascada Cabellera de la Virgen	Baños – Tungurahua
27	Agua	Río Pastaza (Parque de la Familia de Baños)	Baños – Tungurahua

La recolección de las muestras de agua se las realizó en frascos plásticos estériles, en cada uno se tomó un volumen aproximado de 100 ml para cada punto de muestreo; posteriormente se procedió a etiquetar las muestras. Como información adicional se registró la ubicación geográfica mediante GPS del punto de muestreo y luego se procedió a transportar las muestras al laboratorio a una temperatura de entre  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en un período de tiempo no superior a 24 horas desde la toma de muestra hasta el procesamiento de las mismas y finalmente se realizó el aislamiento de los bacteriófagos de *Salmonella*.

## **2.3.Trabajo de laboratorio**

### **2.3.1. Aislamiento y purificación de bacteriófagos de *Salmonella***

El aislamiento de bacteriófagos se basó en una adaptación de la norma ISO 10705-2:200 de calidad del agua, para la detección y enumeración de colifagos. El primer paso fue realizar una siembra de los 5 serovares de *S. enterica* (Infantis, Enteritidis, Kentucky, Pullorum, Typhimurium) en agar Mac Conkey, con la finalidad de aislar selectivamente a la bacteria de interés. Al día siguiente, se generó biomasa de estos serovares; para lo cual se tomó unas pocas colonias y se las colocaron en un tubo con tapa que contenía 10 mL de caldo modificado de Scholten (MSB, del inglés Modified Scholten's Broth) posteriormente se lo llevó a incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 2 horas o hasta llegar a una escala de 0,5 McFarland según los estándares de equivalencia de turbidez del kit Remel.

El siguiente paso fue fundir el agar modificado de Scholten semisólido (MSAs, del inglés Modified Scholten's Agar), una vez fundido se le agregó  $\text{CaCl}_2$  (50 g/L) y se procedió a dispensar 2,5 mL de este en tubos de ensayo con tapa, se los dejó reposar en el termostato a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  para evitar que se solidifiquen. Posteriormente se procedió a procesar la muestra líquida, para lo cual se tomó un pequeño volumen de esta con una jeringa y luego se la filtró por una membrana de filtración PES de  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  de baja adsorción proteica, el volumen de este filtrado fue de aproximadamente 3 mL por cada muestra.

Finalmente, se realizó la siembra en placa, para lo cual se colocó 1 mL del filtrado y 1 mL de la biomasa generada en uno de los tubos de ensayo con tapa que contenía 2,5 mL de MSAs, se agitó ligeramente y se vertió sobre una placa de agar modificado de Scholten

(MSA), del inglés Modified Scholten's Agar, posteriormente se las dejó incubar durante 24 horas a 37 °C.

Al día siguiente, se observaron las calvas de lisis bacteriana y se las clasificó según su morfología, para iniciar con el proceso de purificación de los bacteriófagos se procedió a tomar las calvas similares con un asa estéril, se las colocó en un microtubo con 1mL de MSB, después se los llevó a centrifugar a 4500 rpm por 5 min, posteriormente se tomó el sobrenadante con una jeringa y se filtró por una membrana de filtración de 0.22 µm.

Para la siembra en placa, se procedió a realizar el mismo procedimiento de siembra que se efectuó con la muestra de agua. Este proceso se repitió al menos 4 veces, con la finalidad de obtener fagos purificados que presenten la misma morfología de sus calvas de lisis dentro de la misma placa.

### **2.3.2. Conservación de bacteriófagos de *Salmonella***

Una vez obtenidos los bacteriófagos purificados, es decir que se encontraron una misma morfología de las calvas de lisis en una misma placa, se procedió a transferir los fagos con un asa estéril y colocarlos en un microtubo con 1 mL de MSB; luego se los llevó a centrifugar a 4500 rpm por 5 min, posteriormente se absorbió el sobrenadante con una jeringa y se filtró por una membrana de filtración de 0.22 µm.

Para conservarlos se colocó 1 mL de este en un tubo de ensayo con tapa que contenía 10 mL de MSB con el huésped *Salmonella*, que fue previamente incubado hasta llegar a una escala de turbidez de 0,5 McFarland, luego se llevó a incubar los tubos a 37 °C durante 24 - 48 horas, con la finalidad de obtener un título alto de fagos. Transcurrido el tiempo, se procedió a filtrar el contenido de los tubos por una membrana de filtración de 0.22 µm, se los preservó en crioviales con el 15% de glicerol estéril y se los llevó a congelación.

### **2.3.3. Determinación de los perfiles de lisis de los bacteriófagos de *Salmonella***

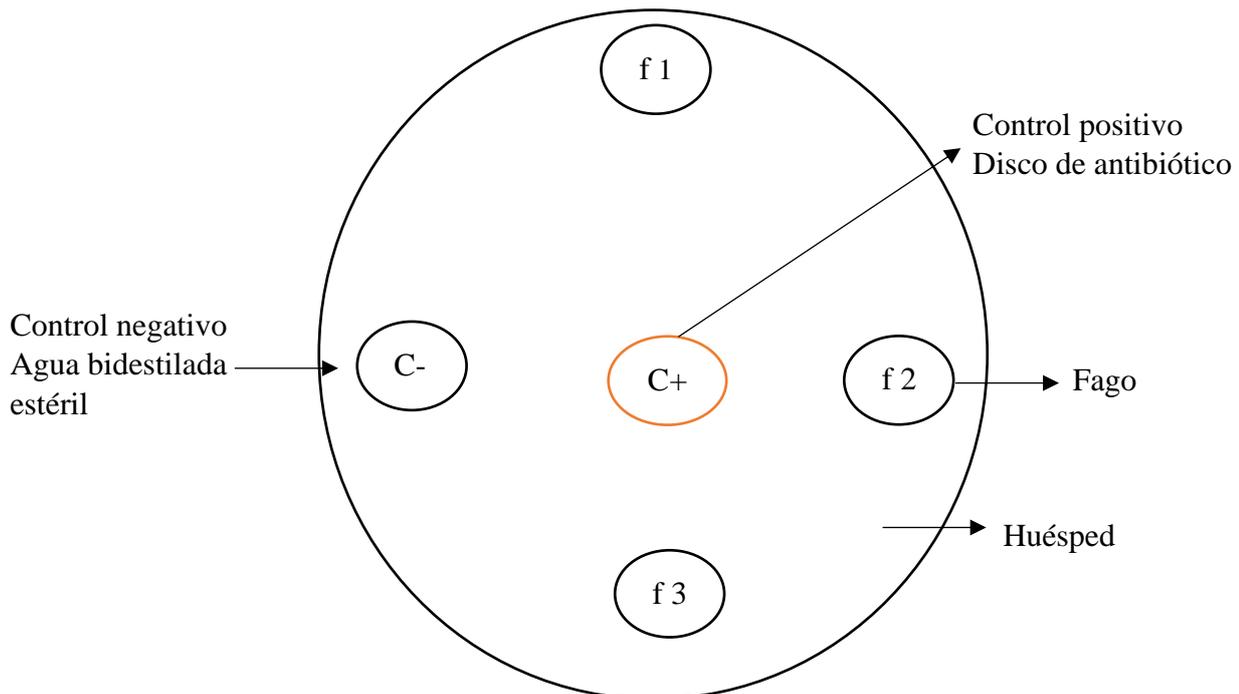
El primer paso fue realizar una siembra por estría compuesta del huésped en agar Mac Conkey en caso de bacterias entéricas, mientras que para el resto de bacterias se aisló en agar nutritivo. Posteriormente se procedió a generar biomasa del mismo, para lo cual se tomó unas pocas colonias y se las colocó en un tubo de ensayo con tapa que contenía 10

mL de MSB, después se lo llevó a incubar a 37 °C hasta llegar a una escala de 0,5 McFarland.

Como siguiente paso, se procedió a activar el fago criopreservado, para lo cual se colocó 500 µL del fago criopreservado en un tubo que contenía 10 mL de la biomasa del huésped a 0,5 McFarland, luego se lo llevó a incubar overnight y al siguiente día se procedió a filtrar por una membrana de filtración de 0.22 µm, con la finalidad de retener la bacteria en el filtro y que únicamente atraviesen los fagos.

Para realizar la prueba de la gota, se procedió a fundir el MSAs y una vez líquido se le agregó CaCl<sub>2</sub>, el mismo que se encuentra en una concentración de 50 g/L, se homogenizó y luego se dispensó un volumen de 2,5 mL en tubos de ensayo con tapa, se los dejó reposar en el termostato a 55 °C, luego se coloca 1 mL de la biomasa del huésped (cinco serovares de *S. enterica* Infantis, Enteritidis, Kentucky, Pullorum, Typhimurium y otras bacterias patógenas como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*), se agitó lentamente y se vertió sobre una placa de MSA, se esperó hasta que se solidifiquen y se dividió la placa en cuadrantes. En el centro de la placa se colocó el disco de antibiótico (control positivo) el mismo que fue Amikacina 30 mg/mL (AK30) con una pinza estéril, para el control negativo se colocó en uno de los cuadrantes 10 µL de agua bidestilada estéril, en los cuadrantes faltantes se colocó el mismo volumen de los fagos, se dejó secar por aproximadamente 30 minutos y luego se los llevó a incubar 37 °C overnight.

Al día siguiente se midieron los diámetros de los halos de inhibición, este ensayo se lo realizó por triplicado.



**Figura N° 2:** Test de la gota  
**Elaborado por:** Sailema Vanessa

### 2.3.4. Cinéticas de inactivación de los bacteriófagos de *Salmonella*

Para iniciar con la cinética de inactivación, en primera instancia se procedió a realizar una siembra por estría compuesta del huésped en agar Mac Conkey, luego se procedió a generar biomasa, para lo cual se tomó unas pocas colonias y se las colocó en dos tubos para centrífuga de 15 mL cada uno contenía 14 mL de MSB, después se lo llevó a incubar overnight a 37 °C. Simultáneamente se activó el fago criopreservado, para lo cual se procedió de la siguiente manera, primero se colocó 500 µL del fago criopreservado en un tubo que contenía 10 mL de la biomasa del huésped a 0,5 McFarland, luego se lo llevó a incubar durante dos días, transcurrido este tiempo se filtró por una membrana de filtración de 0.22 µm.

Antes de iniciar con el estudio, se procedió a estimar los UFC (Unidades formadoras de colonias), para lo cual se realizó una siembra por difusión, la misma que consistió en colocar 50 µL del cultivo overnight en una placa de agar nutritivo y luego se esparció homogéneamente por toda la superficie de la placa con una asa estéril, se dejó incubar a 37 °C, al siguiente día se contaron las colonias y se realizó el cálculo respectivo.

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{volumen de la muestras sembrada}}$$

Otro de los cálculos a realizar fue la estimación de la concentración de los fagos, es decir se determinó el PFU (Unidad de formación de placa), para lo cual se procedió a filtrar por una membrana de filtración de 0.22  $\mu\text{m}$  el fago activado, posteriormente se procedió a fundir el MSAs y una vez líquido se le agregó  $\text{CaCl}_2$ , el mismo que se encuentra en una concentración de 50 g/L, se homogenizó y luego se dispensó un volumen de 2,5 mL en tubos de ensayo con tapa, se los dejó reposar en el termostato a 55 °C, luego se coloca 1 mL de la biomasa del huésped (cinco serovares de *S. enterica* Infantis, Enteritidis, Kentucky, Pullorum, Typhimurium) y 1 mL del fago filtrado, se agitó lentamente, se vertió sobre una placa de MSA y se dejó incubar a 37 °C. Al siguiente día, se contaron las calvas de lisis y se realizó el cálculo respectivo.

$$PFU/mL = \frac{\text{Número de calvas de lisis} * \text{Factor de dilución}}{\text{volumen de la muestras sembrada}}$$

Una vez determinados estos dos valores se procedió a determinar el volumen de fago a colocarse en cada uno de los tubos, se trabajó con 10 MOI (multiplicidad de infección).

$$V_{\text{fago}} = \frac{(\text{UFC} * 10) * \text{Volumen final}}{\text{PFU}}$$

Posteriormente se procedió a iniciar con la prueba de cinética de inactivación para lo cual se colocó el volumen del fago requerido a cada uno de los tubos de centrífuga y se llevó a incubar a 37 °C en agitación contante. Posteriormente se procedió a tomar dos muestras a la 1, 3,6, 24, 36 y 48 horas de incubación, con la primera muestra se midió la absorbancia a 620nm en el espectrofotómetro, mientras que con la segunda muestra se procedió a realizar diluciones para realizar la siembra de la misma manera como se procedió para determinar los UFC/mL en el caso de la bacteria, mientras que para el conteo de fagos se procedió a realizar el mismo procedimiento que se empleó para la determinación de PFU/mL.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis y discusión de los resultados

##### 3.1.1. Aislamiento de bacteriófagos

Una vez realizados los muestreos correspondientes, se lograron aislar 26 bacteriófagos de los serovares Infantis, Enteritidis, Pullorum y Typhimurium como se muestra en la **Tabla N°2**.

Pero es importante mencionar que inicialmente se aislaron 29 bacteriófagos a los cuáles se les asignó un nombre, pero al momento de reactivarlos para realizar el test de la gota los fagos f UTA 01, f UTA 04 y el f UTA 06 ya habían perdido su actividad lítica, por lo que no continuaron en las siguientes etapas de los ensayos y por lo cual se decidió no mencionarlos en la **Tabla N°2**.

**Tabla N°2:** Bacteriófagos según el punto de muestreo y el huésped

Bacteriófago	Provincia	Ciudad	Sector	Huésped
f UTA 02	Tungurahua	Ambato	Río Ambato (Pishilata)	S. Infantis
f UTA 03	Tungurahua	Ambato	Río Ambato (Pishilata)	S. Infantis
f UTA 05	Tungurahua	Ambato	Canal de riego (Puerto Arturo)	S. Infantis
f UTA 07	Tungurahua	Ambato	Pishilata	S. Infantis
f UTA 08	Tungurahua	Ambato	Pishilata	S. Infantis
f UTA 09	Tungurahua	Ambato	Pishilata	S. Infantis
f UTA 10	Tungurahua	Patate	Canal de riego (vía Patate Pelileo)	S. Infantis
f UTA 11	Tungurahua	Ambato	Río Ambato Pishilata	S. Pullorum
f UTA 12	Tungurahua	Ambato	Río Ambato Pishilata	S. Pullorum
f UTA 13	Tungurahua	Ambato	Colector de aguas residuales (Pishilata)	S. Pullorum
f UTA 14	Tungurahua	Ambato	Colector de aguas residuales (Pishilata)	S. Pullorum
f UTA 15	Tungurahua	Ambato	Colector de aguas residuales (Pishilata)	S. Pullorum
f UTA 16	Tungurahua	Ambato	Canal de riego (Puerto Arturo)	S. Pullorum
f UTA 17	Cotopaxi	Salcedo	Río Cutuchi (El Camal)	S. Pullorum

Bacteriófago	Provincia	Ciudad	Sector	Huésped
f UTA 18	Cotopaxi	Salcedo	Canal de riego río Cutuchi (La Gloria)	<i>S. Pullorum</i>
f UTA 19	Cotopaxi	Salcedo	Canal de riego río Cutuchi (La Gloria)	<i>S. Enteritidis</i>
f UTA 20	Cotopaxi	Salcedo	Canal de riego río Cutuchi (La Gloria)	<i>S. Enteritidis</i>
f UTA 21	Tungurahua	Ambato	Río Ambato (Pishilata)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 22	Tungurahua	Ambato	Río Ambato (Pishilata)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 23	Tungurahua	Ambato	Colector de aguas residuales (Pishilata)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 24	Tungurahua	Ambato	Colector de aguas residuales (Pishilata)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 25	Tungurahua	Ambato	Canal de riego (Puerto Arturo)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 26	Cotopaxi	Salcedo	Río Cutuchi (El Camal)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 27	Cotopaxi	Salcedo	Río Cutuchi (El Camal)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 28	Cotopaxi	Salcedo	Canal de riego río Cutuchi (La Gloria)	<i>S. Typhimurium</i>
f UTA 29	Cotopaxi	Salcedo	Canal de riego río Cutuchi (La Gloria)	<i>S. Typhimurium</i>

### 3.1.2. Perfiles de lisis

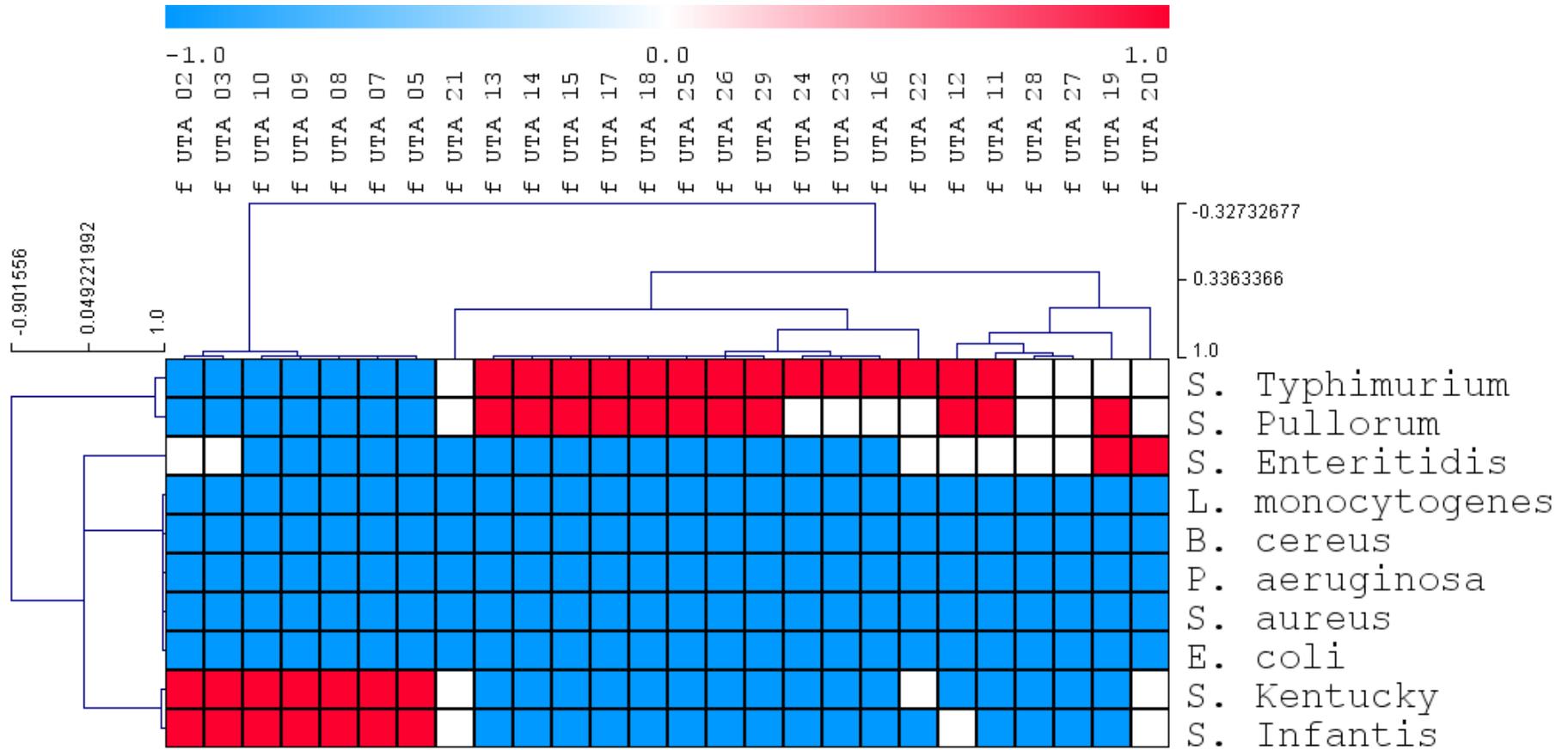
Se evaluaron los perfiles de lisis de los 26 bacteriófagos aislados y purificados frente a cepas patógenas de cinco serovares de *S. enterica* (Infantis, Enteritidis, Kentucky, Pullorum, Typhimurium), *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* y *L. monocytogenes*, por medio del test de la gota. Se observaron diferentes tipos de lisis, completa (sin halos confluentes, 1), intermedia (con presencia de halos, 0) y ausencia de lisis (-1). Como control positivo se utilizaron discos de Amikacina 30 mg/mL (AK30). Se observó que los bacteriófagos tienen especificidad para el género *Salmonella* y no actúan sobre el resto de bacterias en estudio. También se puede observar en la **Tabla N°3**, que los bacteriófagos presentan menores diámetros de inhibición en relación al antibiótico de Amikacina 30 mg/mL (AK30); excepto en los serovares Pullorum y Typhimurium, donde los fagos mostraron una lisis similar al diámetro de inhibición del antibiótico. A nivel general, se encontraron perfiles de lisis diferentes para todos los bacteriófagos, en función de los serovares evaluados de *Salmonella*.

**Tabla N°3:** Datos promedio de la prueba de la gota

Huésped		S. Infantis	S. Enteritidis	S. Kentucky	S. Pullorum	S. Typhimurium	E. coli	S. aureus	P. aeruginosa	B. cereus	L.monocytogenes
	Diámetro del halo de inhibición (mm)										
Bacteriófago	Control	12	13	17	15	15	17	18	19	18	20
	f UTA 02	9	6	10	0	0	0	0	0	0	0
	f UTA 03	10	7	9	0	0	0	0	0	0	0
	f UTA 05	8	0	8	0	0	0	0	0	0	0
	f UTA 07	10	0	9	0	0	0	0	0	0	0
	f UTA 08	8	0	10	0	0	0	0	0	0	0
	f UTA 09	9	0	9	0	0	0	0	0	0	0
	f UTA 10	8	0	9	0	0	0	0	0	0	0
	f UTA 11	0	7	0	14	17	0	0	0	0	0
	f UTA 12	8	8	0	16	18	0	0	0	0	0
	f UTA 13	0	0	0	16	18	0	0	0	0	0
	f UTA 14	0	0	0	14	16	0	0	0	0	0
	f UTA 15	0	0	0	16	16	0	0	0	0	0
	f UTA 16	0	0	0	18	17	0	0	0	0	0
	f UTA 17	0	0	0	18	17	0	0	0	0	0
	f UTA 18	0	0	0	15	12	0	0	0	0	0
	f UTA 19	0	7	0	8	9	0	0	0	0	0
	f UTA 20	8	7	7	10	9	0	0	0	0	0
	f UTA 21	8	0	7	10	9	0	0	0	0	0
	f UTA 22	0	7	5	8	10	0	0	0	0	0
	f UTA 23	0	0	0	13	14	0	0	0	0	0
	f UTA 24	0	0	0	14	12	0	0	0	0	0
	f UTA 25	0	0	0	15	13	0	0	0	0	0
	f UTA 26	0	0	0	18	16	0	0	0	0	0
	f UTA 27	0	6	0	16	15	0	0	0	0	0
	f UTA 28	0	7	0	15	16	0	0	0	0	0
	f UTA 29	0	0	0	17	14	0	0	0	0	0

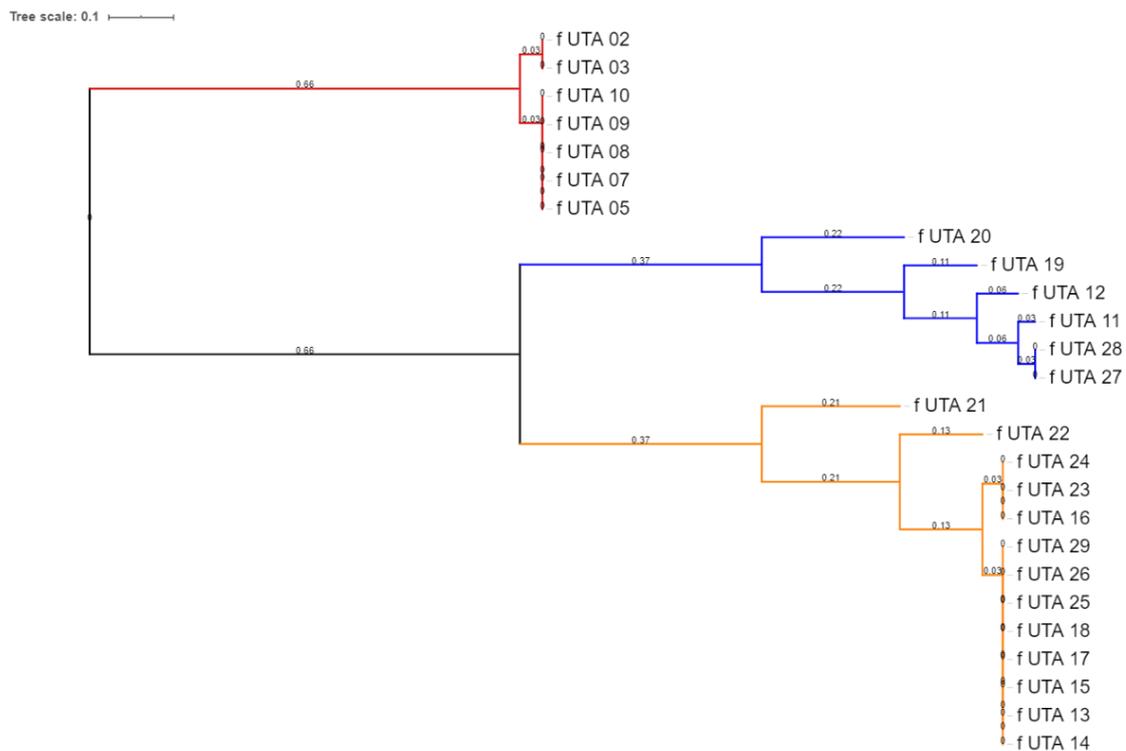
Se realizó un análisis de tipo mapa de calor para evaluar la similitud entre perfiles de lisis, por medio de un *clustering* jerárquico, considerando como métrica de distancias a la Correlación de Pearson, utilizando un método de selección de enlaces completo y una línea base (threshold) de 0.7. Para la elaboración del dendograma, se consideró como variables a las calvas de lisis observadas para cada fago: Rojo=lisis completa, blanco=lisis intermedia, azul= ausencia de lisis. Este análisis se ejecutó en el programa MultiExperiment Viewer versión 2.2.

**Figura N° 3:** Mapa de calor de los perfiles de lisis de los bacteriófagos



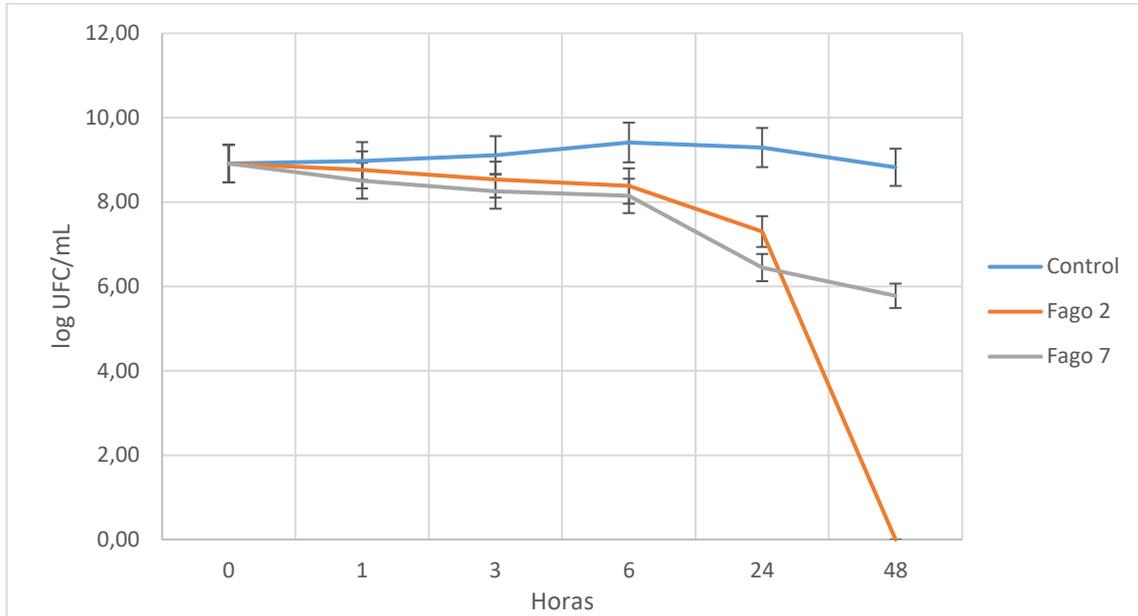
Considerando un *threshold* de 0.7, los fagos se clasifican dentro de dos grandes clústeres: el primero (A), que agrupa a fagos con capacidad lítica frente a *S. Infantis* y Kentucky; y el segundo (B), con fagos líticos a *S. Enteritidis*, Pullorum y Typhimurium. Con la finalidad de visualizar de forma detallada los clústeres de fagos de acuerdo a su perfil lítico, se procedió a analizar el dendograma por medio del software iTOL (Letunic & Bork, 2019); en donde se pueden distinguir a los dos clústeres mencionados. Se aprecia que el clúster B posee dos ramas definidas. Tal como se puede apreciar en el Clúster A que se encuentra de color rojo, en el cual se encuentran agrupados los bacteriófagos f UTA 02, f UTA 03, f UTA 10, f UTA 09, f UTA 08, f UTA 07 y f UTA 05 muestran un perfil resistente para los serovares Kentucky e Infantis; mientras que el Clúster B1, de color azul en el que se encuentran los bacteriófagos f UTA 20, f UTA 19, f UTA 12, f UTA 11, f UTA 28 y f UTA 27 muestran un perfil de lisis resistentes e intermedios para los serovares Typhimurium, Enteritidis, Pullorum y finalmente el Clúster B2 de color naranja en el que se encuentran los bacteriófagos restantes presentan un perfil de lisis únicamente para los serovares Typhimurium y Pullorum. Con la finalidad de analizar la cinética de lisis de los fagos de cada clúster, se seleccionaron de manera aleatoria 2 fagos del clúster A, 3 fagos del clúster B1 y 2 fagos del clúster B2.

**Figura N° 4:** Dendograma de perfiles de lisis de los bacteriófagos



### 3.1.1. Bacteriófagos

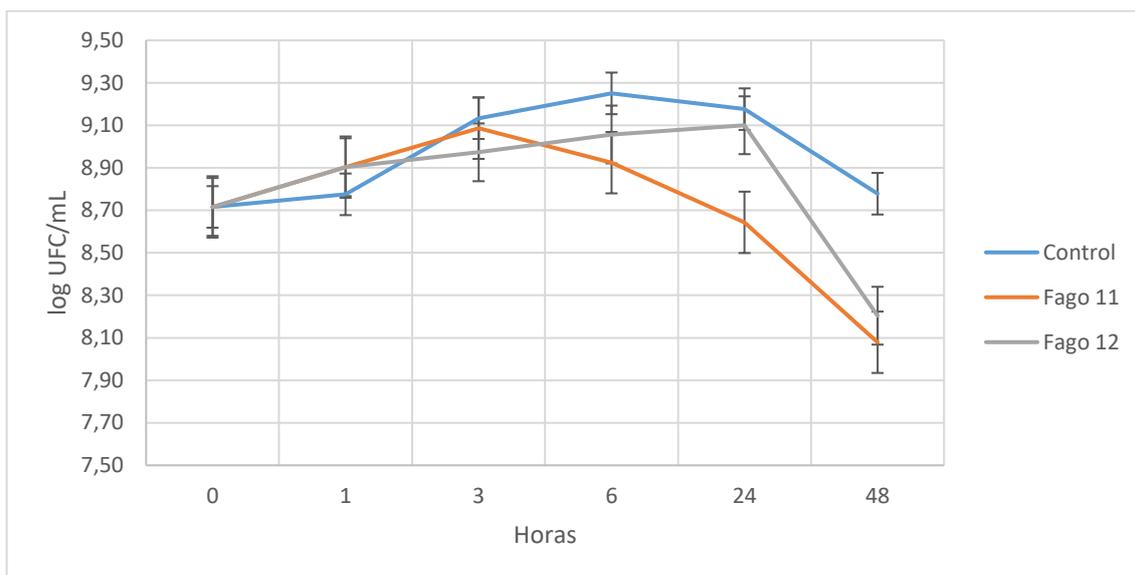
**Figura N° 5:** Cinética de lisis por fagos de *S. Infantis*



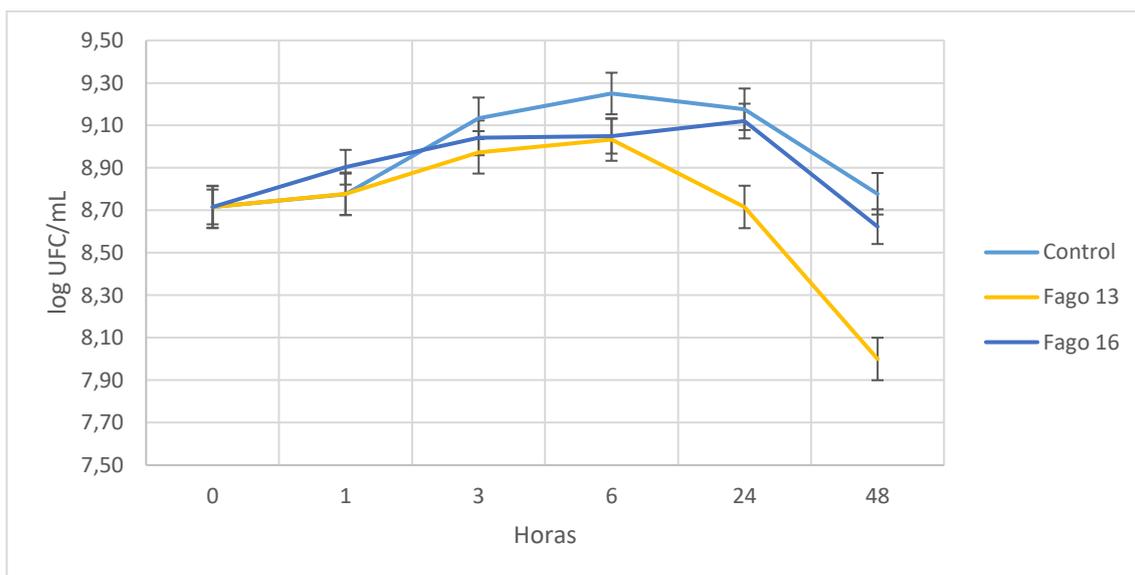
El efecto de la adición de f UTA 02 y f UTA 07 sobre *S. Infantis* fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar.

De acuerdo a la prueba de medias de Tukey, se detectó que los dos fagos se clasifican en grupos diferentes; siendo f UTA 02 el que presentó el valor más alto de lisis bacteriana, presentando una inactivación de 9 log UFC/mL en 48 horas. El fago f UTA 07 también mostró diferencia estadística significativa, sin embargo aún presentaba poblaciones bacterianas viables después de 48 horas, mostrando una inactivación de aproximadamente 3 log UFC/mL en 48 horas.

**Figura N° 6:** Cinética fagos de *S. Pullorum* (11 y 12).



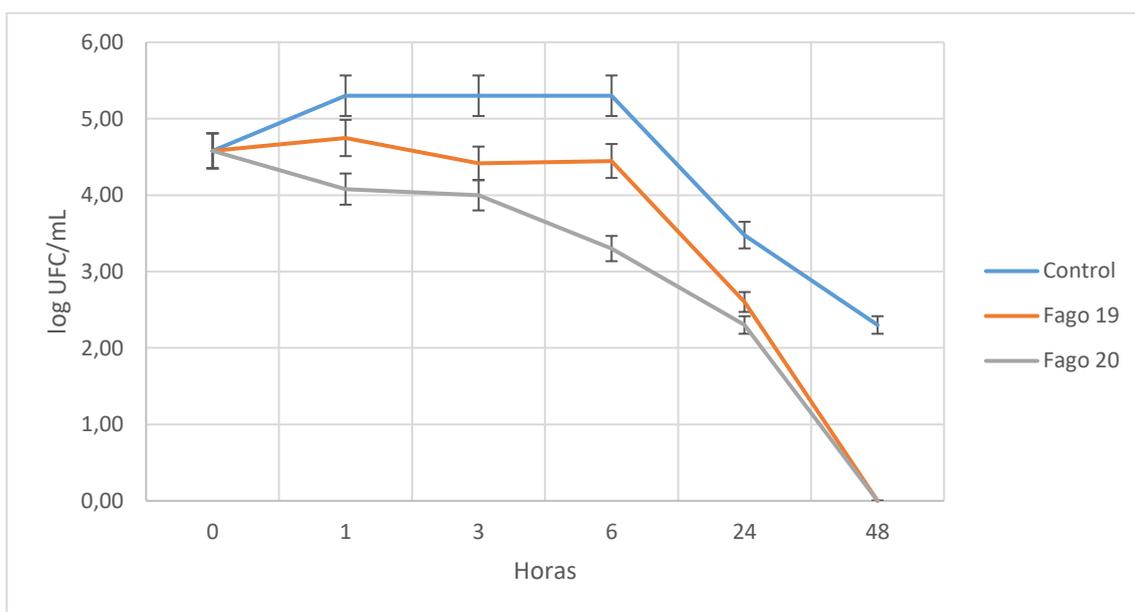
**Figura N° 7:** Cinética fagos de *S. Pullorum* (13 y 16).



El efecto de la adición de f UTA 11, f UTA 12, f UTA 13 y f UTA 16 sobre *S. Pullorum* fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en la reducción de las densidades bacterianas, desde el punto de vista estadístico. Sin embargo, a nivel general se observa que el efecto lítico de estos fagos es variable. De acuerdo a la prueba de medias de Tukey, se detectó que los fagos se clasifican en cuatro grupos diferentes; siendo f UTA 12 el que presentó el valor más alto de lisis bacteriana, seguido de f UTA 11, f UTA 13, debido a que a pesar de mostrar diferencia significativa aun presentaban poblaciones bacterianas viables después de 48 horas, mientras que f UTA 16 la disminución fue muy similar a la que se observó en el control.

Como se observa en la **Figura N° 5** el fago f UTA 11 mostró una reducción de 0,7 log UFC/mL, por otro lado el fago f UTA 12 registró un mayor reducción de 2 log UFC/mL, mientras que en la **Figura N° 6** se observan que el fago f UTA 13 mostró una reducción de 1 log UFC/mL, por otro lado el fago f UTA 12 registró una baja reducción de aproximadamente 0,5 log UFC/mL,

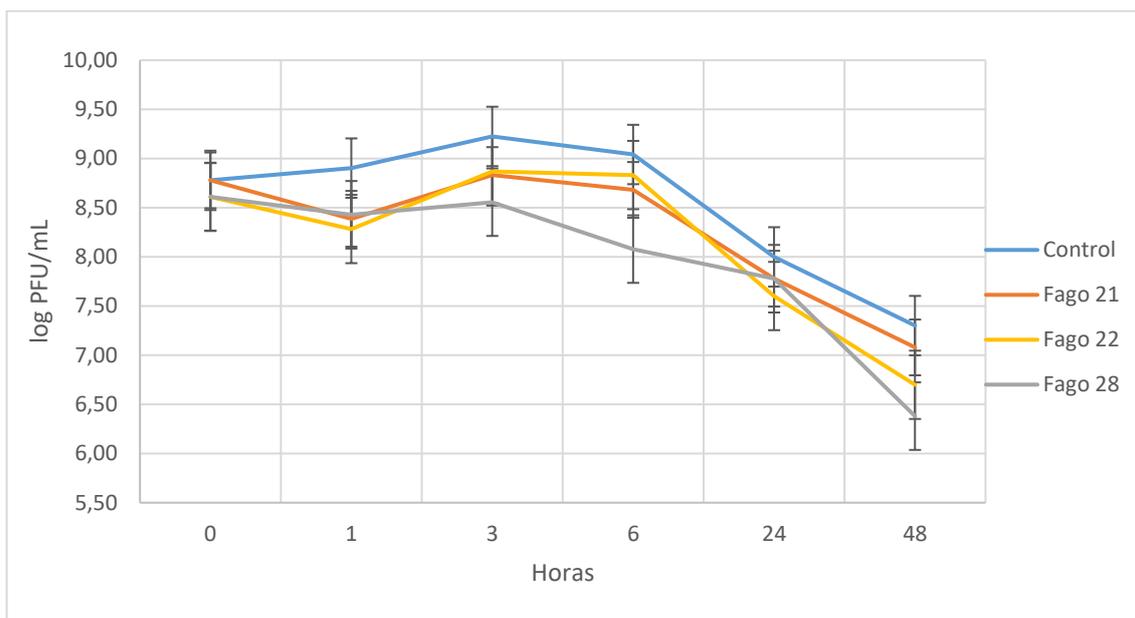
**Figura N° 8:** Cinética fagos de *S. Enteritidis*



El efecto de la adición de f UTA 19 y f UTA 20 sobre *S. Enteritidis* fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar.

De acuerdo a la prueba de medias de Tukey se encontró que los dos fagos se clasifican en el mismo grupo, por lo que se comportan de la misma manera; tanto f UTA 19 y f UTA 20 mostraron diferencia estadística y después de 48 horas no presentaron poblaciones bacterianas viables, mostrando una inactivación de aproximadamente 4,5 log UFC/mL en 48 horas.

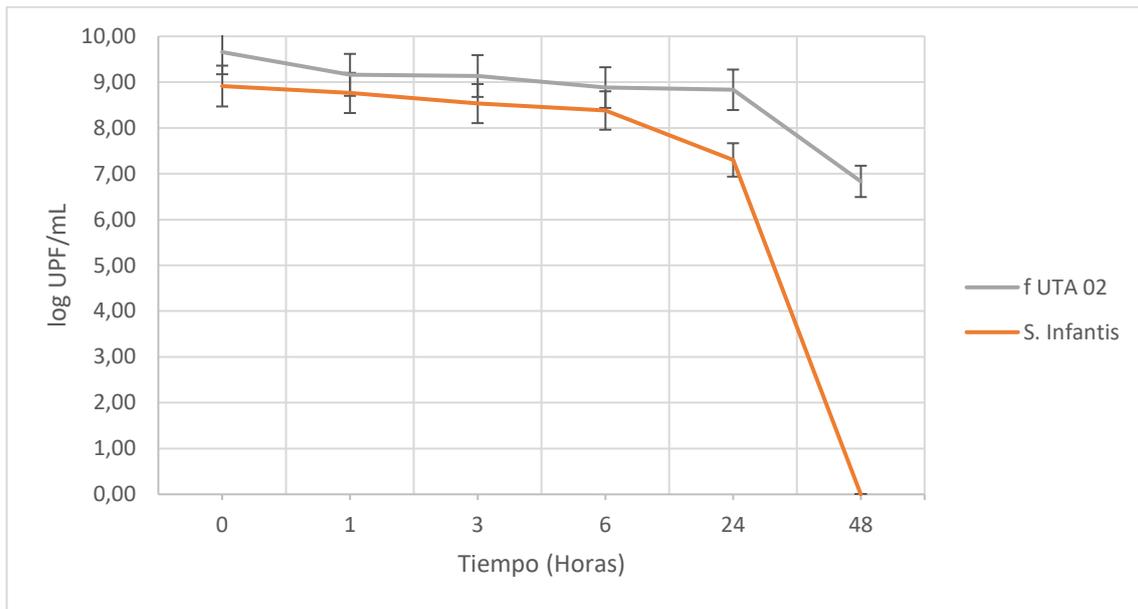
**Figura N° 9:** Cinética fagos de *S. Typhimurium*



El efecto de la adición de f UTA 21, f UTA 22 y f UTA 28 sobre *S. Typhimurium* fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar.

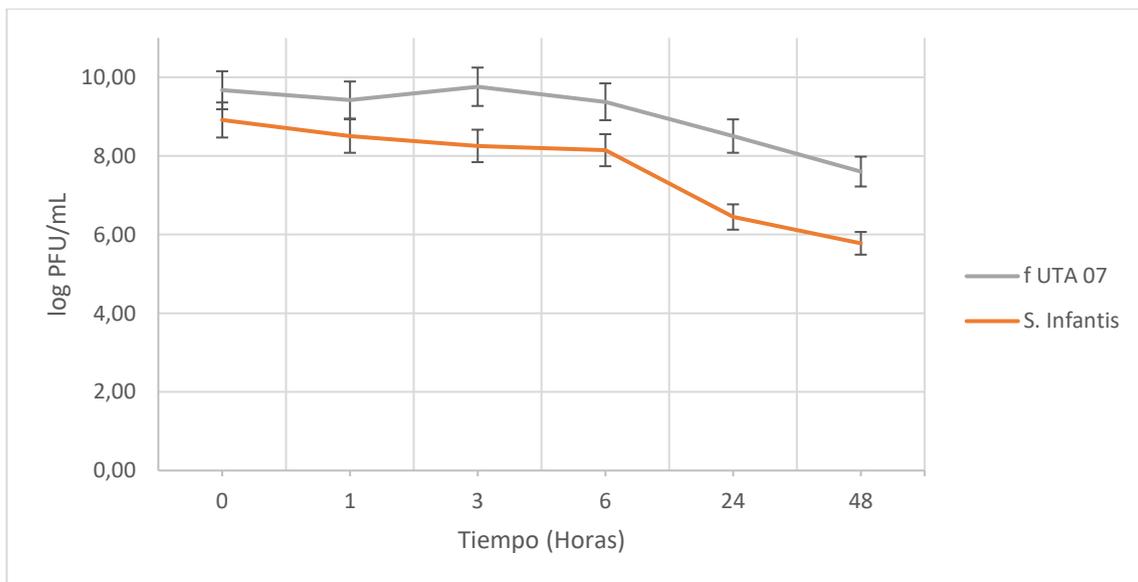
De acuerdo a la prueba de medias de Tukey, se detectó que los tres fagos se clasifican en dos grupos; siendo f UTA 28 el que presentó el valor más alto de lisis bacteriana, mostrando una inactivación de 1 log UFC/mL en 48 horas, mientras que f UTA 21, f UTA 22 no mostraron diferencia significativa con relación al control ubicándose en un grupo intermedio, además aun presentaban poblaciones bacterianas viables después de 48 horas, mostrando una inactivación de aproximadamente 0,5 log UFC/mL.

**Figura N° 10:** Cinética de inactivación de f UTA 02



De acuerdo a la prueba T de Student, se detectó que el efecto de la adición de f UTA 02 sobre *S. Infantis* generó una diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar ya que la diferencia de crecimiento fue de 7 log PFU/mL en 48 horas.

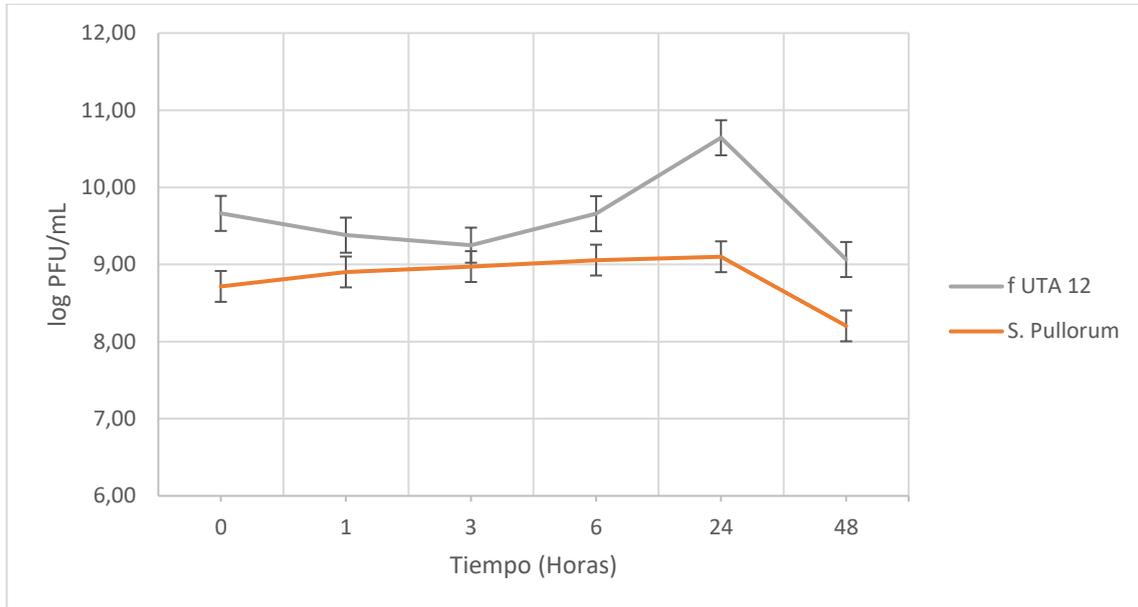
**Figura N° 11:** Cinética de inactivación de f UTA 07



De acuerdo a la prueba T de Student, se detectó que el efecto de la adición de f UTA 07 sobre *S. Infantis* generó una diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades

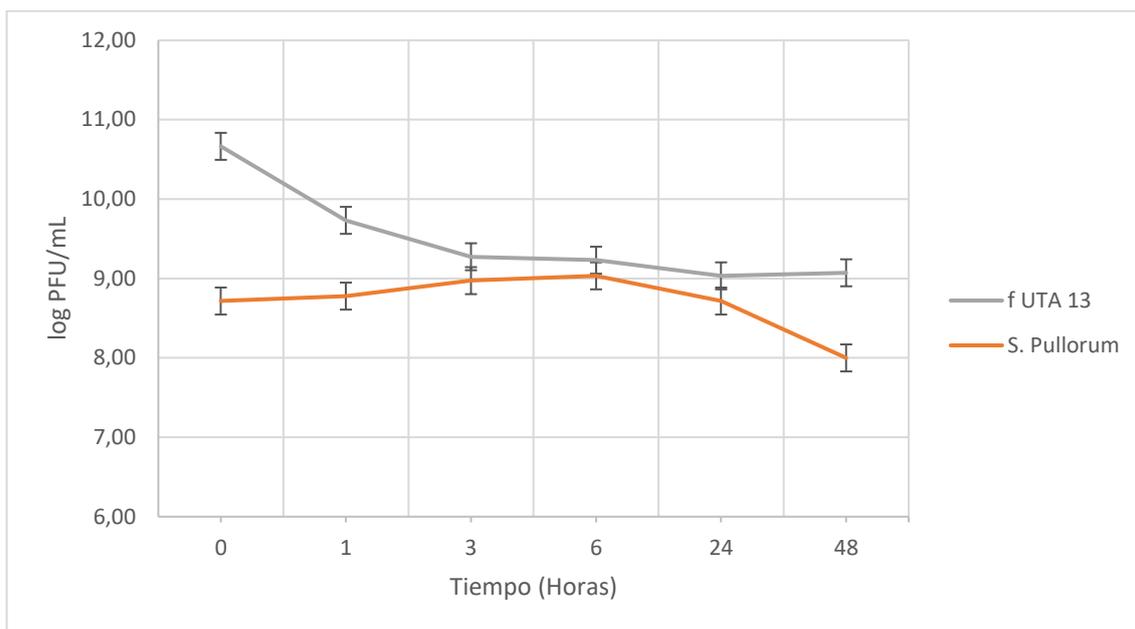
bacterianas de este serovar ya que la diferencia de crecimiento fue de 2 log PFU/mL en 48 horas.

**Figura N° 12:** Cinética de inactivación de f UTA 12



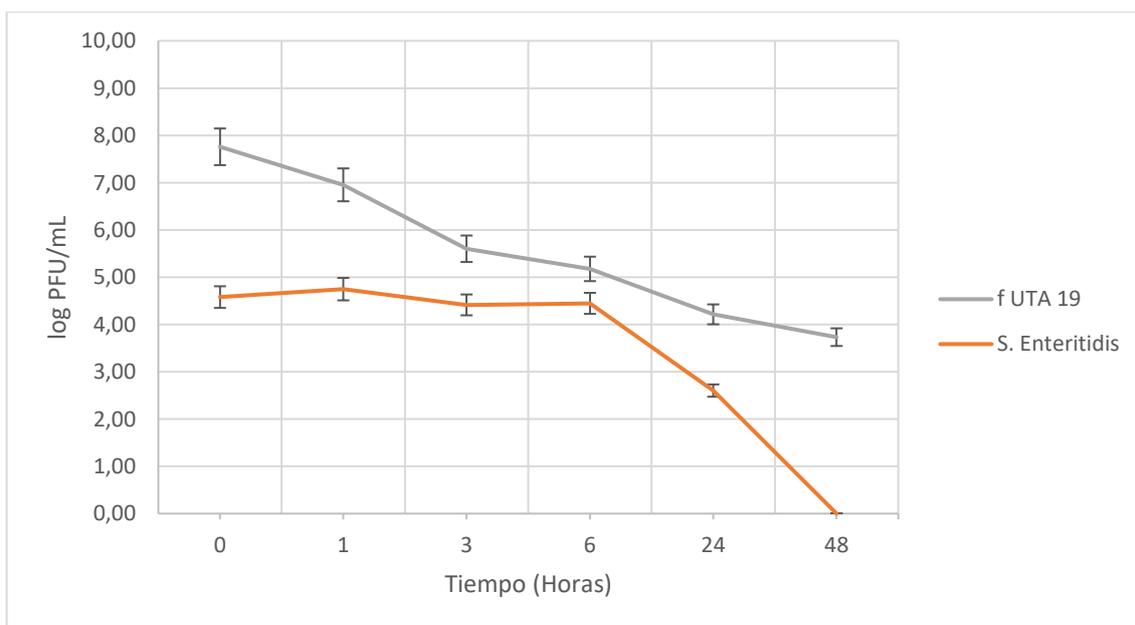
De acuerdo a la prueba T student, se detectó que el efecto de la adición de f UTA 12 sobre *S. Pullorum* generó una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar ya que la diferencia de crecimiento fue de 1 log PFU/mL en 48 horas.

**Figura N° 13:** Cinética de inactivación de f UTA 13



De acuerdo a la prueba T student, se detectó que el efecto de la adición de f UTA 13 sobre *S. Pullorum* generó una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar ya que la diferencia de crecimiento fue de 1 log PFU/mL en 48 horas.

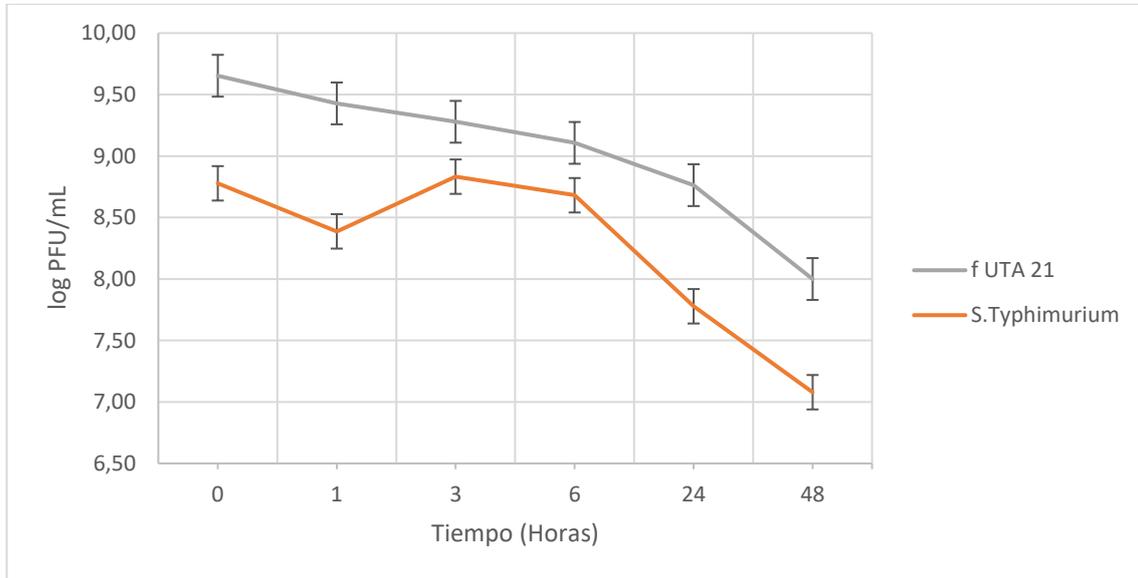
**Figura N° 14:** Cinética de inactivación de f UTA 19



De acuerdo a la prueba T de Student, se detectó que el efecto de la adición de f UTA 19 sobre *S. Enteritidis* generó una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades

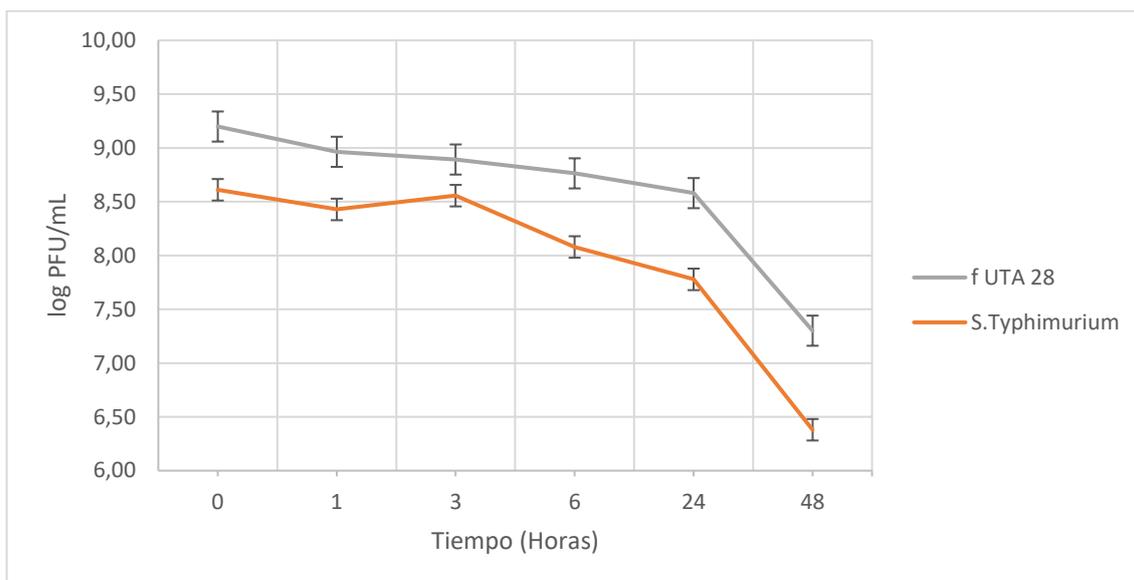
bacterianas de este serovar ya que la diferencia de crecimiento fue de 4 log PFU/mL en 48 horas.

**Figura N° 15:** Cinética de inactivación de f UTA 21



De acuerdo a la prueba T de Student, se detectó que el efecto de la adición de f UTA 21 sobre *S. Typhimurium* generó una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar ya que la diferencia de crecimiento fue de 1 log PFU/mL en 48 horas.

**Figura N° 16:** Cinética de inactivación de f UTA 28



De acuerdo a la prueba T de Student, se detectó que el efecto de la adición de f UTA 28 sobre *S. Typhimurium* generó una diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) en las densidades bacterianas de este serovar ya que la diferencia de crecimiento fue de 1 log PFU/mL en 48 horas.

## DISCUSIÓN

Se obtuvo un número considerable de bacteriófagos, con una elevada diversidad de acuerdo a su perfil de lisis para los diferentes serovares de *Salmonella* evaluados. Adicionalmente, ninguno de los fagos aislados mostró un perfil lítico frente a los microorganismos de diferente género y especie evaluados. Por lo general, los bacteriófagos muestran una especificidad alta de acuerdo a especie, subespecie y clasificaciones menores como serovares (Moreno Switt et al., 2013; Uzzau et al., 2001). Sin embargo, se ha observado que existen bacteriófagos líticos de *Salmonella* con capacidad de infectar y causar lisis en bacterias diferentes debido a que probablemente usan receptores o funciones intermediarias que son comunes en un amplio rango de bacterias (Bielke, Higgins, Donoghue, Donoghue, & Hargis, 2007).

Los perfiles de lisis de los bacteriófagos aislados muestran patrones definidos para los serovares estudiados, siendo éstos agrupados en 2 clústeres. Cada clúster denota que la influencia de las diferencias entre serogrupos es determinante. El clúster A incluye a fagos cuyos huéspedes son los serovares Infantis y Kentucky, los cuales pertenecen a los

serogrupos C (C1 Infantis, C2 Kentucky). El clúster B1, en cambio incluye a serovares que pertenecen a los serogrupos B1 (Typhimurium), D1 (Enteritidis y Pullorum); y el clúster B2 agrupa a los fagos con capacidad lítica para el serovar del grupo B1 (Typhimurium) y D1 (Pullorum) (Fuche, Sow, Simon, & Tennant, 2016; Grimont & Weill, 2007). Por lo que, los fagos de los clústers B1 y B2 pueden ser considerados de amplio espectro. Este perfil no específico a los serogrupos ha sido estudiado en investigaciones de bacteriófagos de *S. Pullorum*, los cuales han mostrado un perfil lítico frente a bacterias como Indiana (B), Typhimurium (B1), Paratyphi A (A), Enteritidis (D1) y Derby (B) (Bao et al., 2019; Petsong et al., 2019).

Los fagos del clúster A presentan un perfil lítico enfocado al serogrupo C. Es necesario complementar el rango de huéspedes para estos fagos, considerando que es habitual que presenten un perfil lítico extenso entre serovares; como por ejemplo la detectada en fagos obtenidos a partir de residuos de bovino, en donde los fagos líticos de *S. Infantis* y *Kentucky*, mostraron lisis frente a serotipos como Javiana (D1), Panama (D1), Enteritidis (D1), Typhimurium (B1), Muenster (E1), Anatum (E1), Mbandaka (C1) y Montevideo (C1) (Moreno Switt et al., 2013). Sin embargo, en nuestro caso podrían ser un excelente recurso para investigaciones posteriores, considerando que el clúster A engloba huéspedes de presencia recurrente en el sector avícola del Ecuador (Calero-Cáceres et al., 2020; Sánchez-Salazar et al., 2019; Vinueza-Burgos et al., 2016).

Con la finalidad de mantener constante la cantidad de fago en función de la bacteria huésped a evaluar, se utilizó una concentración equivalente a 10 MOI, considerando que se estima una ratio ambiental de 10:1 entre fagos y bacterias en el microbioma (Clokic, Millard, Letarov, & Heaphy, 2011). Como se puede observar en las gráficas de cinéticas de lisis, cada bacteriófago actúa de diferente manera en función del tiempo; lo que se debe en primer lugar a las adaptaciones del bacteriófago tanto al medio ambiente como al huésped. Otro de los factores que pudieron influir son los mecanismos bacterianos de resistencia a los fagos; entre los que se encuentra la resistencia a la adsorción, que da como resultado una interacción reducida entre el fago y la bacteria (restricción); e infecciones abortivas, donde mueren tanto el fago como la bacteria (Hyman & Abedon, 2010). La resistencia a la adsorción incluye la pérdida de moléculas receptoras de fagos en los huéspedes, así como barreras físicas que ocultan moléculas receptoras, debido a que las bacterias pueden ocultar los receptores de fagos detrás de las barreras que consisten en polímeros extracelulares. Si bien estas barreras pueden bloquear las

infecciones por fagos, no siempre logran hacerlo. De hecho, si bien las barreras pueden desempeñar funciones protectoras contra algunos fagos, su diversidad química entre cepas bacterianas podría ser el producto de una selección dependiente de la frecuencia mediada por fagos (Abedon, 1992). Varios estudios de resistencia al fago de *Lactococcus* han identificado cepas bacterianas que muestran interferencia de adsorción codificada por plásmidos, que consiste en incrementar el nivel de lípidos en el ácido lipoteicoico en la superficie celular y producir una capa que contiene galactosa y/o ramnosa para proteger el receptor del fago (Riley, 2006). Otro de los factores que pueden influir en la resistencia a la infección fágica es el sistema inmune CRISPR/Cas, el cual provee de inmunidad a la bacteria frente a fagos y otros elementos invasivos (Barrangou & Horvath, 2012). Motivo por el cual, es necesaria la continuación de este tipo de investigaciones, en las cuales se podrá evaluar el efecto que tendrían combinaciones de fagos frente a diferentes huéspedes, así como el aislamiento de nuevos fagos y su evaluación frente a bacterias con patrones de resistencia a antibióticos diferentes.

Otro de los factores que pudieron influir son las diferencias en el tipo de familia al cual pertenecen los fagos. Es importante mencionar que según el tipo de bacteriófago, dependerá al receptor al que se va a unir; ya que todos los fagos *Siphoviridae* requieren receptores proteicos para la adsorción en Gram negativos, mientras que los de bacterias Gram-positivas requieren sacáridos y los *Myoviridae* de cepas Gram-positivas se unen exclusivamente a azúcares y los de bacterias Gram negativas también se unen a restos de azúcar y finalmente los *Podoviridae* requieren polisacáridos para la adsorción (Bertozzi, Storms, & Sauvageau, 2016). En nuestro caso, no pudimos realizar los ensayos de microscopía electrónica que nos hubieran permitido conocer las familias de nuestros fagos. Sin embargo, se cuenta con colaboradores que podrían continuar con la identificación morfológica de los mismos en futuras investigaciones.

Si bien en la evaluación del efecto de la adición de fagos con MOI 10 frente a las bacterias huéspedes fue estadísticamente significativa en todos los casos, se destacan los bacteriófagos f UTA 02 en *S. Infantis*, f UTA 19 y f UTA 20 en *S. Enteritidis*; los cuales provocaron un efecto de eliminación de la totalidad de la concentración del huésped después de 48 horas. Se recomienda continuar investigando las cinéticas de lisis del resto de bacteriófagos a diferentes MOI y condiciones de cultivo, así como el potencial efecto de la interacción entre bacteriófagos en forma de cóctel fágico.

Esta investigación puso en evidencia la considerable diversidad de bacteriófagos líticos de *Salmonella* aislados a partir de fuentes ambientales del centro del país. Es necesario continuar investigando sobre la capacidad lítica de los fagos frente a bacterias patógenas, como una alternativa al desarrollo de antibióticos de síntesis. Por lo que, la prospección preliminar y las subsecuentes evaluaciones genómicas y microscópicas son necesarias con la finalidad de seleccionar potenciales candidatos como agentes de biocontrol.

### **Verificación de Hipótesis**

Este estudio planteó la hipótesis de detectar bacteriófagos líticos de *Salmonella* en diferentes muestras de origen ambiental, de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi; y en caso de ser positiva, evaluar su efecto frente a microorganismos patógenos. Por lo tanto, se acepta la hipótesis, considerando la elevada diversidad de bacteriófagos aislados que ejercen actividad lítica frente a diversos serovares de *Salmonella* y cuyo efecto es estadísticamente significativo. Sin embargo, estos bacteriófagos no presentan actividad lítica frente a microorganismos de otros géneros; el cual es un efecto habitual, considerando la elevada especificidad que presentan los bacteriófagos.

## CAPITULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

Se aislaron 26 bacteriófagos de *Salmonella* a partir de muestras de aguas provenientes de las provincias de Tungurahua y Cotopaxi, utilizando como huésped los serovares de *S. enterica* Infantis, Enteritidis y Typhimurium.

Se evaluaron los perfiles líticos de los 26 bacteriófagos frente a cepas patógenas de cinco serovares de *Salmonella* (Infantis, Enteritidis, Kentucky, Pullorum, Typhimurium), *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* y *L. monocytogenes*, mediante la prueba de la gota; además se elaboró un dendograma en el que se encontró relación entre los serovares de *S. Typhimurium*, Pulloum y entre los serovares *S. Kentucky* e *Infantis* debido a la similitud que muestran ciertos fagos en cuanto a su actividad lisogénica frente a estos dos grupos de serovares.

Se procedió a evaluar las cinéticas de inactivación de los fagos frente a su bacteria huésped, detectándose un efecto estadísticamente significativo considerando una MOI de 10. Los fagos que presentaron una actividad lítica notable fueron f UTA 02 en *S. Infantis*, f UTA 19 y f UTA 20 en *S. Enteritidis*, los cuales mostraron una inactivación de hasta 9 log UFC/mL en 48 horas.

## **4.2.Recomendaciones**

Continuar el estudio de los bacteriófagos aislados, creando combinaciones de los mismos (cócteles) para evaluar este efecto sobre la actividad lisogénica y con ello potenciar la eficiencia de los bacteriófagos.

Experimentar con métodos de conservación de bacteriófagos, debido a que al usar el método de criopreservación con glicerol se obtuvo una tasa de mortalidad alta, por lo que se recomienda buscar un método en el que pueda mantener la tasa inicial lo más alta posible.

Continuar con experimentos de prospección ambiental de bacteriófagos, en especial en ambientes impactados por la actividad antropogénica.

Caracterizar a los bacteriófagos por técnicas de microscopía y genómica, con la finalidad de conocer su familia y evaluar si no codifican elementos de virulencia que pueden ser integrados en los cromosomas del huésped por medio de transducción.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abedon, S. T. (1992). Lysis of lysis-inhibited bacteriophage T4-infected cells. *Journal of Bacteriology*, 174(24), 8073–8080. <https://doi.org/10.1128/jb.174.24.8073-8080.1992>
- Akiba, M., Kusumoto, M., & Iwata, T. (2011). Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 85(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.002>
- Alberts, B. (2002). Figure 5-81, The life cycle of bacteriophage lambda - *Molecular Biology of the Cell* - NCBI Bookshelf. Retrieved February 27, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26845/figure/A893/?report=objectonly>
- Bao, H., Shahin, K., Zhang, Q., Zhang, H., Wang, Z., Zhou, Y., Wang, R. (2019). Morphologic and genomic characterization of a broad host range *Salmonella enterica* serovar Pullorum lytic phage vB\_SpUM\_SP116. *Microbial Pathogenesis*, 136, 103659. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103659>
- Barrangou, R., & Horvath, P. (2012). CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 143–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101134>
- Barrow, P. (2013). *Salmonella* Infections in Horses. In *Salmonella* in Domestic Animals. <https://doi.org/10.1079/9781845939021.0000>
- Bertozi, S. J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26755501>
- Bielke, L., Higgins, S., Donoghue, A., Donoghue, D., & Hargis, B. M. (2007). *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. *Poultry Science*, 86(12), 2536–2540. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00250>
- Borie, C., Zurita, P., Sánchez, M. L., Rojas, V., Santander, J., & Robeson, J. (2008). Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie enterica serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 40(2), 197–201. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2008000200013>
- Broudy, T. B., & Fischetti, V. A. (2003). In vivo lysogenic conversion of Tox- *Streptococcus pyogenes* to Tox+ with lysogenic streptococci or free phage. *Infection and Immunity*, 71(7), 3782–3786. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3782-3786.2003>

- Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W., & Bru, H. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *68*(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560>
- Calero-Cáceres, W., Villacís, J., Ishida, M., Burnett, E., & Vinueza-Burgos, C. (2020). Whole-Genome Sequencing of *Salmonella enterica* Serovar Infantis and Kentucky Isolates Obtained from Layer Poultry Farms in Ecuador . *Microbiology Resource Announcements*, *9*(13), 28–31. <https://doi.org/10.1128/mra.00091-20>
- Cantín, T. (2016). *Factores Gre de Salmonella enterica* serovar Typhimurium , su papel en el control de la fisiología y patogenicidad.
- Cartelle Gestal, M., Zurita, J., Paz y Mino, A., Ortega-Paredes, D., & Alcocer, I. (2016). Characterization of a small outbreak of *Salmonella enterica* serovar Infantis that harbour CTX-M-65 in Ecuador. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Vol. 20, pp. 406–407. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.03.007>
- Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017, February 1). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology*, Vol. 74, pp. 277–283. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>
- Donado-Godoy, P., Clavijo, V., León, M., Tafur, M. A., Gonzales, S., Hume, M., ... Doyle, M. P. (2012). Prevalence of *Salmonella* on retail broiler chicken meat carcasses in colombia. *Journal of Food Protection*, *75*(6), 1134–1138. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-513>
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, *8*, 49–61. <https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- EFSA, & ECDC. (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal*, *11*(5), 3196. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3196>
- Egas, R. (2018). Aislamiento e identificación de *Salmonella* y *Escherichia coli* productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en granjas avícolas de reproductoras pesadas en las provincias de Napo y Pastaza, Ecuador. 98. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/17671/1/T-UCE-0014-MVE-006-P.pdf>
- Fiorentin, L., Vieira, N. D., & Barioni Jr, W. (2005). Oral treatment with bacteriophages

- reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*, 34(3), 258–263.  
<https://doi.org/10.1080/01445340500112157>
- Fuche, F. J., Sow, O., Simon, R., & Tennant, S. M. (2016). *Salmonella* Serogroup C: Current Status of Vaccines and Why They Are Needed. <https://doi.org/10.1128/CVI.00243-16>
- Grimont, P., & Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. 9th Edition, Institute Pasteur.
- Grimont, P., & Weill, F.-X. (2008). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemühl, J., Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 161(1), 26–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.10.002>
- Gyles, C. L. (2008, December). Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, Vol. 9, pp. 149–158. <https://doi.org/10.1017/S1466252308001552>
- Hernández, R. (2019). Aislamiento y caracterización parcial de bacteriófagos de *Salmonella* spp con potencial. Retrieved from <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/667337/rhs1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hooton, S. P. T., Timms, A. R., Rowsell, J., Wilson, R., & Connerton, I. F. (2011). *Salmonella* Typhimurium-specific bacteriophage SH19 and the origins of species specificity in the Vi01-like phage family. *Virology Journal*, 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-498>
- Hungaro, H. M., Mendonça, R. C. S., Gouvêa, D. M., Vanetti, M. C. D., & Pinto, C. L. de O. (2013). Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food Research International*, 52(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.032>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 70, pp. 217–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Jassim, S. A. A., & Limoges, R. G. (2017). *Bacteriophages : Practical Applications for*

Nature's Biocontrol. Springer.

- Jurač, K., Nabergoj, D., & Podgornik, A. (2019, January). Bacteriophage production processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 103, pp. 685–694. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9527-y>
- Kazi, M., & Annature, U. S. (2016, March 1). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 53, pp. 1355–1362. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1996-8>
- Keen, E. C., & Dantas, G. (2018). Close Encounters of Three Kinds: Bacteriophages, Commensal Bacteria, and Host Immunity. *Trends in Microbiology*, xx, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.009>
- Kropinski, A. M. (2009). Measurement of the bacteriophage inactivation kinetics with purified receptors. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 501, 157–160. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_16)
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Laiolo, P. (2011). The Rufous-Collared Sparrow *Zonotrichia capensis* utters higher frequency songs in urban habitats. *Revista Catalana d'Ornitologia*, 27, 25–30.
- LeLièvre, V., Besnard, A., Schlusshuber, M., Desmases, N., & Dalmaso, M. (2019, April). Phages for biocontrol in foods: What opportunities for *Salmonella* sp. control along the dairy food chain? *Food Microbiology*, Vol. 78, pp. 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.009>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., ... Hoekstra, R. M. (2010). The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Maron, D. F., Smith, T. J. S., & Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: An international regulatory and economic survey. *Globalization and Health*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-48>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2018). Gaceta Epidemiológica Semanal No.52. Retrieved from <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/GACETA-GENERAL-S52.pdf>

- Moreno Switt, A. I., Orsi, R. H., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Altier, C., & Wiedmann, M. (2013). Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity. *BMC Genomics*, 14(1), 481. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-481>
- Newton, G. J., Daniels, C., Burrows, L. L., Kropinski, A. M., Clarke, A. J., & Lam, J. S. (2004). Three-component-mediated serotype conversion in *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriophage D3. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1237–1247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02311.x>
- O’Sullivan, L., Buttimer, C., McAuliffe, O., Bolton, D., & Coffey, A. (2016). Bacteriophage-based tools: recent advances and novel applications. *F1000Research*, 5(0), 2782. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9705.1>
- OMS. (2014). El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. In WHO. Retrieved from World Health Organization website: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
- OMS. (2018). *Salmonella* (no tifoidea). Retrieved March 5, 2020, from [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Penades, J. R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., & Novick, R. P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.019>
- Petsong, K., Benjakul, S., Chaturongakul, S., Switt, A., & Vongkamjan, K. (2019). Lysis profiles of *Salmonella* phages on *Salmonella* isolates from various sources and efficiency of a phage cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *Microorganisms*, 7(4), 100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040100>
- Pratama, A. A., & van Elsas, J. D. (2018). The ‘Neglected’ Soil Virome – Potential Role and Impact. *Trends in Microbiology*, Vol. 26, pp. 649–662. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.12.004>
- Quiroz, E., Recalde, J., Arias, M. T., Seqqat, R., Vinueza, C., & Ayala, L. (2016). Isolation of lytic bacteriophages for Nanobiocontrol of pathogenic and antibiotic resistant *Salmonella* present in poultry in Ecuador. *Biology and Medicine*, 8(3). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000287>
- Rahmani, M., Peighambari, S. M., Svendsen, C. A., Cavaco, L. M., Agersø, Y., & Hendriksen, R. S. (2013). Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern

- regions of Iran. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-66>
- Riley, P. A. (2006). Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology. *Journal of Clinical Pathology*, 59(9), 1003–1004. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.035774>
- Rincón Acero, C., Paola, D., Rueda, R., Yesid, R., Medina, V., & Carolina, J. (2011). Transmisión de *Salmonella enterica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. 43, 167–177. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=343835702008>
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., ... Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes and New Infections*. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>
- Rohwer, F. (2003, April 18). Global phage diversity. *Cell*, Vol. 113, p. 141. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00276-9)
- Salazar, G. A., Guerrero-López, R., Lalaleo, L., Avilés-Esquivel, D., Vinueza-Burgos, C., & Calero-Cáceres, W. (2019). Presence and diversity of *Salmonella* isolated from layer farms in central Ecuador. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18233.2>
- Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2019). Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jam.14562>
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Schatten, H., & Eisenstark, A. (2015). *Salmonella* Methods and Protocols (Second). New York: Humana Press.
- Sebola, A., & Mlambo, V. (2018). Comparison of meat quality parameters in three chicken strains fed Moringa oleifera leaf meal-based diets Pre-slaughter stress on fatty acid profiles, cholesterol content, nanostructures of meat and physico-chemical parameters of meat View project. Article in *The Journal of Applied Poultry Research*, 24(3), 408–426. <https://doi.org/10.3382/japr>
- Singh, V. (2013). *Salmonella* Serovars and Their Host Specificity. *Journal of Veterinary*

- Science & Animal Husbandry, 1(3), 1–4. <https://doi.org/10.15744/2348-9790.1.301>
- Sodagari, H. R., Mashak, Z., & Ghadimianazar, A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(5), 463–469. <https://doi.org/10.3855/jidc.5945>
- Stevens, M. P., Humphrey, T. J., & Maskell, D. J. (2009). Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), 2709–2723. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0094>
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125(2), S0950268899004379. <https://doi.org/10.1017/S0950268899004379>
- Uzzau, S., Leori, G. S., Petrucci, V., Watson, P. R., Schianchi, G., Bacciu, D., Rubino, S. (2001). *Salmonella enterica* serovar-host specificity does not correlate with the magnitude of intestinal invasion in sheep. *Infection and Immunity*, 69(5), 3092–3099. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3092-3099.2001>
- van den Bogaard, A. E., & Stobberingh, E. E. (1999). Antibiotic Usage in Animals. *Drugs*, 58(4), 589–607. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958040-00002>
- Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2016). Prevalence and diversity of *Salmonella* serotypes in ecuadorian broilers at slaughter age. *PLoS ONE*, 11(7), e0159567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>
- Vinueza, C. (2017). *Salmonella* and *Campylobacter* in broilers at slaughter age: a possible source for carcasses contamination in Ecuador (University Press). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20687.48803>
- Voss-Rech, D., Vaz, C. S. L., Alves, L., Coldebella, A., Leao, J. A., Rodrigues, D. P., & Back, A. (2015). A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Science*, 94(3), 433–441. <https://doi.org/10.3382/ps/peu081>
- WHO. (2017). WHO updates Essential Medicines List with new advice on use of antibiotics, and adds medicines for hepatitis C, HIV, tuberculosis and cancer.
- Zhang, X., Niu, Y. D., Nan, Y., Stanford, K., Holley, R., McAllister, T., & Narváez-Bravo, C. (2019). SalmoFresh™ effectiveness in controlling *Salmonella* on romaine lettuce, mung bean sprouts and seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 306(108250). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108250>

## ANEXOS

## MUESTREO



**Anexo 1:** Muestreo Cantón Baños



**Anexo 2:** Muestreo de la provincia de Cotopaxi



**Anexo 3: Muestreo de la Cantón Ambato (Picaihua)**



**Anexo 4: Muestreo Cantón Ambato (Puerto Arturo)**



**Anexo 5:** Muestreo Cantón Pelileo



**Anexo 6:** Muestreo Cantón Patate



**Anexo 7:** Muestreo vía Patate-Pelileo

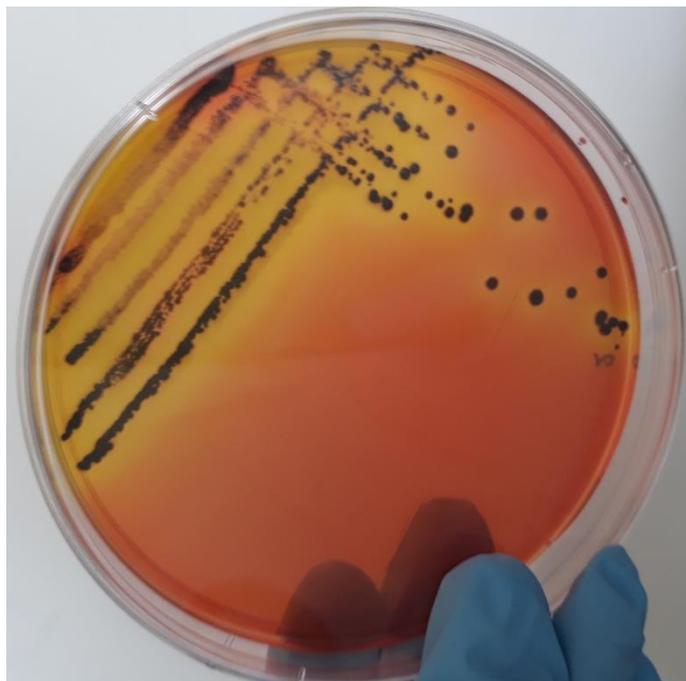


**Anexo 8:** Muestreo vía Patate-Pelileo

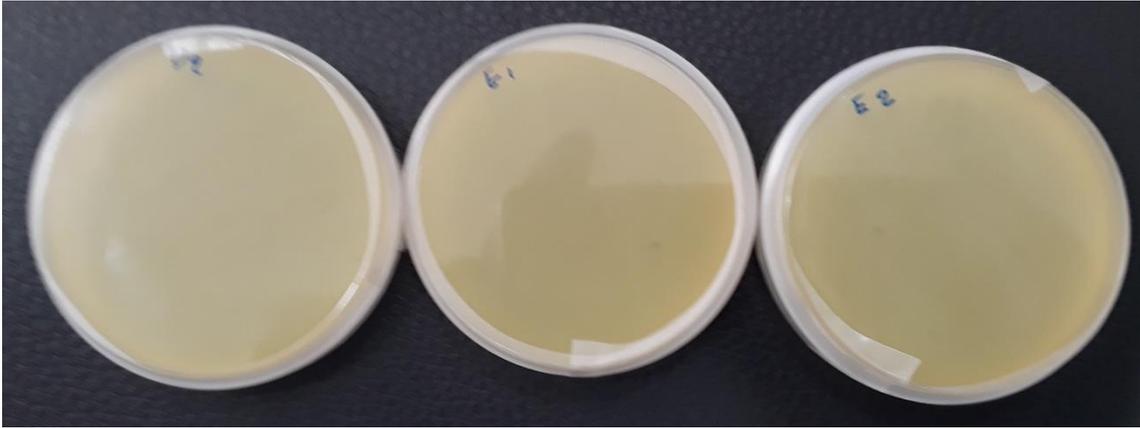


**Anexo 9:** Muestreo Cantón Cevallos (Cascada Jun Jun)

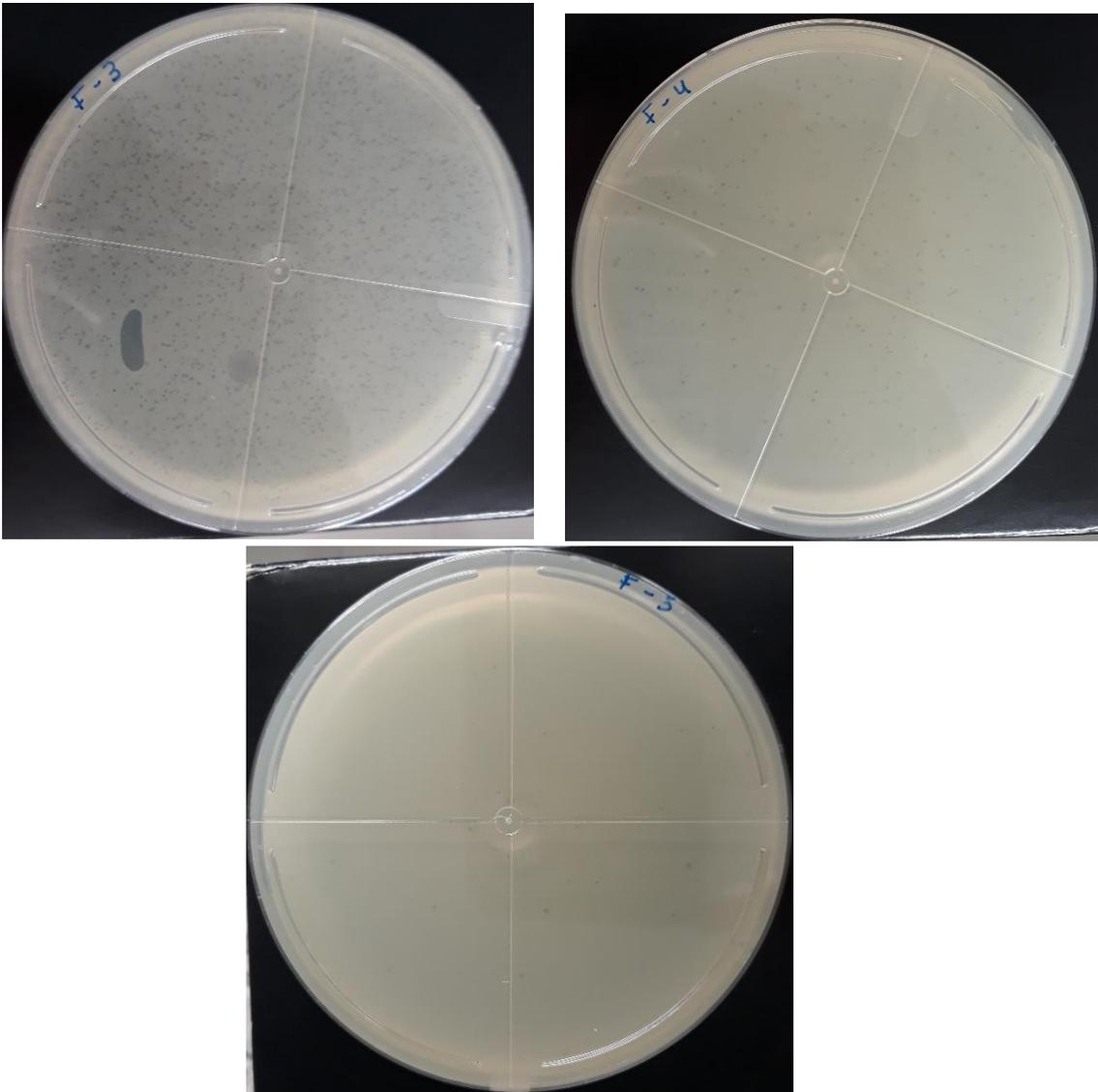
## **AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS DE *SALMONELLA***



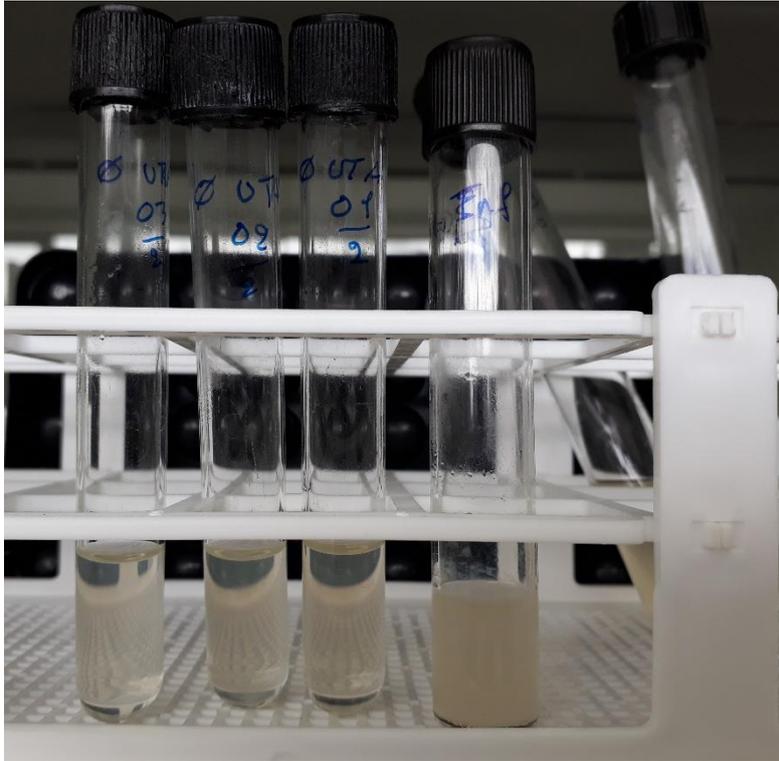
**Anexo 10:** Purificación de cepas patógenas (*S. Infantis* en agar XLD)



**Anexo 11:** Aislamiento de bacteriófagos de muestras de agua (huésped *S. Infantis*)

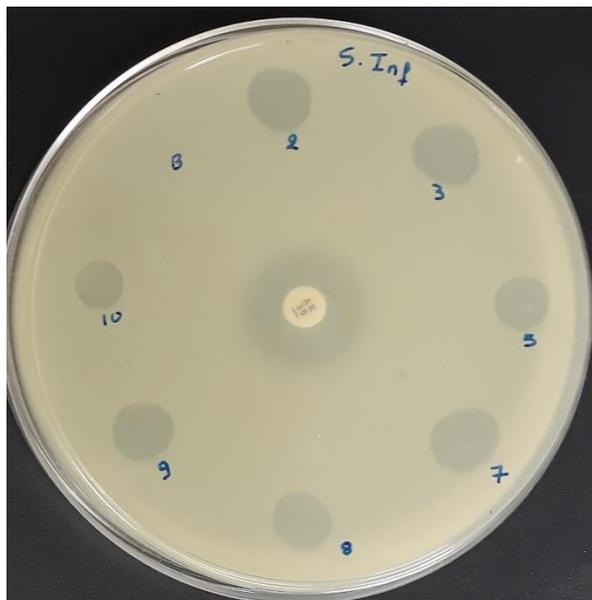


**Anexo 12:** Purificación de bacteriófagos (huésped *S. Infantis*)

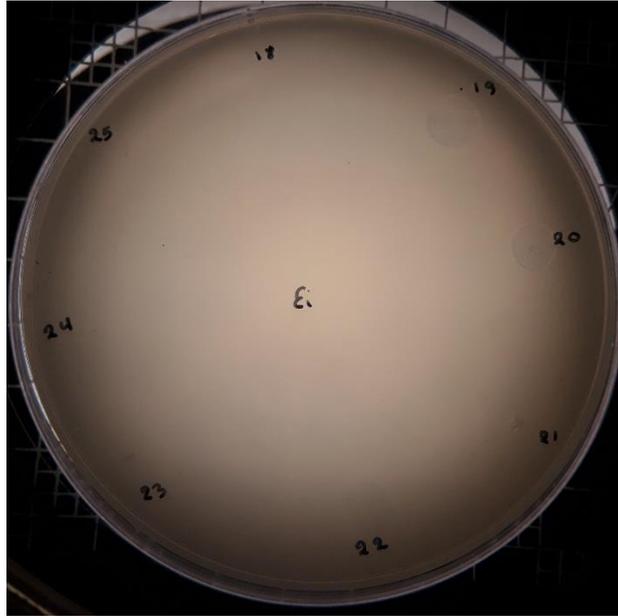


**Anexo 12:** Generación de título alto de bacteriófagos (huésped *S. Infantis*)

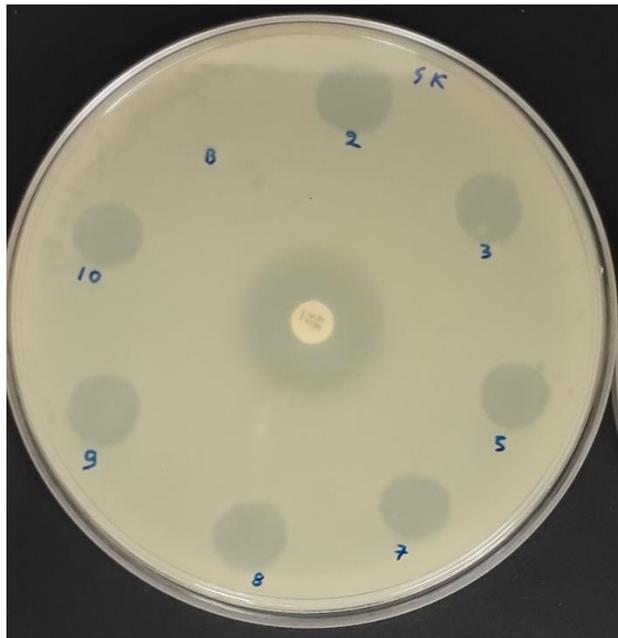
### DETERMINACIÓN DE LOS PERFILES DE LISIS DE LOS BACTERIÓFAGOS



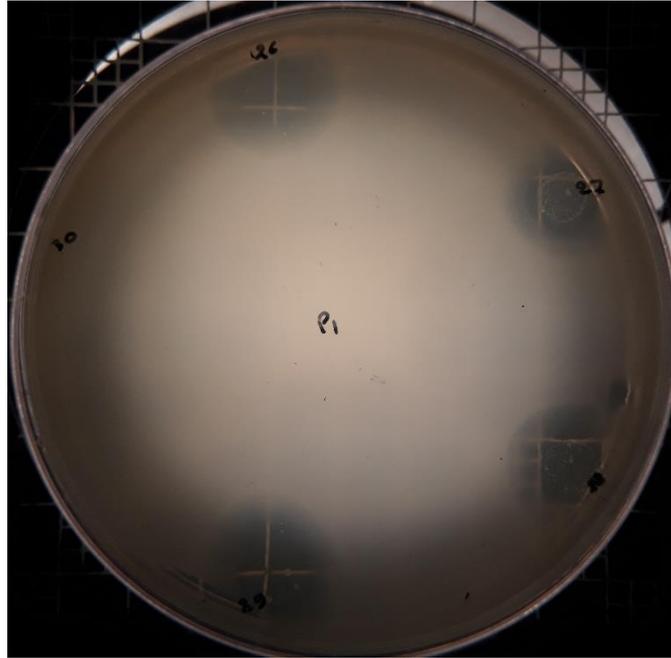
**Anexo 13:** Test de la gota (huésped *S. Infantis*)



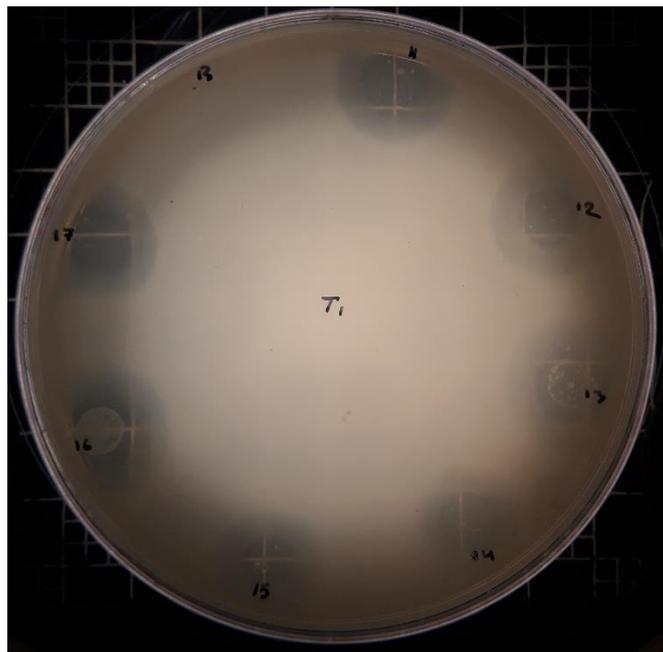
**Anexo 14:** Test de la gota (huésped *S. Enteritidis*)



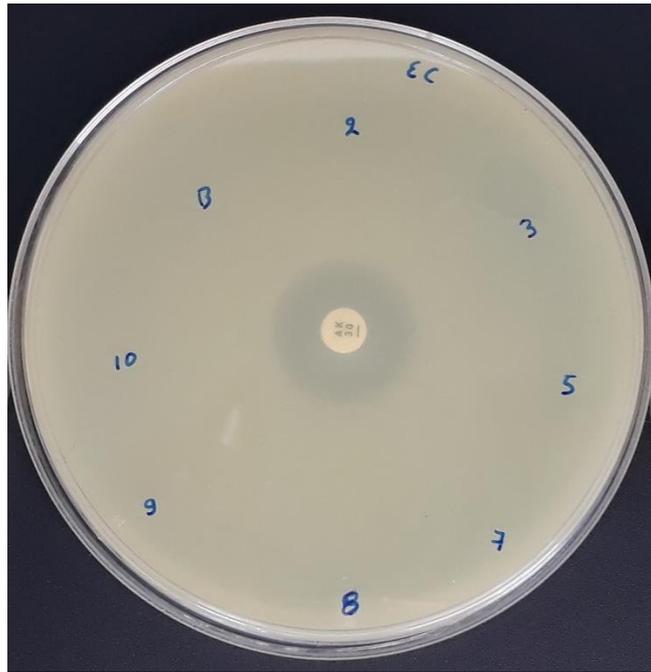
**Anexo 15:** Test de la gota (huésped *S. Kentucky*)



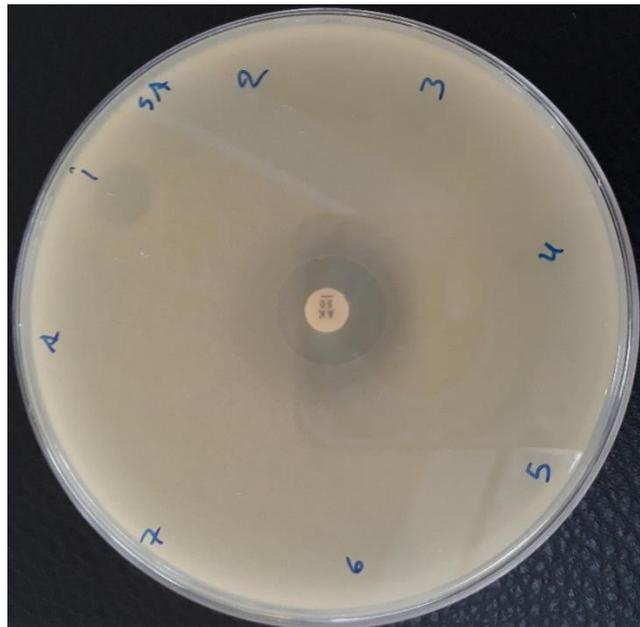
**Anexo 16:** Test de la gota (huésped *S. Pullorum*)



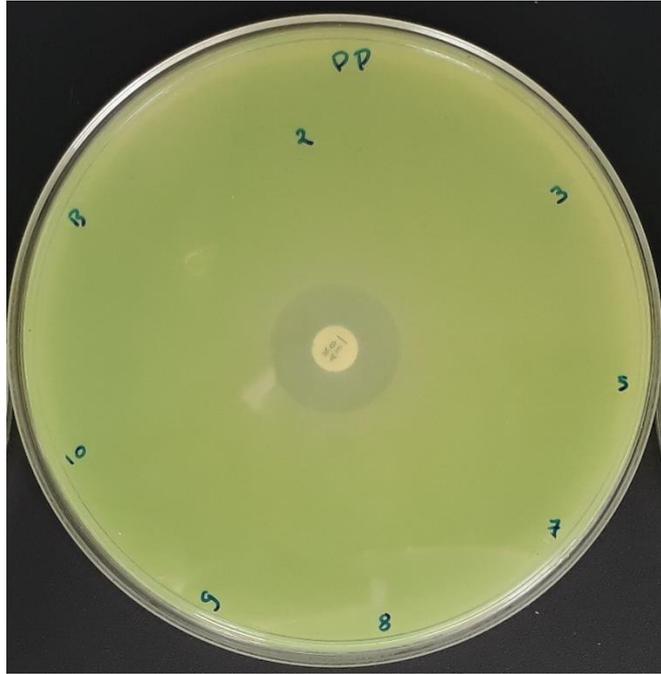
**Anexo 17:** Test de la gota (huésped *S. Typhimurium*)



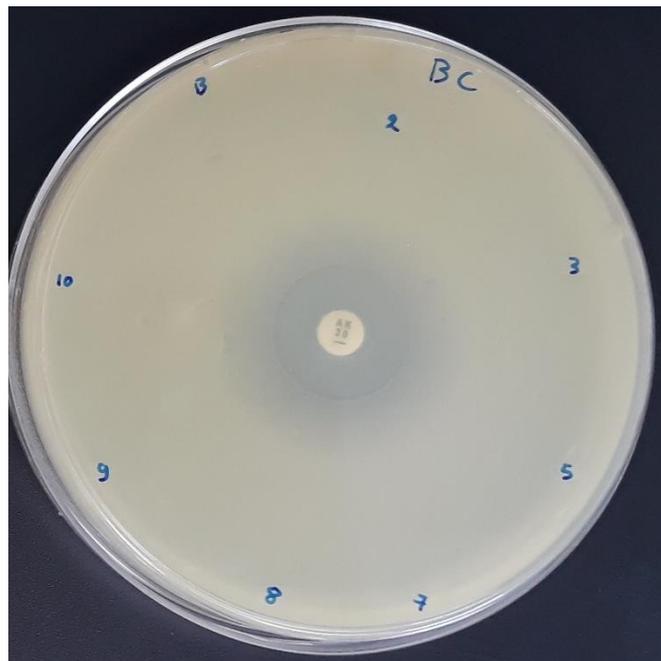
**Anexo 18:** Test de la gota (huéped *E. coli*,)



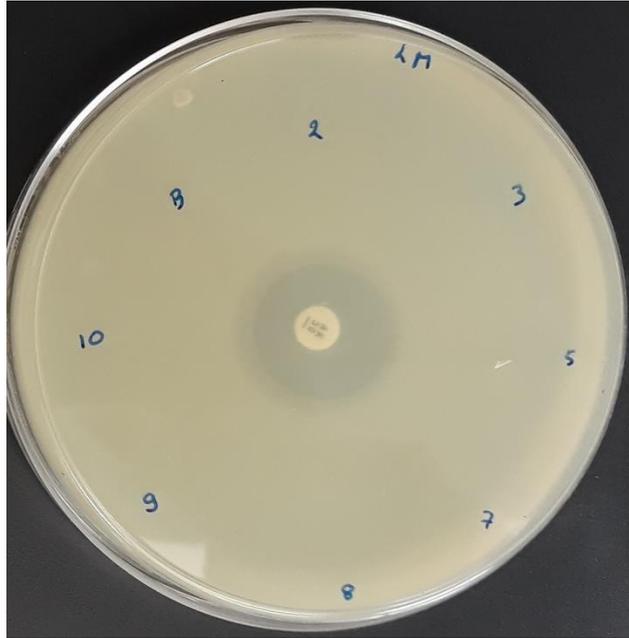
**Anexo 19:** Test de la gota (huéped *S. aureus*)



**Anexo 20:** Test de la gota (huéped *P. aeruginosa*)

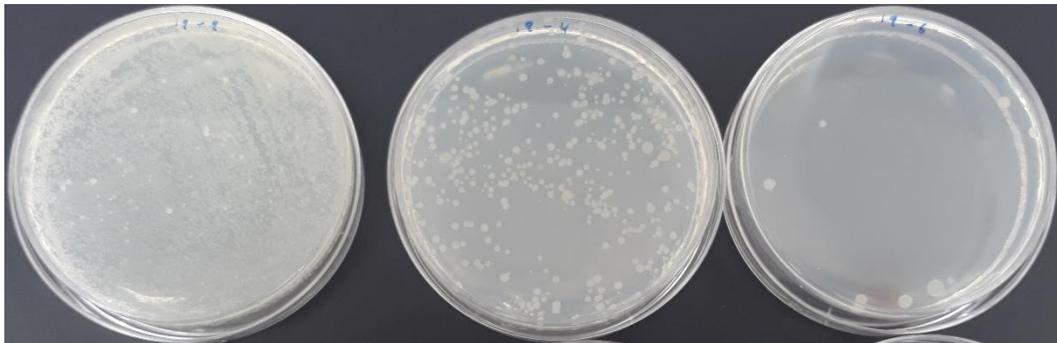


**Anexo 21:** Test de la gota (huéped *B. cereus*)

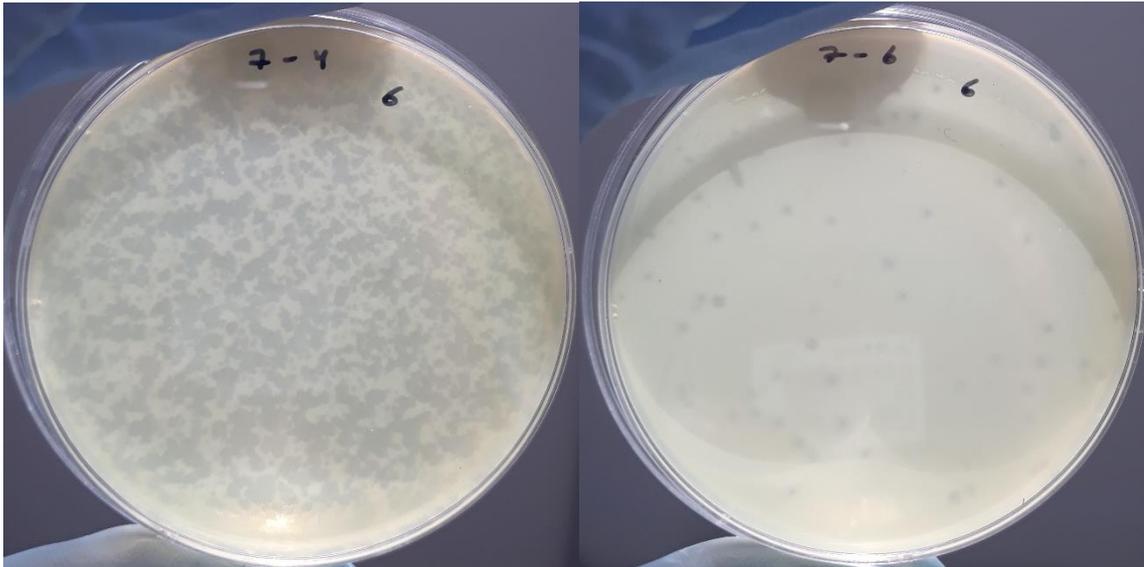


**Anexo 22:** Test de la gota (huéped *L. monocytogenes*)

### **CINÉTICAS DE INACTIVACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS**



**Anexo 23:** Colonias bacterianas de *S. Pullorum* con f UTA 12 (48 horas)



**Anexo 24:** Calvas de lisis de f UTA 07 a 6 horas la cinética (huésped *S. Infantis*)

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**Anexo 23.-** Análisis de varianza completamente al azar

### Infantis

### ANOVA

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:42:33

#### Completely Randomized AOV for log

Source	DF	SS	MS	F	P
Fago	2	104.075	52.0374	1004.58	0.0000
Error	6	0.311	0.0518		
Total	8	104.386			

Grand Mean 4.3056      CV 5.29

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		2.88	0.1331
O'Brien's Test		1.28	0.3449
Brown and Forsythe Test		1.73	0.2546

#### Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Fago	2.0	2490.36	0.0000
Error	2.7		

Component of variance for between groups      17.3285  
Effective cell size      3.0

<b>Fago</b>	<b>Mean</b>
Bac1	8.9067
Bact2	3.2167
Control	0.7933
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.1314
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1858

## Prueba de Media

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:41:52

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of log by Fago

<b>Fago</b>	<b>Mean</b>	<b>Homogeneous Groups</b>
Bac1	8.9067	A
Bact2	3.2167	B
Control	0.7933	C

Alpha	0.01	Standard Error for Comparison	0.1858
Critical Q Value	6.341	Critical Value for Comparison	0.8332

All 3 means are significantly different from one another.

## Resumes

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:42:58

### Breakdown for log

<b>Variable</b>	<b>Level</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>
Fago	Bac1	8.9067	0.0153	8.8900	8.9200
Fago	Bact2	3.2167	0.3449	2.9100	3.5900
Fago	Control	0.7933	0.1904	0.6100	0.9900
Overall		4.3056	3.6122	0.6100	8.9200

Cases Included 9      Missing Cases 0

## Pullorum

### ANOVA

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:44:01

### Completely Randomized AOV for log

<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Fago	4	7.60536	1.90134	317.24	0.0000
Error	10	0.05993	0.00599		
Total	14	7.66529			

Grand Mean 1.3173      CV 5.88

<b>Homogeneity of Variances</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Levene's Test	3.15	0.0642

O'Brien's Test 1.40 0.3023  
 Brown and Forsythe Test 1.76 0.2128

**Welch's Test for Mean Differences**

Source	DF	F	P
Fago	4.0	259.63	0.0000
Error	4.1		

Component of variance for between groups 0.63178  
 Effective cell size 3.0

Fago	Mean
0	0.5167
1	1.6267
2	2.4767
3	1.3233
4	0.6433

Observations per Mean 3  
 Standard Error of a Mean 0.0447  
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0632

## Prueba de Medias

Statistix 10.0  
 09/03/2020; 9:44:34

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of log by Fago**

Fago	Mean	Homogeneous Groups
2	2.4767	A
1	1.6267	B
3	1.3233	C
4	0.6433	D
0	0.5167	D

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0632  
 Critical Q Value 6.141 Critical Value for Comparison 0.2745  
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

## Resumen

Statistix 10.0  
 09/03/2020; 9:44:51

**Breakdown for log**

Variable	Level	Mean	SD	Minimum	Maximum
Fago	0	0.5167	0.0551	0.4600	0.5700
Fago	1	1.6267	0.0252	1.6000	1.6500
Fago	2	2.4767	0.1457	2.3400	2.6300
Fago	3	1.3233	5.774E-03	1.3200	1.3300
Fago	4	0.6433	0.0709	0.5800	0.7200
Overall		1.3173	0.7399	0.4600	2.6300

Cases Included 15 Missing Cases 0

# Enteritidis

## ANOVA

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:45:51

### Completely Randomized AOV for log

Source	DF	SS	MS	F	P
Fago	2	10.5800	5.29000	3051.92	0.0000
Error	6	0.0104	0.00173		
Total	8	10.5904			

Grand Mean 3.8267      CV 1.09

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	0.00	1.0000
O'Brien's Test	0.00	1.0000
Brown and Forsythe Test	0.00	1.0000

### Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Fago	2.0	2615.93	0.0000
Error	4.0		

Component of variance for between groups      1.76276  
Effective cell size      3.0

Fago	Mean
0	2.2933
1	4.5933
2	4.5933

Observations per Mean      3  
Standard Error of a Mean      0.0240  
Std Error (Diff of 2 Means)      0.0340

## PdeM

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:46:18

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of log by Fago

Fago	Mean	Homogeneous Groups
1	4.5933	A
2	4.5933	A
0	2.2933	B

Alpha      0.01      Standard Error for Comparison      0.0340  
Critical Q Value      6.341      Critical Value for Comparison      0.1524  
There are 2 groups (A and B) in which the means  
are not significantly different from one another.

## Resumen

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:46:35

### Breakdown for log

Variable	Level	Mean	SD	Minimum	Maximum
Fago	0	2.2933	0.0416	2.2600	2.3400
Fago	1	4.5933	0.0416	4.5600	4.6400
Fago	2	4.5933	0.0416	4.5600	4.6400
Overall		3.8267	1.1506	2.2600	4.6400

Cases Included 9      Missing Cases 0

## Typhi

### ANOVA

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:47:24

#### Completely Randomized AOV for log

Source	DF	SS	MS	F	P
Fago	3	0.86947	0.28982	8.76	0.0066
Error	8	0.26460	0.03307		
Total	11	1.13407			

Grand Mean 1.8367      CV 9.90

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.45	0.2997
O'Brien's Test	0.64	0.6085
Brown and Forsythe Test	0.52	0.6798

#### Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Fago	3.0	7.48	0.0368
Error	4.2		

Component of variance for between groups      0.08558  
Effective cell size      3.0

Fago	Mean
0	1.4933
1	1.7067
2	1.9267
3	2.2200

Observations per Mean      3  
Standard Error of a Mean      0.1050  
Std Error (Diff of 2 Means)      0.1485

## PdeM

Statistix 10.0  
09/03/2020; 9:47:56

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of log by Fago

Fago	Mean	Homogeneous Groups
3	2.2200	A
2	1.9267	AB
1	1.7067	AB
0	1.4933	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.1485  
 Critical Q Value 6.215 Critical Value for Comparison 0.6526  
 There are 2 groups (A and B) in which the means  
 are not significantly different from one another.

## Resumen

Statistix 10.0  
 09/03/2020; 9:48:15

### Breakdown for log

Variable	Level	Mean	SD	Minimum	Maximum
Fago	0	1.4933	0.2003	1.3000	1.7000
Fago	1	1.7067	0.2501	1.4600	1.9600
Fago	2	1.9267	0.1002	1.8300	2.0300
Fago	3	2.2200	0.1400	2.0800	2.3600
Overall		1.8367	0.3211	1.3000	2.3600

Cases Included 12 Missing Cases 0