



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE EL GIRÓN
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
BACTERIÓFAGOS SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*,
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y *ESCHERICHIA COLI***

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORAS: LESLY DENNISSE JURADO SAILEMA

GRACE IVANIA MOLINA CORDERO

TUTOR: GABRIELA INÉS MÉNDEZ SILVA

Quito-Ecuador

2024

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, Lesly Dennisse Jurado Sailema con documento de identificación N° 1721398525 y Grace Ivania Molina Cordero con documento de identificación N° 1725258568; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 13 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Lesly Dennisse Jurado Sailema
1721398525



Grace Ivania Molina Cordero
1725258568

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Lesly Dennisse Jurado Sailema con documento de identificación No.1721398525 y Grace Ivania Molina Cordero con documento de identificación No.1725258568, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación de la actividad antibacteriana de bacteriófagos sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 13 de septiembre del año 2024

Atentamente,

Lesly Dennisse Jurado Sailema
1721398525

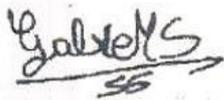
Grace Ivania Molina Cordero
172525868

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Gabriela Inés Méndez Silva con documento de identificación N° 17222305057, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE BACTERIÓFAGOS SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI*, realizado por Lesly Dennisse Jurado Sailema con documento de identificación N° 1721398525 y por Grace Ivania Molina Cordero con documento de identificación 1725258568 obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 13 de septiembre del año 2024

Atentamente,



Ing. Gabriela Inés Méndez Silva. MSc

1722305057

Dedicatoria

A mi mamá Marisol Sailema por su apoyo incondicional y por ser el pilar fundamental en mi camino hacia este logro. Por brindarme su fortaleza, su confianza y palabras de aliento para cumplir con mi objetivo. Este trabajo es el reflejo de la constancia y perseverancia que me has inculcado desde pequeña .

A mi papá Luis Jurado por demostrarme que con disciplina y trabajo duro puedo dar lo mejor de mí en cada paso hacia mi meta final. Te doy las gracias por creer en mí y en mis capacidades y por recordármelo cada vez que puedes. Esta tesis es un homenaje a ti y al gran hombre que eres.

A Javier por ser mi compañero de vida, mi confidente y mi mayor apoyo. Tu amor y paciencia me han ayudado para seguir cumpliendo cada una de las metas que me he propuesto lograr junto a ti. Te doy las gracias por que tu amor me ha impulsado a mantener la motivación durante este ciclo de mi vida.

A mi familia, mis tíos, abuelitos y primos por estar siempre presentes en mi vida apoyándome con sus palabras de aliento

Sin cada uno de ustedes, esto no habría sido posible, me inspiran a seguir adelante siendo una mejor persona y profesional.

Con mucho amor y gratitud

Lesly Jurado

Dedicatoria

A mis queridos padres, Brian Molina y Mónica Cordero

Quienes, con su esfuerzo constante, dedicación, paciencia y amor han sabido guiarme en el camino de la vida, a ellos que siempre me han cuidado, protegido mi espalda y me han dado su apoyo incondicional. Gracias por creer en mí, por cada sacrificio y por enseñarme lo importante que es esforzarse y nunca rendirse.

Les debo todo lo que soy y todo lo que consiga.

A mi ejemplar hermano, Patrick Molina

El cual ha estado siempre para escucharme y aconsejarme, gracias por todas esas palabras de ánimo y por ser un pilar fundamental en mi vida. Gracias por estar en los momentos más difíciles y celebrar juntos cada logro, eres mi inspiración diaria.

En cualquier parte del mundo siempre serás mi otra mitad.

A mi amado esposo, Sébastien Delaloye

Quien me ha apoyado incondicionalmente desde el primer día hasta la culminación de este viaje académico, quien ha sido mi mayor fortaleza con su constante aliento, gracias por estar a mi lado en cada paso del camino y por ser mi compañero de vida.

Este logro es tanto mío como tuyo.

Esta tesis va para ustedes.

Ivania Molina

Agradecimiento

Agradecemos a nuestra tutora de tesis Gabriela Méndez que nos ha apoyado constantemente y nos ha guiado a lo largo de este trabajo experimental ya que siempre ha estado al tanto de nuestro trabajo y dispuesta a resolver cualquiera de nuestras dudas con su gran conocimiento.

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana y a las personas que conforman los Laboratorios de Ciencias de la Vida por brindarnos su tiempo, apoyo y recursos para el desarrollo de este trabajo experimental.

Resumen

Las bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* son responsables de diversas infecciones, enfermedades y muertes humanas, que representan un reto para la salud mundial, ya que para combatirlas se ha hecho uso indiscriminado e irresponsable de los antibióticos. De aquí surge la problemática central de esta investigación: la resistencia antimicrobiana, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas efectivas para combatir estas infecciones. Los bacteriófagos que son virus que infectan bacterias, inyectando su material genético en el interior de estas para luego multiplicarse dentro de la célula bacteriana y matarla tras provocar su lisis al liberar las nuevas partículas fágicas se han posicionado como herramientas terapéuticas para eliminar bacterias específicas. Siendo así en este trabajo se logró aislar bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* ATCC 27853 procedentes de muestras de aguas residuales del río Machángara en la ciudad de Quito. Además, se evaluó la actividad antibacteriana del fago aislado de manera cuantitativa obteniendo el título fágico de $1,2 \times 10^5$ UFP/mL correspondiente a la dilución 10^{-4} como la mejor concentración del bacteriófago que inhibe el crecimiento de la bacteria en cuestión. Por otro lado, se logró purificar el bacteriófago para caracterizarlo fenotípicamente a través de variaciones de pH y temperatura y así conocer cuáles son las condiciones óptimas en las que el bacteriófago logra infectar a la célula bacteriana. Siendo el pH 7 el ideal para que se produzca la lisis de *Escherichia coli*. Así mismo a temperaturas entre 37 °C y 50 °C el bacteriófago muestra estabilidad térmica y así logra formar placas de lisis.

Palabras clave: Bacteriófago, Bacteria, Inhibir, resistencia, caracterización, placas de lisis

Abstract

Pathogenic bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are responsible for various human infections, diseases and deaths, which represent a challenge for global health since to combat them, indiscriminate and irresponsible use of antibiotics has been made. From here arises the central problem of this research: antimicrobial resistance, which has driven the search for effective alternatives to combat these infections. Bacteriophages, which are viruses that infect bacteria, injecting their genetic material inside them and then multiplying inside the bacterial cell and killing it after causing its lysis by releasing the new phage particles, have been positioned as therapeutic tools to eliminate specific bacteria. Thus, in this work, specific bacteriophages for *Escherichia coli* ATCC 27853 were isolated from wastewater samples of the Machangara River in the city of Quito. Furthermore, the antibacterial activity of the isolated phage was evaluated quantitatively, obtaining the phage titer of 1.2×10^5 PFU/mL corresponding to the 10^{-4} dilution as the best concentration of the bacteriophage that inhibits the growth of the bacteria in question. On the other hand, it was possible to purify the bacteriophage to characterize it phenotypically through variations in pH and temperature and thus know what the optimal conditions are in which the bacteriophage manages to infect the bacterial cell. The pH 7 being ideal for *Escherichia coli* lysis to occur. Likewise, at temperatures between 37 °C and 50 °C, the bacteriophage shows thermal stability and thus manages to form lysis plaques.

Keywords: Bacteriophage, Bacteria, Inhibit, resistance, characterization, lysis plates

Índice de contenidos

1. Introducción	1
2. Fundamentación teórica	5
2.1 Bacteriófagos	5
2.1.1 Generalidades	5
2.1.2 Tipos de bacteriófagos.....	5
2.1.2.1 Bacteriófagos icosaédrico	5
2.1.2.2 Bacteriófagos con cola	6
2.1.2.3 Bacteriófagos sin cola	7
2.1.2.4 Bacteriófagos filamentosos	7
2.1.3 Mecanismos de replicación.....	7
2.1.3.1 Ciclo lítico.....	7
2.1.3.2 Ciclo lisogénico	8
2.1.4 Estabilidad del bacteriófago.....	9
2.1.4.1 pH	9
2.1.4.2 Temperatura	9
2.1.5 Fagoterapia	9
2.2 Bacterias oportunistas.....	10
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.2.1.1 Generalidades	10
2.2.1.2 Patogenicidad	11
2.2.1.3 Infecciones	11

2.2.1.4	Resistencia antimicrobiana.....	12
2.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2.2.1	Generalidades	12
2.2.2.2	Patogenicidad	13
2.2.2.3	Infecciones	13
2.2.2.4	Resistencia antimicrobiana.....	13
2.2.3	<i>Eescherichia coli</i>	14
2.2.3.1	Generalidades	14
2.2.3.2	Patogenicidad	14
2.2.3.3	Infecciones	14
2.2.3.4	Resistencia antimicrobiana.....	15
2.3	Técnicas de verificación de presencia de fagos	15
2.3.1	Spot test	15
2.3.1.1	Aplicaciones	16
2.4	Técnicas de cuantificación de la actividad antibacteriana de bacteriófagos	16
2.4.1	Doble capa agar.....	16
2.4.1.1	Aplicaciones	17
2.5	Purificación de bacteriófagos.....	17
2.5.1	Generalidades.....	17
2.5.2	Técnicas.....	17
3.	Materiales y métodos	18
3.1	Toma de muestra.....	18
3.2	Activación de cepas bacterianas	18

3.3	Pretratamiento de las muestras.....	19
3.4	Verificación de la presencia de fagos y evaluación de inhibición bacteriana	20
3.5	Cuantificación de bacteriófagos.....	20
3.6	Purificación de bacteriófagos.....	22
3.7	Caracterización fenotípica mediante análisis de estabilidad de bacteriófagos	22
3.7.1	pH.....	22
3.7.2	Temperatura.....	22
4.	Resultados y discusión	24
4.1	Curva de crecimiento bacteriano.....	24
4.2	Verificación de la presencia de bacteriófagos.....	25
4.3	Cuantificación de bacteriófagos.....	26
4.4	Purificación.....	28
4.5	Caracterización fenotípica	28
4.5.1	Temperatura.....	29
4.5.2	pH.....	30
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	33
6.	Anexos	40

Índice de figuras

Figura 1 Tipos de bacteriófagos	6
Figura 2 Tipos de bacteriófagos con cola.....	7
Figura 3 Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos.....	8
Figura 4 Prueba de spot test con Escherichia coli	16
Figura 5 Curva de crecimiento bacteriano para P. aeruginosa, S. aureus y E. coli	24
Figura 7 Análisis de la varianza para evaluar la actividad antibacteriana de los bacteriófagos sobre E. coli	28
Figura 8 Gráfico de barras del número de halos de inhibición para cada temperatura...	29
Figura 9 Título fágico (UFP/mL) para cada temperatura evaluada	30
Figura 10 Gráfico de barras de halos de inhibición para cada pH.....	31
Figura 11 Gráfico de barras de títulos fágicos a diferentes niveles de pH.....	31

Índice de tablas

Tabla 1.Resultados de Spot Test.....	25
--------------------------------------	----

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Título Fágico	21
---------------------------------	----

Índice de anexos

Anexo 1 Muestras de agua residual Río Machángara.....	40
Anexo 2 Filtrado de muestras con papel Whatman	41
Anexo 3 Resultados de la prueba spot test	42
Anexo 4 Método de cuantificación	43
Anexo 5 Centrifugación de muestras de aguas residuales para su etapa de enriquecimiento	44
Anexo 6 Muestras centrifugadas con pellet	45
Anexo 7 Pretratamiento de muestras con filtro tipo jeringa de 0,22 μm	46
Anexo 8 Cultivo de bacterias mediante hisopado para Spot test.....	47
Anexo 9 Vertido de la capa superior para la técnica de doble capa agar	48
Anexo 10 Equipo utilizado para medir el pH de las muestras y realizar la caracterización fenotípica	49
Anexo 11 Equipo utilizado para ajustar la temperatura establecida a cada muestra para la caracterización fenotípica	50

1. Introducción

Existe una gran variedad de bacterias que impactan de manera negativa al ser humano dando como resultado infecciones bacterianas, enfermedades transmitidas por alimentos, resistencia a los antibióticos, infecciones hospitalarias, toxinas bacterianas, contaminación alimentaria, contaminación sanitaria, etc. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* existen ciertas afecciones con complicaciones severas como las infecciones pulmonares o infecciones del tracto urinario, óseas y sanguíneas. Conviene destacar que dicha bacteria “afecta gravemente a las vías aéreas. Es la principal causa de neumonía asociada a ventilación mecánica y de infecciones pulmonares crónicas” (Díaz, 2020).

Se estima que el 65% de las infecciones bacterianas se debe a la formación del biofilm y a sus mecanismos de tolerancia a los antibióticos, lo cual representa un problema en el ámbito sanitario (Bolívar et al., 2021). Estos biofilms formados por *Pseudomonas* también retardan la cicatrización de heridas lo que se agrava aún más pues este microorganismo cuenta con una alta adaptabilidad al cambio del microambiente o a su vez al cambio respecto a la disponibilidad de nutrientes.

Por otro lado, el microorganismo *Staphylococcus aureus* puede causar enfermedades como: “artritis, osteoartritis, septicemia, endocarditis, neumonías, meningitis, además de lesión de piel y partes blandas. En muchos casos el paciente puede requerir cuidados intensivos o internaciones prolongadas. En casos graves, puede ocasionar la muerte”(Samudio et al., 2023). Las infecciones en huesos pueden ocasionar dolor, hinchazón, escalofríos, fiebre, entre otras.

Escherichia coli es una bacteria intestinal Gram negativo observada por primera vez en las heces de los bebés, la mayoría de sus cepas son inofensivas y beneficiosas pero algunos serotipos son patógenos y esto es lo que llega a causar gastroenteritis, infecciones

urinarias, meningitis e incluso sepsis. “La frecuencia de infección con *Escherichia coli* diarreogénica (DEC) en la población con diarrea ha presentado amplias variaciones, en países de Latinoamérica como Chile, México, Bolivia y Brasil reportaron una frecuencia de infección entre el 10% y el 25%, mientras que Uruguay, Perú, Venezuela y Paraguay informaron valores más elevados” (Molina et al., 2023).

Partiendo de los antecedentes mencionados y recalando la facilidad de adaptabilidad de estos microorganismos se aborda la problemática central de este trabajo experimental, la resistencia a los antibióticos. “El uso y el abuso de antibióticos en la comunidad, hospitales, ganadería, veterinarias y agricultura ha generado que se dispersen y liberen en el medio acuático y lleguen a las plantas de tratamiento de aguas residuales, contribuyendo a la selección y diseminación de bacterias resistentes en el ambiente acuático” (Martínez et al., 2020).

Pacientes con infecciones bacterianas tratados en hospitales o centros de salud rurales del Ecuador son una fuente potencial de cultivos bacterianos no reportados o no identificados de patógenos multirresistentes a los antibióticos, particularmente por la falta de información acerca del análisis de patrones de resistencia en estos microorganismos y el manejo de terapia antibiótica empírica (Ross et al., 2020). Como consecuencia estas bacterias que ahora son multirresistentes se siguen propagando y se limita las opciones de tratamientos teniendo un gran impacto en la salud pública.

La evolución de estos microorganismos ha hecho que los mismos no respondan de manera adecuada a los antibióticos que los combaten, es por ello que se busca una alternativa con el uso de bacteriófagos ya que estos son “una propuesta terapéutica para enfrentar infecciones generadas por bacterias”(Talavera et al., 2023).

Los fagos son virus que presentan la capacidad de infectar y parasitar células bacterianas, se encuentran presentes en cualquier ecosistema, donde desempeñan importantes funciones biológicas, considerándoseles capaces de regular las poblaciones bacterianas naturales y son los agentes biológicos más abundantes del planeta (Rodríguez, 2020). También es importante destacar que presentan un alto nivel de especificidad lo que significa que hay un fago en específico para cada género y especie de bacteria.

Compañías farmacéuticas de Estados Unidos y de Europa Occidental mantienen en evaluación preclínica y clínica de productos fágicos para tratar infecciones bacterianas. De 62 productos fágicos revisados con fines terapéuticos en humanos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) por sus siglas en inglés, 68 % son comercializados, 1 % han recibido aprobación por la FDA como nuevo fármaco en Investigación, 8% son evaluados en ensayos clínicos sin aprobación de FDA 7 % son candidatos para una valoración clínica y 3 % están en evaluación preclínica (Talavera et al., 2023). Esto nos da una idea de que la resistencia a los antibióticos cada vez más es objeto de preocupación e investigación

Es así que para *Pseudomonas aeruginosa* debido a la “formación de biofilms y al uso prolongado de antibióticos, se presenta una adaptación y expresión de mecanismos de tolerancia por parte del microorganismo, lo cual conduce al fracaso terapéutico” (Bolívar et al., 2021). Entonces la fagoterapia es importante ya que conduce a una salida para combatir sus infecciones y complicaciones severas. Pues el virus infectará a esta bacteria de forma específica replicándose dentro de esta para causarle su destrucción.

Debido a esto se ha planteado el ¿Cómo se puede combatir la resistencia a los antibióticos para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*? o ¿será posible que el uso de los bacteriófagos pueda combatir a estos microorganismos?

Entonces la hipótesis de este trabajo experimental se basará en que los cócteles de bacteriófagos si inhibirán el crecimiento bacteriano.

El siguiente trabajo de titulación se desarrolló en la Universidad Politécnica Salesiana en la ciudad de Quito donde se evaluó la actividad antibacteriana de cócteles de bacteriófagos sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a través del método de doble capa con agar nutritivo como base, de igual manera se identificó bacteriófagos aislados de muestras de aguas residuales mediante el spot test o prueba de la gota, y se los purifico con la técnica de doble capa con agar nutritivo como base y por último se caracterizó fenotípicamente los cócteles de bacteriófagos por medio del análisis de la estabilidad del fago, que comprende el estudio de pH y temperatura.

Estas investigaciones sobre bacteriófagos prometen ser beneficios para el futuro ya que se están ampliando las vías para combatir enfermedades que son un desafío en la salud actual mediante terapias más efectivas, específicas y seguras.

2. Fundamentación teórica

2.1 Bacteriófagos

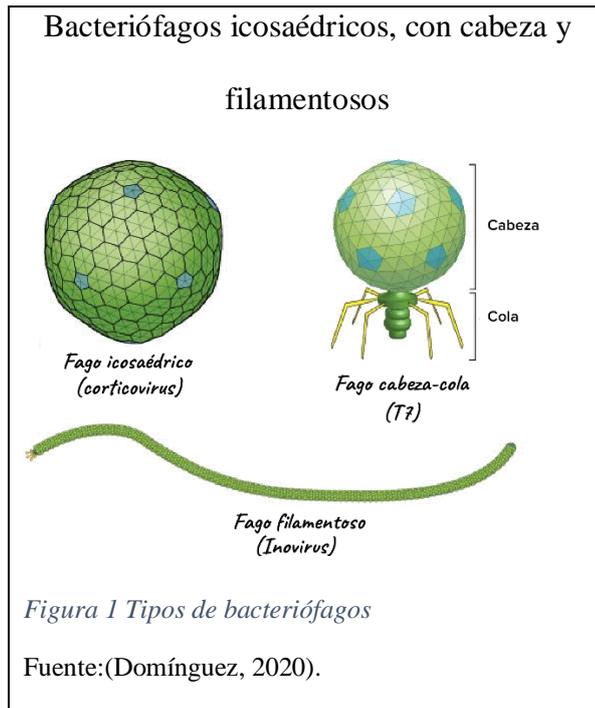
2.1.1 Generalidades

Los bacteriófagos son virus específicos que parasitan a las bacterias. Están formados por "una molécula de ácido nucleico, poseen un tamaño que varía entre 20 a 200 nanómetros, participan activamente en la vida de las bacterias codificando la producción de enzimas y de toxinas, así como en la transferencia de genes entre bacterias" (Domínguez, 2020), son los microorganismos más abundantes en el planeta y los podemos encontrar en todos los ambientes e incluso en alimentos. Además, son reguladores de poblaciones bacterianas. En 1915 se demostró la existencia de los bacteriófagos por los estudios de Frederick Twort.

2.1.2 Tipos de bacteriófagos

2.1.2.1 Bacteriófagos icosaédrico

Este bacteriófago toma este nombre ya que tiene 20 caras como se puede observar en la Figura 1. Es decir, su cabeza o cápside está compuesta de muchas copias de proteínas diferentes. Su cabeza actúa como una estructura protectora del ácido nucleico. Este tipo no posee cola y representan menos del 4 % de todos los fagos. Pueden ser *Corticoviridae* que tiene doble cadena de ADN superenrollado, *Cystoviridae* con tres moléculas de ARN bicatenario lineal y *Microviridae* con cadena simple de ADN lineal. Su genoma se encuentra condensado de forma casi esférica (Osorio, 2019).



2.1.2.2 Bacteriófagos con cola

Estos bacteriófagos representan el 96% de todos los fagos descritos y poseen unas pinzas que permiten inyectar el material genético dentro de la bacteria huésped como se observa en la figura 1. El fago libera una lisozima que es una enzima que le permite degradar una parte de la pared celular bacteriana para que la vaina de la cola empiece su introducción en la membrana de la bacteria y de esta forma liberar el ácido nucleico viral. Estos se subclasifican según su tipo de cola. Tenemos *Myo-viridae* (25%) cuyos fagos presentan colas largas contráctiles; *Siphoviridae* (61%), poseen colas largas no contráctiles y *Podoviridae* (14%), con colas cortas no contráctiles (López et al., 2020).

Bacteriófagos *Myoviridae*, *Siphoviridae* y

Podoviridae

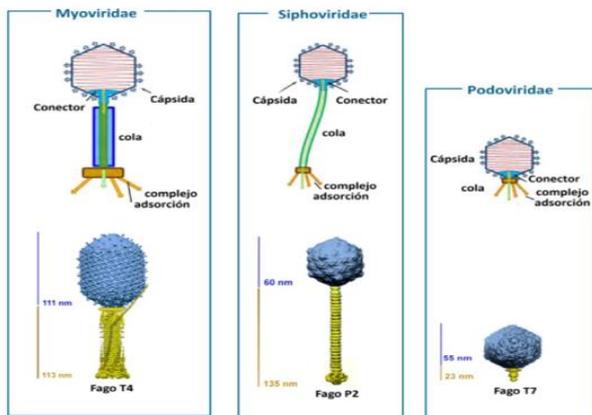


Figura 2 Tipos de bacteriófagos con cola

Fuente: (López et al., 2020)

2.1.2.3 Bacteriófagos sin cola

Estos bacteriófagos son similares a los virus eucariotas, esto quiere decir que dependen de ingresar a la célula huésped para su replicación. Como su nombre lo indica este tipo de fagos carecen de cola, así mismo dentro de estos se ubicarían los bacteriófagos icosaédricos y filamentosos (Grande y Merchan, 2020).

2.1.2.4 Bacteriófagos filamentosos

Estos bacteriófagos no poseen cola y contiene una sola cadena de ADN circular. Además de ser largos contienen una simetría helicoidal. Dentro de este tipo de bacteriófagos, podemos encontrar los *Iniviridae* y los *Lipothrixviridae* esta clase de fagos tienen cadena lineal doble de ADN (Osorio, 2019).

2.1.3 Mecanismos de replicación

2.1.3.1 Ciclo lítico

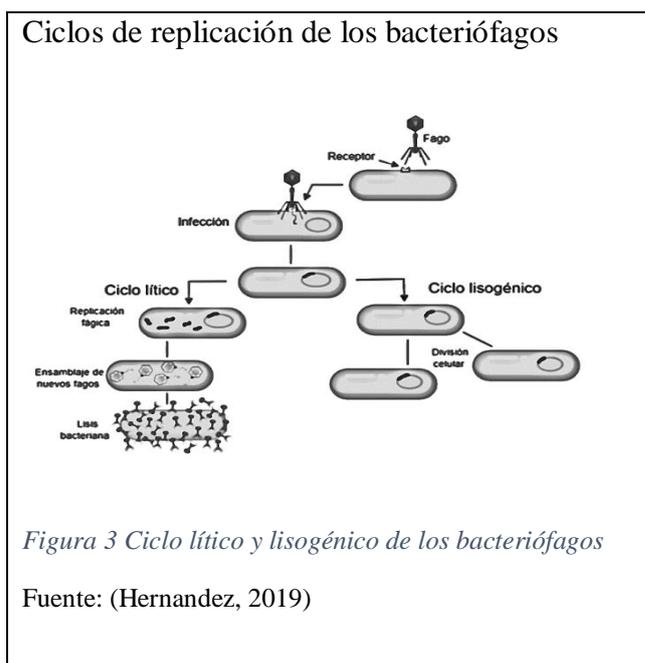
Este estado se denomina también virulento. Los bacteriófagos que cumple con este ciclo se replica ocasionando la lisis de la bacteria huésped ya que estos pasan a dominar la maquinaria metabólica de la bacteria. Su rango hospedero es específico para cada especie

y solo proliferan en ambientes que colonizan sus huéspedes bacterianos (Hernández, 2019).

El fago se fija a la superficie bacteriana adsorbiendo sus componentes debido a que este reconoce los receptores de la misma, posteriormente se forma un poro en la membrana citoplasmática de la bacteria por el cual la vaina del fago va a inyectar el material genético y su envoltura proteica se quedara en el exterior. En primer lugar, se expresan los genes tempranos del fago para después replicarse el genoma fágico y se sintetizan proteínas que permitirán el ensamblaje de nuevas partículas virales. Finalmente se da la lisis bacteriana y se libera la progenie gracias a la producción de endolisinas que va a degradar el peptidoglicano de la bacteria huésped (Hernandez, 2019).

2.1.3.2 Ciclo lisogénico

Los bacteriófagos que cumplen con este ciclo se denominan también temperados o lisogénicos. Este ciclo inicia cuando “el fago inserta su genoma en el ADN bacteriano replicándose en cada división bacteriana, sin afectar la viabilidad de esta”. (Hernandez, 2019).



2.1.4 Estabilidad del bacteriófago

Analizar las características fenotípicas de los bacteriófagos aislados contribuye a evaluar su consistencia frente a cambios de pH, temperatura, composición salina del medio, entre otros. Esto hace posible la eficacia de la aplicación de estos bacteriófagos como herramientas biotecnológicas, pues al conocer bajo qué condiciones estos se mantienen estables, se vuelve factible su reproducibilidad y mantenimiento (Romano et al., 2019).

2.1.4.1 pH

Para evaluar la estabilidad estructural y funcional del bacteriófago se debe tomar en cuenta condiciones de pH específicas para analizar bajo que parámetros se mantiene viable el bacteriófago para de esta forma garantizar su eficacia como agente terapéutico, de investigación, o como herramienta biotecnológica. Esto depende de la especie y tipo de bacteriófago, por ejemplo “su aplicación en alimentos con un pH bajo provoca que sean menos eficaces” Es decir los bacteriófagos suelen ser estables entre valores de pH de 5 y 8 (Lamas, 2022).

2.1.4.2 Temperatura

De igual forma la temperatura es otro parámetro que tomar en cuenta si se quiere evaluar la estabilidad del fago, ya que la temperatura “altera la actividad de los fagos, y esta depende del entorno en el que se encuentran. Usualmente, los bacteriófagos son más termoestables que la bacteria huésped y tienen su óptimo de temperatura a 37-40 °C” (Lamas, 2022). Esto se debe a que generalmente temperaturas altas conducen a la descomposición de la cubierta proteica, es decir se da una inactivación térmica del fago.

2.1.5 Fagoterapia

“Los fagos han sido utilizados desde principios del siglo XX en el tratamiento de diversas patologías como fiebre tifoidea, peritonitis, septicemia, infecciones del tracto urinario,

piel y otitis externa, entre otras”(Ruiz, 2020). Esto evidencia el uso de la fagoterapia desde hace mucho tiempo atrás, sin embargo, con la aparición de los antibióticos se dejó su estudio de lado. Aun así, debido al problema actual de la resistencia de los antibióticos se ha vuelto a prestar atención a esta terapia alternativa. A diferencia de los antibióticos los bacteriófagos son muy específicos, además son eficaces para combatir bacterias multirresistentes, se autorreplican en el lugar de la infección, pueden penetrar biofilms sin mostrar efectos secundarios o toxicidad (Ruiz, 2020).

Además, el uso de los bacteriófagos se ha extendido también a la industria alimentaria ya que estos “se pueden aplicar como agentes de biocontrol antes y después de la cosecha, en el procesamiento de los alimentos y en las superficies de la industria” (Lamas, 2022), por lo que se evitaran enfermedades causadas por infecciones zoonóticas y por ende se brindará seguridad alimentaria al utilizar los fagos como desinfectantes de superficies de procesamiento.

2.2 Bacterias oportunistas

Existe una gran variedad de bacterias en el medio ambiente y en el cuerpo humano que pueden causar infecciones cuando las condiciones son ideales, entre estas podemos encontrar a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que tienen una gran resistencia a condiciones adversas al igual que pueden adaptarse fácilmente. “Pueden desarrollarse en entornos hospitalarios, en gran parte, debido a su persistencia en superficies abióticas, convirtiéndose en un patógeno oportunista que causa infecciones potencialmente mortales” (Cea F et al., 2023).

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1.1 Generalidades

Esta bacteria es “un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 μm de diámetro y de 1,5-5 μm de largo. Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria.” (Solano et al., 2019) El microorganismo es aerobio facultativo y tolera temperaturas entre 20 y 43° C. Posee capacidad para sobrevivir en condiciones medioambientales adversas. Es una bacteria no fermentadora que usa fuentes de carbono y nitrógeno para oxidar azúcares y así obtener energía (Kumar et al., 2023).

2.2.1.2 Patogenicidad

Existen diversos factores que vuelven altamente patógena a esta bacteria y por ende esta adquiere la capacidad de causar múltiples infecciones. Uno de los factores que le confieren patogenicidad a esta bacteria es su flagelo solitario pues, así como este microorganismo se adhiere a las superficies y membranas celulares. Por otro lado, la bacteria puede formar biopelículas o una capsula extracelular de alginato que es un mecanismo de evasión para los anticuerpos y fagocitosis de las células inmunológicas (Kumar et al., 2023).

Además, este microorganismo tiene 5 sistemas de secreción de toxinas, de los cuales el tercero está asociado a su alta patogenicidad. Estas toxinas pueden llegar a inducir apoptosis. Otro de los factores de virulencia es el metabolito piocianina un pigmento azul verdoso que causan efectos proinflamatorios, y oxidativos generando daño celular. Así mismo el quorum sensing es otro factor que le proporciona patogenicidad a *Pseudomonas aeruginosa* ya que gracias a este sistema de comunicación intercelular, la bacteria puede adaptarse fácilmente a cambios ambientales (Solano et al., 2019).

2.2.1.3 Infecciones

Debido a los factores anteriormente descritos que le confieren patogenicidad a esta bacteria, esta se vuelve causante de serias infecciones. *Pseudomona aeruginosa* es el “responsable aproximadamente de 10 a 15% de las infecciones nosocomiales mundiales, [...] la quinta causa más frecuente en las infecciones en general a nivel mundial, [...] la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de sepsis” (Solano et al., 2019).

2.2.1.4 Resistencia antimicrobiana

Los fármacos que se usan para combatir este patógeno afectan su metabolismo, pared celular, la síntesis de proteínas, procesos de transcripción de ADN y ARN. Sin embargo, debido al uso incorrecto y prolongado de estos se han generado diversos mecanismos de resistencia como: la producción de enzimas modificadoras de antimicrobianos y aminoglucósidos como las β -lactamasas, “la adquisición de plásmidos que codifican para genes de resistencia, permeabilidad limitada para los antimicrobianos y la posibilidad de generar una bomba dependiente de energía que expulsa al antimicrobiano fuera de la bacteria” Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. Además, mutaciones en genes cromosomales le confieren resistencia a las penicilinas y monobactámicos (Solano et al., 2019).

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

2.2.2.1 Generalidades

Este microorganismo es anaerobio facultativo y coco gram positivo, generalmente se organizan en racimos, se desarrollan en temperaturas entre 10 y 40°C. Sus colonias suelen ser doradas o amarillas. Es “ β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Se describe que este microorganismo hace parte de la flora normal de los seres humanos encontrándose

principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas” Alexander Ogston descubrió el microorganismo en 1880. (Pasochova et al., 2019).

2.2.2.2 Patogenicidad

Esta bacteria tiene ciertos factores de virulencia que le confieren alta patogenicidad como la formación de biopelículas que son “conglomerados de células adheridas a una superficie, formando una matriz extracelular conformada principalmente por exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos esto la hace a la bacteria mil veces más resistentes que las bacterias que viven en forma planctónica” (Pasochova et al., 2019).

Los agregados bacterianos tienen la capacidad de comunicarse mediante quórum sensing lo que aumenta su nivel de patogenicidad. La persistencia del microorganismo justo con la invasión celular hace que este microorganismo pueda ocultarse en la célula huésped evitando la respuesta inmune y acción eficaz de los antibióticos (Howden et al., 2023).

2.2.2.3 Infecciones

Las infecciones por esta bacteria pueden afectar varias partes del cuerpo van desde lesiones leves hasta infecciones en órganos internos, puede causar una amplia gama de enfermedades, tales como artritis, osteoartritis, septicemia, endocarditis, neumonías, meningitis, además de lesión de piel y partes blandas, en muchos casos el paciente puede requerir cuidados intensivos o internaciones prolongadas, en casos graves, puede ocasionar la muerte (Samudio et al., 2023).

2.2.2.4 Resistencia antimicrobiana

Como respuesta a la evolución de estos microorganismos se dio el desarrollo de mecanismos que contrarrestan los efectos de medicamentos. “Las especies de *Staphylococcus* poseen diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana: alteración o reemplazo del sitio blanco, impedimento para acceder al blanco, inactivación

enzimática del antibiótico, activación de bombas de eflujo transmembrana para bloquear la acción del antimicrobiano”(Jiménez et al., 2020). Existe una gran variedad de genes como el *blaZ* o el gen *mecA* los cuales son los encargados de atribuir esta resistencia a antibióticos específicos.

2.2.3 *Escherichia coli*

2.2.3.1 Generalidades

Esta es una bacteria que se puede encontrar en el intestino de animales y humanos, es necesaria para el buen proceso digestivo, produce vitamina K y B, es un gramnegativo, anaerobio facultativo, fermentadora de lácteos, glucosa y sacarosa. Las cepas emergentes de *Escherichia coli* multirresistentes son más difíciles de tratar y confieren un mayor riesgo de bacteriemia y muerte, las vacunas que pueden prevenir las infecciones invasivas por *Escherichia coli*, como la bacteriemia, no están disponibles actualmente, pero están en desarrollo clínico (Bonten M et al., 2021).

2.2.3.2 Patogenicidad

Existen varias cepas de *Escherichia coli* las cuales son patógenas algunas de estas son: *Escherichia coli* patógena intestinal (IPEC), *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC), *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), etc. Aunque *Escherichia coli* rara vez causa enfermedades, excepto en huéspedes inmunocomprometidos o donde se rompen las barreras gastrointestinales normales, algunos clones de *Escherichia coli* se adaptan a nichos patógenos y causan un amplio espectro de enfermedades al adquirir atributos específicos de virulencia (Liu et al., 2020).

2.2.3.3 Infecciones

Algunos tipos de *Escherichia coli* causan enfermedades e infecciones graves tales como diarrea, infecciones urinarias, enfermedades respiratorias e infecciones del torrente sanguíneo. Las bacterias que ocasionan infecciones urinarias generalmente forman parte del microbiota intestinal, los factores de virulencia que poseen les permiten adherirse, colonizar y migrar al tracto urinario *Escherichia coli* es la especie bacteriana asociada a más del 90% de infecciones urinarias no complicadas, siendo el germen más aislado en pacientes ambulatorios (Díaz S et al., 2021).

2.2.3.4 Resistencia antimicrobiana

La resistencia de esta enterobacteria a múltiples antibióticos dificulta la recuperación del paciente e incrementa los costos sanitarios, ya que se requiere mayor tiempo de hospitalización, *Escherichia coli* utiliza diversos mecanismos, uno de los más importantes es la producción de betalactamasas de espectro extendido (Díaz S et al., 2021). Otros mecanismos de resistencia de esta bacteria son: producción de enzimas que inactivan antibióticos, adquirir genes de resistencia, mutaciones genéticas, etc.

2.3 Técnicas de verificación de presencia de fagos

2.3.1 Spot test

Está es una técnica analítica también conocida como prueba de la gota y es utilizada para identificar la presencia de una sustancia específica en una muestra, puede ser utilizada en química analítica o bioquímica como una prueba rápida y cualitativa. “Nos ayuda a evaluar la actividad lítica de los bacteriófagos, rescatarlos e identificarlos para que de esta manera podamos emplearlos para la formulación de agentes antimicrobianos de cepas específicas” (Bahena E, 2021).

Spot test



Figura 4 Prueba de spot test con Escherichia coli

Elaborado por: (Granda G & Quilachamin T, 2021)

2.3.1.1 Aplicaciones

Esta técnica tiene varias aplicaciones en diversos campos como en detección de drogas donde se puede identificar sustancias ilegales en muestras de orina, sangre o saliva, en análisis alimentarios se puede usar para detectar contaminantes, en diagnósticos médicos se utiliza para identificar enfermedades, también se lo utiliza en control de calidad en la industria farmacéutica. De igual manera puede ser utilizada “para determinar la gama de infección de bacteriófagos en distintas especies o cepas” (García M et al., 2020).

2.4 Técnicas de cuantificación de la actividad antibacteriana de bacteriófagos

2.4.1 Doble capa agar

Este método también es conocido como método de vertido en placa donde se da el crecimiento de microorganismos en dos capas de agar superpuestas, permite mayor facilidad de investigación sobre su comportamiento y crecimiento, es utilizado para “los recuentos (UFC/g-mL) de mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras” (Huaman M, 2021).

2.4.1.1 Aplicaciones

Este método es muy utilizado en diversos campos de la ciencia como en aislamiento de microorganismos, estudios de actividad antibacteriana, estudios de crecimiento microbiano, etc. En varias investigaciones realizadas recientemente “los bacteriófagos presentes en el tracto gastrointestinal se aislaron y purificaron por el método de la doble capa de agar” (Tirado S, 2023).

2.5 Purificación de bacteriófagos

2.5.1 Generalidades

Este proceso se trata de separar los bacteriófagos de cualquier otra sustancia presente en una misma muestra, se realiza para obtener una población de bacteriófagos puros para utilizarse en diferentes campos de la ciencia. “Para la purificación de los bacteriófagos aislados se emplean técnicas como centrifugación a baja velocidad con cloroformo (0.1-1% v/v) y filtración del sobrenadante con membranas de 0.2 o 0.45 μm ” (Bueno Y, 2024).

2.5.2 Técnicas

Existen varias técnicas utilizadas para la purificación de bacteriófagos tales como el uso de filtros de membrana que retienen impurezas, partículas grandes y bacterias permitiendo el paso solo de fagos, también se utiliza la centrifugación a diferentes velocidades y tiempos para separar bacteriófagos de otros componentes con diferentes tamaños y densidades. La purificación “también se puede realizar a partir de las zonas de lisis que se obtienen de la detección de fagos por el método de agar en doble capa, en donde se seleccionan zonas de lisis con diferentes morfologías y tamaños” (Bueno Y, 2024).

3. Materiales y métodos

El siguiente trabajo experimental se llevó a cabo en los Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad politécnica Salesiana. Se utilizaron tres cepas bacterianas que fueron suministradas por la misma universidad quienes las adquirieron a través de la empresa Microbiologics. Además, se usaron muestras residuales provenientes del río Machángara.

3.1 Toma de muestra

Se tomó 3 muestras aleatorias simples de aguas residuales mixtas procedentes del río Machángara en la ciudad de Quito cuyas coordenadas son 0°15'25.8"S 78°31'34.1"W, 0°15'25.7"S 78°31'33.9"W y 0°15'26.1"S 78°31'34.2"W. Para el muestreo se realizó un lavado de manos y antebrazos, se procedió a colocarse guantes de nitrilo, cubre boca, bata y cofia. Se sumergió un frasco de plástico estéril en el agua de interés con el cuello hacia abajo a 20 cm de profundidad, se destapó y dejó llenar el frasco, Se colocó la tapa y se sacó el envase. Se obtuvieron 3 frascos con 300 mL cada uno, los cuales se rotularon con la información del lugar proveniente y fecha, finalmente se cubrieron los frascos con papel aluminio para evitar que la muestra este expuesta a la luz directa y se guardó en una bolsa estéril ziploc desechable para proceder a transportarlo al laboratorio. Una vez en el laboratorio, la muestra se mantuvo a 4 °C para su conservación. (Rodríguez et al., 2022)

3.2 Activación de cepas bacterianas

Para este procedimiento se usó la metodología de Ramos & Hernández (2019) con ciertas modificaciones. Se obtuvo 3 cepas bacterianas identificadas y estandarizadas proporcionadas por la empresa “Microbiologics” las cuales son: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 la cual es una cepa estándar ampliamente utilizada en laboratorios microbiológicos ya que tiene características estables lo que nos permite comparar los resultados con otros estudios, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P que es una cepa representativa y es empleada en pruebas de susceptibilidad a antibióticos, mecanismos de virulencia y respuestas a tratamientos y *Escherichia coli* ATCC 8739 que es muy utilizada en procesos de control de calidad y se utiliza frecuentemente en industrias farmacéuticas y de alimentos. Con un asa bacteriana estéril se tomó una colonia de cada cepa y se resuspendieron en tubos de 5 mL de TSB por separado (Trypto-casein soy broth por sus siglas en inglés) o Caldo Soja Tripticaseína, se dejó incubar por 8 horas a 37 °C. Luego con un asa estéril se sembró por estriado una muestra de cada tubo en TSA (Trypto-casein soy agar por sus siglas en inglés) o Agar soja Tripticaseína y se dejó incubar 24 horas a 37 °C. Al día siguiente se tomaron 3 colonias de cada caja y se resuspendieron en 3 tubos de 15 mL de TSB.

Para definir la curva de crecimiento de cada bacteria se midió la absorbancia a 625 nm (nanómetros) en el espectrofotómetro, para ello se procedió a colocar en una celda 1 mL de TSB como blanco para encerrar el equipo. Después en intervalos de una hora se colocó 1 mL de la última suspensión de cada bacteria en TSB en la celda y se midieron sus valores en el espectrofotómetro. Durante la toma de alícuotas las muestras se mantuvieron en incubación a 37 °C (Castro, 2020)

3.3 Pretratamiento de las muestras

Para este proceso se mezclaron las 3 muestras tomadas en un frasco de vidrio, posterior a ello se filtró el agua con papel filtro Whatman de 11 μm . Se realizó un enriquecimiento diario durante 5 días por cada cepa bacteriana usada para lo cual se colocaron 5 mL de cada bacteria en fase exponencial en 5 mL del filtrado. Se incubó 24 horas a 37 °C. (Tisalema et al., 2023)

Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 5000 RPM durante 20 minutos a 10 °C, luego con una micropipeta se retiró 5 mL de sobrenadante de cada tubo, se los colocó en un nuevo tubo y se añadió 5 mL nuevos de cada bacteria en fase exponencial. Este proceso se repitió 4 veces. Finalmente, en el quinto enriquecimiento después de centrifugar las muestras se procedió a filtrar con filtro tipo jeringa de 0,45 μm de PVDF (fluoruro de polivinilideno) y después con uno de 0,22 μm de PVDF. Se almaceno a 4 °C. (Punil, 2018)

3.4 Verificación de la presencia de fagos y evaluación de inhibición bacteriana

Mediante la metodología descrita por Cuyutupa A (2022) con modificaciones se llevó a cabo una prueba spot test para identificar la presencia de bacteriófagos, para lo cual se realizó una siembra por extensión de las bacterias en fase exponencial en placas de 20 mL de TSA, se dejó secar por 10 minutos en flujo laminar y posteriormente se añadió 20uL del filtrado divididos en 4 gotas de 5 μL en diferentes zonas de la caja y se incubó por 24 horas a 37 °C. La presencia de fagos se determinó mediante la observación de placas de lisis bacteriana como áreas claras o halos.

3.5 Cuantificación de bacteriófagos

Se realizó un DBCA (diseño de bloques completamente al azar) donde se evaluó a que concentración de bacteriófagos se inhibe de mejor manera el crecimiento bacteriano siendo esta la variable independiente. Los porcentajes de inhibición obtenidos fueron la variable dependiente y se utilizaron para un análisis estadístico ANOVA (analysis of variance por sus siglas en inglés) o análisis de varianza.

Para lo cual se hicieron 4 diluciones seriadas (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) con el filtrado final que contenía los bacteriófagos para ello se utilizó 1 mL de la solución madre y se colocó en 9 mL de caldo Nutritivo, se mezcló mediante vórtex por 1 minuto y se realizó el mismo proceso para cada una de las diluciones.

Se utilizó la técnica de doble capa agar para cuantificar los halos de inhibición, donde se tomó 1000 µL de cada dilución y 1000 µL de bacteria en fase exponencial, se los colocó en un tubo de ensayo y se incubó por 10 minutos a 37 °C, se procedió a homogenizar con vórtex durante 1 minuto y luego se añadió 8ml de agar TSB previamente preparado que se mantuvo en baño maría a 50 °C y se volvió a homogenizar por 1 minuto, luego se vertió sobre la capa inferior de agar nutritivo solidificado, este proceso fue por triplicado para cada dilución,

Para obtener el título fágico se utilizó la siguiente fórmula y los datos finales fueron en UFP/mL (unidades formadoras de placas), los cuales se procesaron en el programa infostat.

Ecuación 1. Título Fágico

$$\frac{\# \text{ placas de lisis} * FD \text{ (factor de dilución)}}{V \text{ de disolución (mL)}}$$

3.6 Purificación de bacteriófagos

Luego de realizar la técnica de doble capa agar se seleccionan las diluciones con los mejores halos formados, de acuerdo a la transparencia, borde definido y cantidad. Luego con la punta de una pipeta Pasteur estéril se succionó con delicadeza los bacteriófagos presentes en la placa de lisis y se los colocó en un tubo falcon de 15 mL que contenía solución salina (NaCl 0,9 % p/v), se agitó con un vórtex durante 2 minutos. A esta mezcla se le realizó la técnica de doble capa agar 4 veces para garantizar su correcta purificación. Se obtuvo un purificado final de 15 mL que se mantuvo a 4 °C (Punil, 2018)

3.7 Caracterización fenotípica mediante análisis de estabilidad de bacteriófagos

3.7.1 pH

Para la evaluación de la estabilidad de los bacteriófagos se utilizó la metodología de Tisalema et al. (2023) con modificaciones, se añadió 100 µL de bacteriófago purificado en 900 µL de solución salina a diferentes valores de pH (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11) los cuales se ajustó con el uso de NaOH y HCl, se incubó por 5 horas y después de este tiempo se realizó la técnica de doble capa agar donde se tomó 1000 µL de solución ajustada al pH deseado con el bacteriófago y 1000 µL de bacteria en fase exponencial y se los colocó en un tubo de ensayo, procedimos a homogenizar con vórtex durante 1 minuto y luego se añadió 8 ml de agar TSA previamente preparado y se volvió a homogenizar por 1 minuto, luego se vertió sobre la capa inferior de agar nutritivo solidificado, este proceso se hizo con cada uno de los diferentes pH.

Se dejó incubando las cajas Petri durante 24 horas a 37 °C y después de este tiempo se observó los halos de inhibición y se calculó el título fágico con la fórmula previamente utilizada.

3.7.2 Temperatura

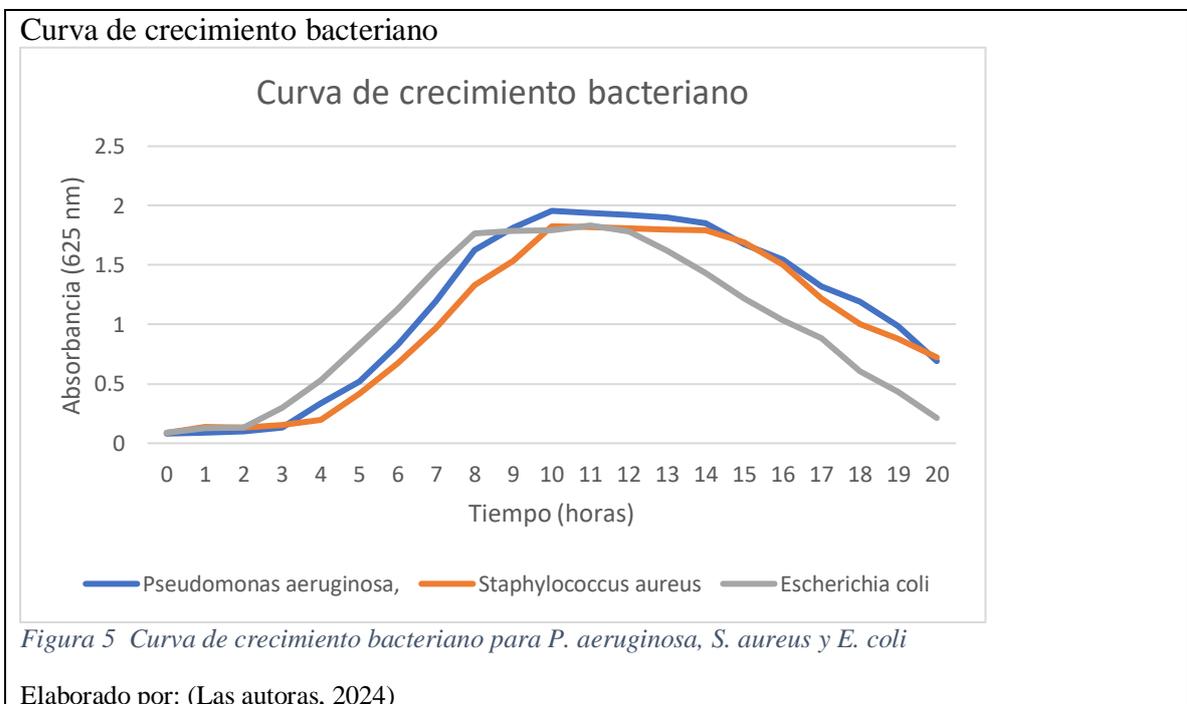
Utilizamos la metodología de Cuyutupa A (2022) con modificaciones donde se preparó 4 tubos de ensayo con 9 mL de caldo nutritivo y se colocó muestras de 1 mL de bacteriófagos purificados en cada uno, se los expusieron a diferentes temperaturas (37, 55, 70, 85) en baño maría y se tomaron muestras cada 30 minutos durante 1h, se realizó la técnica de doble capa agar con cada una de estas muestras donde se tomó 1 mL de solución, 1 mL de bacteria en fase exponencial y 8 mL de agar TSA previamente preparado, se homogenizó por 1 minuto y se vertió sobre la capa inferior de agar nutritivo solidificado, se dejó incubar durante 24 h a 37 °C y después de este tiempo se observó los halos de inhibición y se calculó el título fágico.

4. Resultados y discusión

Se obtuvo 3 frascos de 300 mL de muestra de aguas residuales del río Machángara que se utilizaron para el desarrollo del trabajo experimental. En varias investigaciones logran aislar bacteriófagos de aguas residuales pues es en estas aguas que existe presencia de bacterias hospedadoras y contaminación fecal, tal como en la investigación de Granda G & Quilachamin T (2021) se logró aislar bacteriófagos para *Listeria* spp provenientes de aguas residuales del río Machángara.

4.1 Curva de crecimiento bacteriano

Con nuestras cepas bacterianas activadas se realizó la curva de crecimiento, el muestreo se realizó cada hora durante 16 horas y la densidad óptica utilizada fue de 625 nm. En la Figura 5 se grafica el aumento celular de cada una de las bacterias a lo largo de este tiempo y en condiciones específicas.



Se determinó que la fase logarítmica de *Escherichia coli* empieza de 3 a 4 horas después del inicio de la medición, mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* esta comienza entre

la cuarta y quinta hora, finalmente para *Staphylococcus aureus* empieza a la quinta y sexta hora,

Para el pretratamiento de las muestras después del filtrado con papel filtro Whatman de 11 μm , los 5 enriquecimientos y el uso de 2 filtros de jeringa (0,45 μm y 0,22 μm) se obtuvo 10 mL de filtrado de bacteriófagos.

4.2 Verificación de la presencia de bacteriófagos

Con nuestro filtrado final después del pretratamiento se llevó a cabo como prueba cualitativa el Spot Test en la que se observaron placas de lisis claras y transparentes en el área donde se colocó la muestra lo que nos indicó la presencia de bacteriófagos que infectaron y destruyeron las células bacteriana, este resultado concuerda en comparación con varios estudios similares donde se ha demostrado como los bacteriófagos pueden formar halos de inhibición visibles lo que nos indica lisis bacteriana. Se obtuvo halos solo para *Escherichia coli* ATCC27853, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* no se observó ningún tipo de lisis como se puede observar en la Tabla 1, lo que nos indica que no hay bacteriófagos específicos presentes en la muestra para estas bacterias esto puede ser resultado de bajas concentraciones de esta bacteria en el río o que las condiciones ambientales presentes no son óptimas para la supervivencia de estos bacteriófagos.

Tabla 1. Resultados de Spot Test

Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Resultado de inhibición	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Nota: Solo se obtuvieron bacteriófagos para una bacteria

Las investigaciones actuales apoyan el gran uso de esta prueba ya que es fácil, económica y eficaz al ser un indicativo confiable, “los fagos ideales serán aquellos que muestren un

adecuado resultado por spot test, una buena eficiencia junto con una fuerte inhibición en el crecimiento bacteriano” (Blasco et al., 2023)

4.3 Cuantificación de bacteriófagos

Una vez comprobada la presencia de bacteriófagos mediante spot test, se realizaron 4 diluciones seriadas con el bacteriófago específico encontrado para *Escherichia coli* y posterior a ello se realizó la técnica de doble capa agar por triplicado para cada dilución para determinar el título fágico y comprobar cuál es la mejor concentración a la que se inhibe el crecimiento de esta bacteria. Se escogió esta técnica ya que la misma facilita la cuantificación precisa de UFP/mL y tomando en consideración varias investigaciones es una de las más utilizadas por su eficacia y adaptabilidad para diferentes tipos de bacteriófagos y bacterias.

Como se puede observar en la Figura 6 la dilución 10^0 tuvo una mayor cantidad de halos, sin embargo, fue la dilución 10^{-4} la que obtuvo un mayor título fágico de $1,2E+05$ UFP/mL siendo esta la mejor concentración de bacteriófagos en la muestra. Entonces, aunque la solución madre tiene más halos visibles la última dilución demostró un título fágico más alto debido a la dilución aplicada. Por otro lado, la dilución 10^{-1} mostró una disminución significativa en cuanto a la concentración la cual se obtuvo $9,1E+02$ UFP/mL

Cuantificación de bacteriófagos

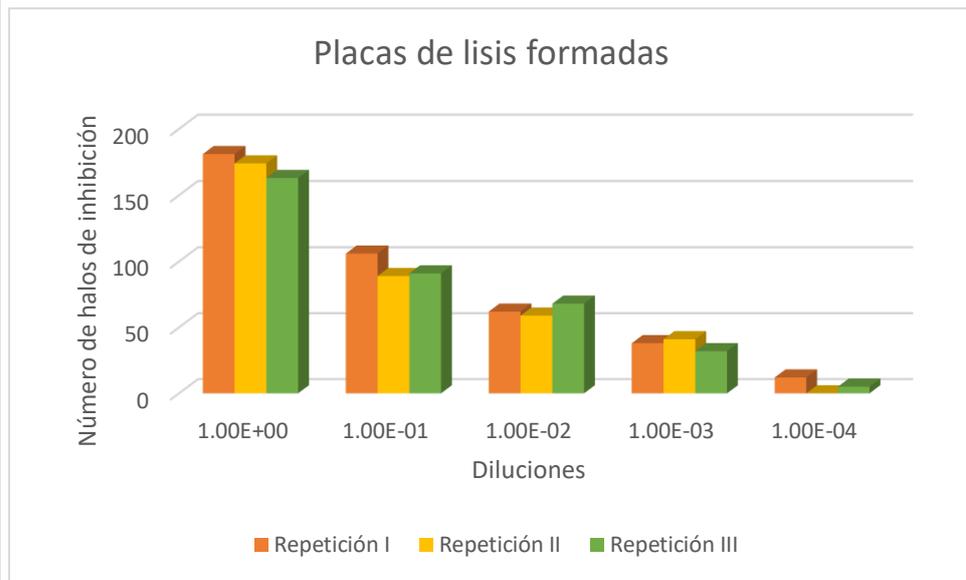


Figura 6 Gráfico de barras según el número de halos de inhibición para cada dilución

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Después de realizar un DBCA en el programa estadístico infostat se obtuvo como resultado que los valores de p-valor indicaron que la hipótesis de investigación es aceptada por lo tanto si existe inhibición en el crecimiento bacteriano para *Escherichia coli* ATCC27853, de igual manera se determinó que no hay diferencia significativa entre repeticiones, pero si la hay entre diluciones tal y como indica la Figura 6

Análisis de la varianza

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halos	15	0,99	0,99	8,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	49235,07	6	8205,84	218,92	<0,0001
Repeticiones	194,13	2	97,07	2,59	0,1358
Diluciones	49040,93	4	12260,23	327,08	<0,0001
Error	299,87	8	37,48		
Total	49534,93	14			

Figura 6 Análisis de la varianza para evaluar la actividad antibacteriana de los bacteriófagos sobre *E. coli*

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

4.4 Purificación

Tras determinar el título fágico para la cuantificación de bacteriófagos y haber seleccionado los mejores halos formados de la dilución 10^{-4} , se realizó la purificación de fagos para eliminar impurezas como restos bacterianos u otros contaminantes, con lo cual se obtuvo 15 mL de bacteriófago purificado final, que se almacenó en un tubo falcon a 4 °C. El mismo fue obtenido después de realizar 4 veces la técnica de doble capa agar, para el cual en la última caja obtenida se visualizaron los halos más transparentes y con un borde mejor definido.

En varios estudios se evidencia que es necesario comprobar el proceso de purificación tras la formación de placas líticas uniformes, es decir con idéntica morfología y tamaño, para proceder a realizar pruebas posteriores con los fagos. Siendo así en este trabajo experimental se purificaron los bacteriófagos provenientes de $1,2E+05$ UFP/mL (Hernández, 2019)

4.5 Caracterización fenotípica

4.5.1 Temperatura

Se obtuvieron 2 cajas Petri por cada parámetro de temperatura evaluado (37, 55, 70, 85 °C), es decir 8 en total. Las cuales luego de realizar la técnica de doble capa agar se observó la presencia de halos en las temperaturas de 37 y 55 °C, mientras que para 70 y 85 °C no se encontró la presencia de los mismos. Esto quiere decir que se calculó el título fágico para las temperaturas más bajas siendo estas $3,1E+05$ UFP/mL para 37 °C a los 30 minutos y $2,8E+05$ UFP/mL a los 60 minutos. Mientras que $2,1E+05$ UFP/mL para 55 °C a los 30 minutos y $1,7E+05$ UFP/mL a los 60 minutos.

Caracterización fenotípica según temperatura

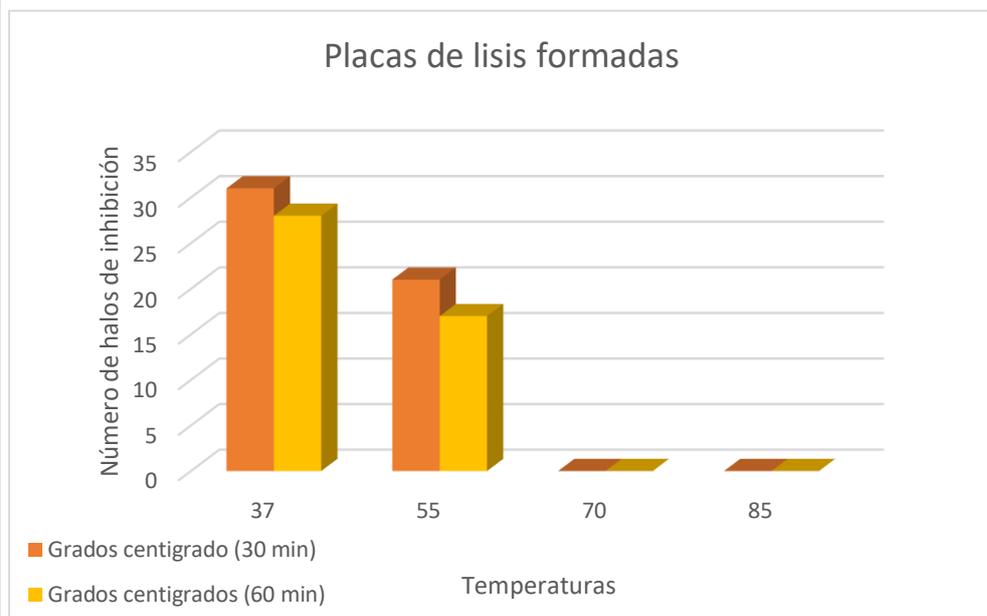


Figura 7 Gráfico de barras del número de halos de inhibición para cada temperatura

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Caracterización fenotípica según temperatura

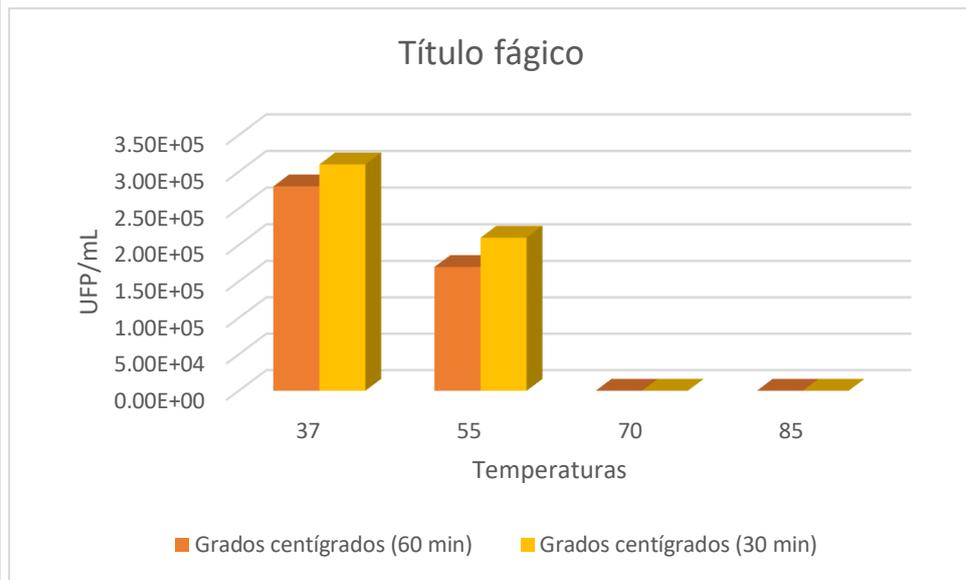


Figura 8 Título fágico (UFP/mL) para cada temperatura evaluada

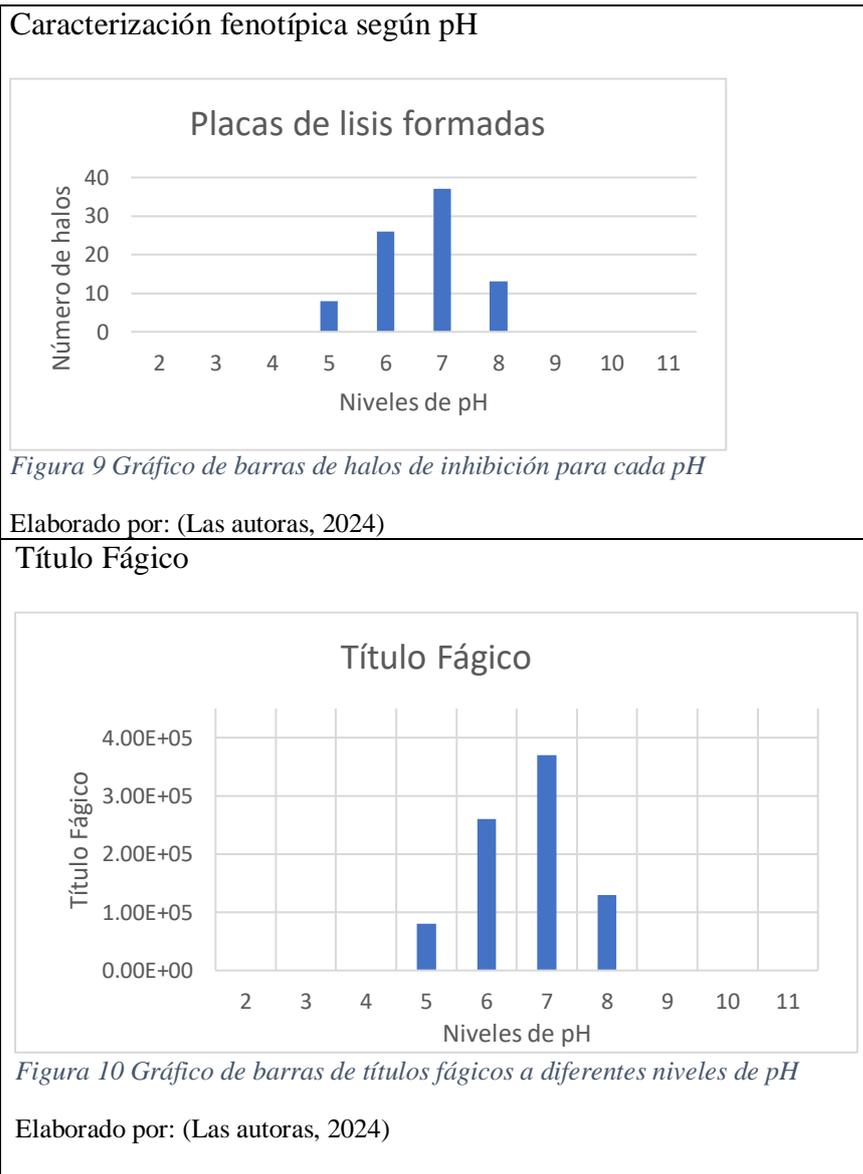
Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Cuando un bacteriófago muestra sensibilidad a cierta temperatura estos pueden perder hasta el 100% de su infectividad. Es importante tomar en cuenta este parámetro para la caracterización fenotípica pues por ejemplo si se quiere dar uso terapéutico al bacteriófago aislado este debe tener la capacidad de soportar temperaturas fisiológicas de los organismos en los cuales van a ser inoculados. Por otro lado, contrastando los resultados obtenidos en otros estudios se tiene en común que la mayoría de bacteriófagos pierden su infectividad en un 70 o 100% a temperaturas superiores a 60 °C. “La temperatura ejerce una presión selectiva en la estabilidad de los bacteriófagos y esta puede variar de una bacteriófago a otro.” (Sánchez, 2020)

4.5.2 pH

Se analizó la estabilidad de los bacteriófagos utilizando solución salina a diferentes valores de pH los que fueron ajustados con NaOH y HCl, se observó que el pH

2,3,4,9,10,11 no mostraron ningún halo de inhibición, el pH 7 contaba con mayor número de placas de lisis como se indica en la Figura 10 y su concentración fue de $3,4E+05$ UFP/mL mientras que los pH 6 y 8 también mostraron actividad significativa con $2,6E+05$ y $1,3E+05$ UFP/mL respectivamente, el pH 5 con $8,00E+04$ UFP/mL fue el menos favorable de estos como se observa en la Figura 11.



Lo que nos indica que estos son parte de las condiciones ideales para que los bacteriófagos puedan destruir las células bacterianas de *Escherichia coli* sin riesgo a degradarse y nos sugiere que estos bacteriófagos tienen una estabilidad óptima cerca del pH neutro. Estos

resultados son concordantes con otras investigaciones donde bacteriófagos con niveles de pH similares pueden ser considerados como candidatos para ser usados en fagoterapia, pero debemos resaltar que el perfil de estabilidad frente al pH es característico de cada bacteriófago” (Hernández-Romano et al., 2019).

5. Conclusiones y recomendaciones

Podemos concluir que en el presente trabajo experimental se aisló bacteriófagos específicos para *Escherichia coli* sin embargo por diversos factores como condiciones ambientales, diversidad de bacterias y bacteriófagos, mecanismos de resistencia o entre otros no se pudo encontrar bacteriófagos específicos para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Se identifico que este bacteriófago en específico tiene mayor estabilidad y actividad inhibidora a un pH de 7 y temperatura de 37 °C el cual también es óptimo para el crecimiento bacteriano lo que facilita la interacción entre el fago y la bacteria para que se produzca la infección y destrucción.

Además, se determinó que la mejor concentración de fagos se obtuvo en la última dilución realizada es decir en 10^{-4} cuyo título fágico fue de $1,2E+05$ UFP/mL, las placas de lisis Formaron áreas transparentes y claras algunas presentaban bordes difusos e irregulares

Los hallazgos obtenidos son prometedores para usarse como control contra *Escherichia coli*, pero se debe considerar más investigaciones para ampliar el rango de estudio y posicionar a los bacteriófagos como una alternativa de tratamiento ante infecciones de esta bacteria en particular. Se podría explorar nuevos nichos ecológicos para aislar bacteriófagos que tengan propiedades inhibidoras para patógenos multirresistentes.

Bibliografía

- Bahena E. (2021). *Aislamiento de bacteriófagos líticos para su utilización como agente bactericida contra infecciones de superficie ocular farmacorresistentes*.
<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/26164/1/cbs1973552.pdf>
- Biotech T, & TM Media. (2022). *Product data sheet tmp 043gt-soyabean casein digest agar plate w/ 0.1% polysorbate 80 (γ-irradiated) (triple pack) intended use*. www.tmmedia.in
- Blasco, L., Garcia, M., Ramon, J., Iglesias, J., & Del Mar, M. (2023). Procedimientos en microbiología clínica. *Seimc*. <file:///C:/Users/patri/Downloads/seimc-procedimiento1f.pdf>
- Bolivar, A., Torres, M., & Sanchez, Y. (2021). Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud de La Universidad Del Cauca*, 23, 48–48.
<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/rfcs/article/view/1780/1542>
- Bonten M, Johnson R, Van Den Biggelaar A, Georgalis L, Geurtsen J, De Palacios P, Gravenstein S, Verstraeten T, Hermans P, & Poolman J. (2021). Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: a systematic literature review. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 72, Issue 7, pp. 1211–1219). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210>
- Bueno Y. (2024). *Caracterización de bacteriófagos con capacidad inhibitoria de bacterias ácido lácticas productoras de aminas biogénicas en cerveza*. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/9861/2/FQMAC-309130.pdf>
- Cea F, Vargas-Aro B, Marín-Cornuy M, Opazo A, & Aguila-Torres P. (2023). Bacterial etiology of eye infections and antibiotic resistance patterns of *Acinetobacter* spp.: a review. In *Revista Mexicana de Oftalmología* (Vol. 97, Issue 2, pp. 55–60). Permanyer Publications.
<https://doi.org/10.5005/RMO-11013-0023>

- Díaz, C. (2020). *Caracterización del resistoma y viruloma de aislados de Pseudomonas aeruginosa de pacientes con fibrosis quística y bronquiectasias*.
<https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/21011/Tesis%20CDR.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Díaz S, Castañeda K, Santa Cruz C, Carrasco F, & Moreno M. (2021). Etiology of urinary infections and prevalence of Escherichia coli, producer of extended spectrum betalactamases and carbapenemases. *REBIOL*, 41(2), 179–186.
<https://doi.org/10.17268/rebiol.2021.41.02.03>
- Domínguez, N. (2020). Bacteriófagos. *Revista de La Facultad de Medicina Humana*, 20(1), 164–165. <https://doi.org/10.25176/rfmh.v20i1.2554>
- Flores P, Garibay P, & Peñaloza G. (2023). Automatización de inoculación en medios de cultivo para el laboratorio de microbiología. *Revista de Ciencias Tecnológicas*, 6(4), e285.
<https://doi.org/10.37636/recit.v6n4e285>
- García M, Parra G, Solís G, Quiñones E, & Enríquez G. (2020). *Aislamiento de un bacteriófago lítico de Leuconostoc mesenteroides, una bacteria deterioradora de embutidos envasados al vacío*. <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad>
- Granda G, & Quilachamin T. (2021). *Aislamiento de bacteriófagos inhibidores del crecimiento de listeria spp con resistencia antimicrobiana*.
<file:///C:/Users/patri/Downloads/TTQ191.pdf>
- Grande, J., & Merchan, S. (2020). Bacteriófagos como agentes de bio- control en los alimentos. *Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander*,.
https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/64313603/2142687_TIP_-_Merchan_Silvia_-_Grande_Julio-libre.pdf?1598831469=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DLab_Bioquimica_Bacteriofagos_como_agente.pdf&E

xpires=1713463454&Signature=XU~FdxDg1fgVDEap1WaWjc46WfKwnK~L-
EbCU6RDB1MJc-
b5Dmn6BY0aYWbgYkFdA40BChVMRWi9Dv8rmB~KKzgvsPdWsQRAEB6Z5GOP3Qqd5GErg
xPY11MxY3fPqWAJo5ikqqb5duFxxue0JrxUPkRv0iGOcr4~EF6jL3CLY-
cPPH0W01XJJS7yXfEorSAKvdADrnkRPaYWuufQp9j3mRY2vFAy~kvpCeTvdxmAGB9mHzp9
e2YGUCiUeX5WDx~hRzejR3xilWFsydM2d~wr~KtzyGO9DzX9GIVYlvKrpilpFDndi5zLil9ZTj~
SFCILN0n28ELudSRBr3TeNFsgA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Hernandez, E. (2019). *Aislamiento de bacteriófagos líticos para Salmonella spp. multidroga resistentes.*

<https://repositorioinstitucional.uabc.mx/server/api/core/bitstreams/f30a9b0e-359c-44d4-95cb-2d588273b609/content>

Hernández, R. (2019). *Aislamiento y caracterización parcial de bacteriófagos de Salmonella spp con potencial aplicación en el biocontrol de superficies.*

https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2019/hdl_10803_667337/rhs1de1.pdf

Hernández-Romano, J., Mastache-Estrada, L., Molina-Sánchez, A., Serrano-Plancarte, R., Peña-Barrera, C., Chávez-Bejar, I., Romero-Martínez, N., & Lecona-Valera, A. (2019). *Estabilidad y capacidad inhibitoria del bacteriófago ϕ rsp, agente potencial para el biocontrol de ralstonia solanacearum.* file:///C:/Users/patri/Downloads/0187-7380-rfm-42-01-13.pdf

Howden, B. P., Giulieri, S. G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., & Stinear, T. P. (2023). Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 21, Issue 6, pp. 380–395). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>

Huaman M. (2021). *Incidencia de contaminación microbiológica en alimentos y bebidas de consumo humano.*

<https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/a81ef858-9fa7-4b11-a152-046c9052b6ad/content>

Jiménez, S., Torres, L., Parra, J., Rodríguez, J., García, F., & Patiño, R. (2020). Profile of antimicrobial resistance in isolates of *Staphylococcus* spp. obtained from bovine milk in Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 121–130.

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>

Kumar, N., Chavan, S., & Vasundhara. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: a persistent pathogen and current approaches to treatment-microbiology. In *Salud, Ciencia y Tecnología* (Vol. 3, pp. 3–4). Editorial Salud, Ciencia y Tecnología. <https://doi.org/10.56294/saludcyt2023404>

Lamas, A. (2022). *Revisión bibliográfica: aplicaciones de los bacteriófagos como agentes antibacterianos en la industria agroalimentaria*.

https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/33385/RodriguezLamas_Alba_TFG_2023.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 44, Issue 6, pp. 655–683). Oxford University Press.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>

López, N., Alvarado, A., & Rodríguez, M. (2020). Vista de uso del fago P22 como alternativa terapéutica en veterinaria para *Salmonella* spp en Colombia. *Facultad de Ciencias de La Salud*, 1, 27–49.

<https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/4856/4571>

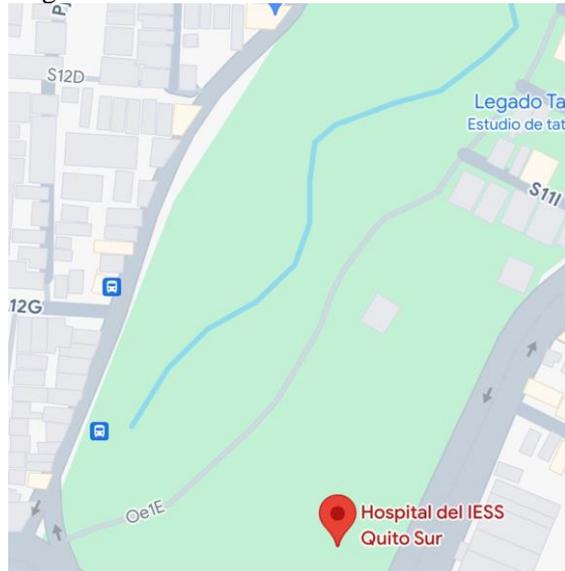
Martínez, Á., Garza, U., Sampedro, M. L., González, J., Nava, G., & Toribio, J. (2020). Pathotypes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in residual water. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 36(4), 2. <https://doi.org/10.20937/RICA.53711>

- Molina, N. B., Oderiz, S., López, M. A., Basualdo, J. Á., & Sparo, M. D. (2023). Caracterización molecular de *Escherichia coli* diarreogénica proveniente de población pediátrica ambulatoria con diarrea, atendida en dos hospitales de Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 56(1), 10–10. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.002>
- Osorio, C. (2019). Artículos de revisión bacteriófagos: aspectos generales y aplicaciones clínicas. In *Hechos Microbiol* (Vol. 6, Issue 2). <http://www.udea.edu.co/hm>
- Pasochova, J., Ramirez, S., & Molina, M. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. 17(32), 26–27. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-25.pdf>
- Paz J. (2023). *Análisis microbiológico de carnes molidas expandidas en el mercado san alfonso de la ciudad de Riobamba*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/20448/1/56T01182.pdf>
- Rodríguez, P. (2020). *La fagoterapia como alternativa terapéutica*. <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/19979/La%20fagoterapia%20como%20alternativa%20terapeutica.pdf?sequence=1>
- Romano, J., Mastache, L., Molina, A., Serrano, R., Peña, C., Chávez, I., Romero, N., & Lecona, N. (2019). Estabilidad y capacidad inhibitoria del bacteriófago ϕ rsp, agente potencial para el biocontrol de *Ralstonia solanacearum*. *Revista Fitotec*, 42(1), 13–19. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v42n1/0187-7380-rfm-42-01-13.pdf>
- Ross, J., Larco, D., Colon, O., Coalson, J., Gaus, D., Taylor, K., & Lee, S. (2020). Evolución de la resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador. *Práctica Familiar Rural*, 5(1). <https://doi.org/10.23936/pfr.v5i1.144>

- Ruiz, T. (2020). *La fagoterapia como alternativa terapéutica*.
<https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/19979/La%20fagoterapia%20como%20alternativa%20terapeutica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Samudio, G., Volkart, K., Marín, M., & Gómez, G. (2023). Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* de la comunidad. Estudio de sensibilidad y tendencias en población pediátrica. Años 2015 a 2020. *Revista Del Instituto de Medicina Tropical*, 18(1), 21–29. <https://doi.org/10.18004/imt/2023.18.1.4>
- Sánchez, J. (2020). *Caracterización fenotípica de bacteriófagos de Pseudomonas aeruginosa multirresistentes (PAMR) aislados de agua de albañal, Provincia Trujillo, La Libertad, 2019*. <https://dspace.unitru.edu.pe/server/api/core/bitstreams/d62ef908-d830-45f8-8df7-6e2406496ca8/content>
- Solano, S., Paz, V., Mordani, S., Martínez, A., Álvarez, D., & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria*. *Revista Chilena Infectol*, 180–189. www.sochinf.cl
- Talavera, J., Reyes, N., Vega, V., & Salgado, C. (2023). Eficacia de los bacteriófagos para el tratamiento de infecciones recalcitrantes: reportes de casos modernos. *Revista de Medicina e Investigación UAEMéx*, 11(2), 64–70.
<https://doi.org/10.36677/medicinainvestigacion.v%vi%i.20910>
- Tirado S. (2023). *Caracterización de bacteriófagos contra Salmonella spp. en codornices (Coturnix coturnix) de producción intensiva*.
http://repositorio.uas.edu.mx/jspui/bitstream/DGB_UAS/424/1/Caracterizaci%3%b3n%20de%20bacteri%3%b3fagos%20contra%20Salmonella%20spp.%20en%20codornices.pdf

6. Anexos

Lugar de toma de muestras



Anexo 1 Muestras de agua residual Río Machángara

Fuente: (Google Maps, 2024)

Filtrado de muestras



Anexo 2 Filtrado de muestras con papel Whatman

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Inhibición bacteriana de *Escherichia coli*



Anexo 3 Resultados de la prueba spot test

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

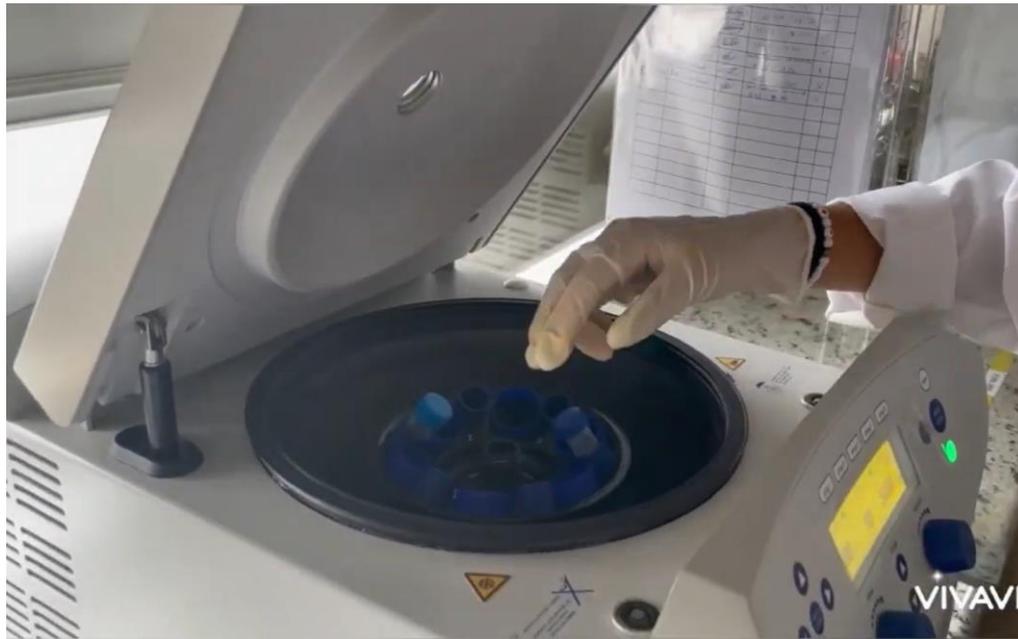
Doble capa agar



Anexo 4 Método de cuantificación

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Centrifugación de muestras



Anexo 5 Centrifugación de muestras de aguas residuales para su etapa de enriquecimiento

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Resultado de la centrifugación



Anexo 6 Muestras centrifugadas con pellet

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Filtración de muestras



Anexo 7 Pretratamiento de muestras con filtro tipo jeringa de 0,22 μ m

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

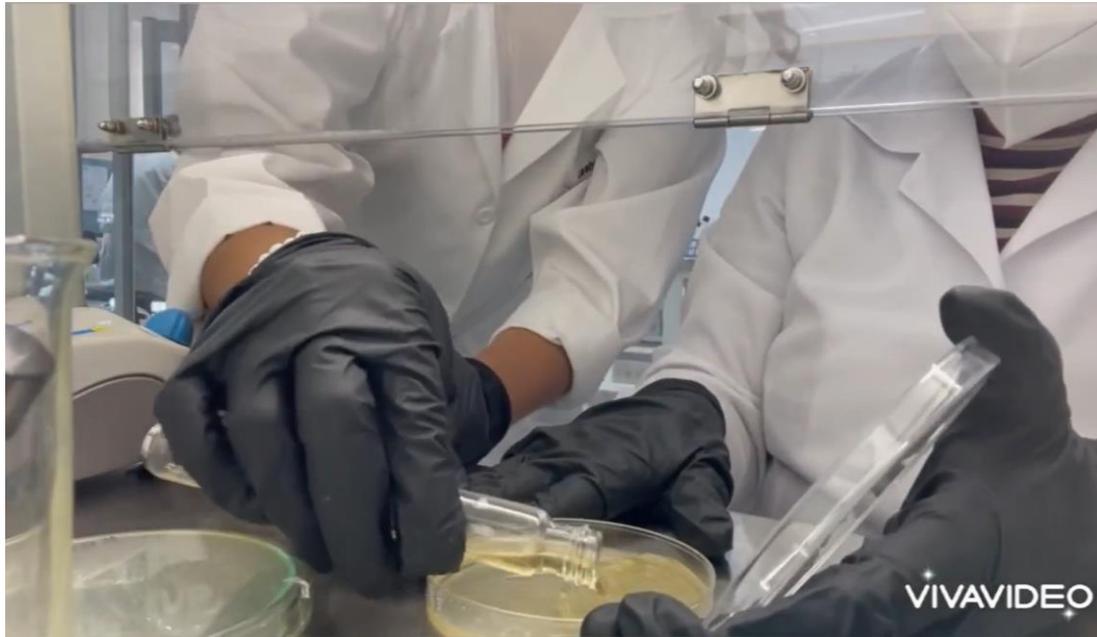
Cultivo de bacterias



Anexo 8 Cultivo de bacterias mediante hisopado para Spot test

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Técnica doble capa agar



Anexo 9 Vertido de la capa superior para la técnica de doble capa agar

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Potenciómetro



Anexo 10 Equipo utilizado para medir el pH de las muestras y realizar la caracterización fenotípica

Elaborado por: (Las autoras, 2024)

Baño María



Anexo 11 Equipo utilizado para ajustar la temperatura establecida a cada muestra para la caracterización fenotípica

Elaborado por: (Las autoras, 2024)