



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico
específico a *Salmonella Typhimurium* procedente de
aguas servidas de la planta de tratamiento “La
Taboada” Lima, Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Abraham José GUILLÉN VÁSQUEZ

ASESOR

Mg. Miguel Angel Francisco TALLEDO RIVERA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Guillén, A. (2023). *Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico específico a Salmonella Typhimurium procedente de aguas servidas de la planta de tratamiento "La Taboada" Lima, Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Abraham José Guillén Vásquez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70835047
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9660-8173
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Miguel Angel Francisco Talledo Rivera
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25625144
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3011-4212
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Enrique Walter Mamani Zapana
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	02414092
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Erasmo Honorio Colona Vallejos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09438212
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Oscar Diego Evangelista Vargas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46626302
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.2.1. Biorremediación y Bioconversión
Grupo de investigación	Biología para la remediación - BIOREM
Agencia de financiamiento	Sin Financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Latitud: -12.05900313440289 Longitud: -77.0823852901887
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2023
URL de disciplinas OCDE	Virología: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.02



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO**

(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 14:00 horas del 5 de octubre del 2023, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/pxx-prxb-rtr>, y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **ABRAHAM JOSÉ GUILLÉN VÁSQUEZ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20230048491, el titulado expuso su tesis: **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO LÍTICO ESPECÍFICO A *Salmonella* Typhimurium PROCEDENTE DE AGUAS SERVIDAS DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO "LA TABOADA" LIMA, PERÚ**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19** calificado: **Aprobado con máximos honores**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **ABRAHAM JOSÉ GUILLÉN VÁSQUEZ** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las 15:40 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 5 de octubre de 2023.

Dr. ENRIQUE WALTER MAMANI ZAPANA
(PRESIDENTE)

Mg. MIGUEL ANGEL FRANCISCO TALLEDO RIVERA
(ASESOR)

Dr. ERASMO HONORIO COLONA VALLEJOS
(MIEMBRO)

Mg. OSCAR DIEGO EVANGELISTA VARGAS
(MIEMBRO)



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo **MIGUEL ANGEL FRANCISCO TALLEDO RIVERA**, en mi condición de asesor de la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología -Facultad de Ciencias Biológicas; acreditado con la Resolución Decanal N° 00092-2023, de la tesis cuyo título es **“Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico específico a Salmonella Typhimurium procedente de aguas servidas de la planta de tratamiento ‘La Taboada’ Lima, Perú”**, presentado por el bachiller **Abraham José GUILLÉN VÁSQUEZ**, para optar el Título Profesional de Biólogo (a) Microbiólogo (a) Parasitólogo (a).

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 17 % de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

MIGUEL ANGEL FRANCISCO

TALLEDO RIVERA

DNI: 25625144



AGRADECIMIENTOS

A mi padre que está en el cielo y a mi madre, por inculcarme los valores adecuados y formarme como la persona que soy; apoyarme en las decisiones que tome, ser un soporte y compañía en toda mi vida.

A mi asesor Mg. Miguel Talledo, por su paciencia y sus enseñanzas durante mi ingreso a su laboratorio hasta la elaboración de este trabajo con su gran experiencia e intelecto. A Katty Zumaeta por ser una guía en mis inicios como ayudante de laboratorio, ser una buena amiga por sus consejos y buen ánimo.

Quiero extender mis más sinceros agradecimientos a mis amigos Claudia Mateo, Esthefany Burgos y Ericson Maza, por su apoyo incondicional y palabras de aliento constante, que han sido de gran valor para mí. Gracias por estar a mi lado durante los momentos desafiantes y por celebrar conmigo cada logro alcanzado. Su amistad ha enriquecido mi vida de una manera indescriptible.

ABREVIATURAS

- MOI Multiplicidad de infección
- BHI Infusión Cerebro Corazón
- UFC Unidad Formadora de Colonia
- UFP Unidad Formadora de Placa
- ATCC American Type Culture Collection
- °C Grado Celsius
- rpm Revoluciones por minuto
- h Horas
- min Minutos
- s Segundos
- cm Centímetro
- nm Nanómetros
- μm Micrómetros
- μL Microlitros
- mL Mililitros

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Bases teóricas	4
2.2.1. Bacteriófagos.....	4
2.2.2. Clasificación de bacteriófagos	6
2.2.3. Ciclos replicativos.....	8
2.2.3.1. Ciclo lítico:.....	9
2.2.3.2. Ciclo lisogénico.....	11
2.2.4. <i>Salmonella</i> sp.....	13
2.2.5. Resistencia a antibióticos	14
2.2.6. Infección por <i>Salmonella</i> Typhimurium	15
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
3.1. Hipótesis.....	16
3.2. Objetivos	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Materiales	17
4.1.1. Material biológico.....	17

4.1.2.	Material de vidrio	17
4.1.3.	Material de plástico.....	17
4.1.4.	Medios de cultivo.....	18
4.1.5.	Reactivos y otros	18
4.1.6.	Equipos	18
4.2.	Métodos	19
4.2.1.	Reactivación de cepas	19
4.2.2.	Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028™	19
4.2.3.	Aislamiento, purificación y titulación de un bacteriófago.....	19
4.2.4.	Propiedades microbiológicas del bacteriófago	21
4.2.5.	Caracterización fisicoquímica del bacteriófago.....	24
4.2.6.	Determinación de la reducción del crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028™ por efecto del bacteriófago lítico.....	25
4.2.7.	Análisis estadístico descriptivo.....	26
5.	RESULTADOS.....	27
5.1.	Curva de crecimiento de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028™	27
5.2.	Aislamiento y purificación de un bacteriófago.....	27
5.3.	Propiedades microbiológicas del bacteriófago	29
5.3.1.	Determinación de la multiplicidad de infección (MOI)	29
5.3.2.	Determinación del rango de hospedero.....	30
5.3.3.	Determinación de la tasa de adsorción	31
5.3.4.	Morfología del bacteriófago	32
5.3.5.	Curva de crecimiento de un paso.....	33

5.4.	Caracterización fisicoquímica del bacteriófago.....	34
5.4.1.	Determinación de la estabilidad térmica.....	34
5.4.2.	Determinación de la estabilidad a diferentes pH.....	35
5.4.3.	Determinación de la sensibilidad al cloroformo.....	36
5.4.4.	Determinación de la sensibilidad a la exposición de la luz UV.....	37
5.5.	Determinación de la reducción del crecimiento bacteriano.....	38
6.	DISCUSIÓN.....	39
7.	CONCLUSIONES.....	47
8.	RECOMENDACIONES.....	48
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
10.	ANEXO.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción general de las familias de fagos. Modificado de Ackermann (2011).

Tabla 2. Determinación de la concentración de fagos a diferentes Multiplicidades de infección.

Tabla 3. Determinación el rango de hospedero del bacteriófago FS01 con diferentes cepas bacterianas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras representativas de fagos con cola. Modificado de Nobrega *et al.* (2018).

Figura 2. Ciclo replicativo (Lítico y Lisogénico) del bacteriófago. Modificado de Campbell (2003).

Figura 3. Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ en caldo BHI durante 10 h a 37 °C.

Figura 4. Se observa que no hay crecimiento bacteriano en la zona donde se colocó la gota proveniente del filtrado de aguas residuales.

Figura 5. Se observa placas de lisis como resultado del método de la doble capa donde se enfrentó el filtrado que contiene fagos y *S. Typhimurium* ATCC® 14028™.

Figura 6. % del bacteriófago FS01 sin adsorber a intervalos de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min.

Figura 7. Micrografía electrónica del bacteriófago FS01, la escala representa 100 nm.

Figura 8. Curva de crecimiento de un paso del bacteriófago FS01 en la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ durante 90 min.

Figura 9. Estabilidad térmica del bacteriófago FS01 a diferentes temperaturas durante 0, 5, 15, 30, 45 y 60 min.

Figura 10. Sensibilidad del bacteriófago FS01 a diferentes pH en el rango de 2 a 13, durante 60 min.

Figura 11. Sensibilidad del bacteriófago FS01 al cloroformo con volumen igual a la suspensión de bacteriófago y el ensayo control, durante 60 min.

Figura 12. Sensibilidad del bacteriófago FS01 a la luz UV durante 60 s.

Figura 13. Reducción de la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ durante 12 h por efecto del bacteriófago FS01.

RESUMEN

La contaminación por *Salmonella* sp. en alimentos es un problema de salud y también económico, esto conlleva al aumento en la resistencia debido al uso de antibióticos para hacer frente a la contaminación por esta bacteria. El conocimiento y estudio de bacteriófagos capaces de infectar a *Salmonella* es crucial para su potencial aplicación como herramienta en su control biológico. El objetivo de este estudio fue aislar un bacteriófago lítico que infectara a *S. Typhimurium*, caracterizar sus propiedades microbiológicas y fisicoquímicas, además de determinar la reducción de la carga bacteriana. El bacteriófago FS01 muestra capacidad lítica, multiplicidad de infección (MOI) de 1, con una tasa de adsorción de 1.9×10^{-9} mL/min. La curva de crecimiento de un paso evidencia un periodo de eclipse de 10 min, un periodo de latencia de 15 min y un tamaño de explosión de 10 partículas virales por célula infectada. El bacteriófago FS01 posee un estrecho rango de hospedero, tiene una cápside icosaédrica de 64.4 nm de diámetro y cola flexible de 182.2 nm de longitud, propio de la familia *Siphoviridae*. Presenta estabilidad térmica de 40 a 60 °C durante 30 min, y su viabilidad disminuye conforme aumenta el tiempo o la temperatura. El fago FS01 es estable a pH en el rango de 6 a 9 y sensible a la exposición al cloroformo durante 60 min. La luz UV reduce la viabilidad a razón de una escala logarítmica cada 15 s. A partir de las 3 hasta las 12 h el fago FS01 reduce los recuentos viables de *S. Typhimurium*. El fago FS01 ha sido aislado y caracterizado mostrando propiedades microbiológicas y fisicoquímicas estables a parámetros necesarios para su aplicación, por el cual se sugiere que podría ser probado para su uso en el biocontrol de *S. Typhimurium*.

Palabras claves: Bacteriófago, *Salmonella* Typhimurium, fago lítico, *Siphoviridae*, caracterización.

ABSTRACT

Food contamination by *Salmonella* sp. is both a health as an economic problem, in addition to this it leads to an increase in resistance due to the use of antibiotics to deal with contamination by this bacterium. The knowledge and study of bacteriophages capable of infecting *Salmonella* are crucial for their potential application as a biocontrol tool. The goal of this study was to isolate a lytic bacteriophage that infects *S. Typhimurium*, characterize its microbiological and physicochemical properties, as well as determine a decrease in bacterial load by the phage. The FS01 bacteriophage shows lytic ability, a multiplicity of infection (MOI) of 1, an adsorption rate of 1.9×10^{-9} mL/min. The one-step growth curve shows an eclipse period of 10 min, a latent period of 15 min, and a burst size of 10 particles per infected cell. FS01 exhibits a narrow host range, the capsid is 64.4 nm in diameter with a flexible tail of 182.2 nm in length, typical of the Siphoviridae family. Phages remain stable for 30 min between 40 and 60 °C. Their viability decreases as time or temperature increases. FS01 is stable at a pH range of 6 to 9 and is sensitive for up to 60 min in chloroform. UV light has detrimental effect on phage viability (of 1 log₁₀ decrease every 15 s). Viable counts of *S. Typhimurium* challenged by FS01 decrease from 3 to 12 h of incubation. The FS01 phage has been isolated and characterized, showing stable microbiological and physicochemical properties at the parameters necessary for its application, which suggests that it could be tested for use in the biocontrol of *S. Typhimurium*.

Keywords: Bacteriophage, *Salmonella* Typhimurium, lytic phage, *Siphoviridae*, characterization.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) es la causa más común de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo, principalmente por medio de huevos y la carne de ave; lo que ha producido el amplio uso de agentes antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella* en animales destinados al consumo humano (Jiu *et al.*, 2020; Bao *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso extensivo o indebido de agentes antimicrobianos para el control de patógenos bacterianos ha promovido en gran medida la aparición de cepas resistentes. Debido a esta situación, la búsqueda de nuevos métodos para combatir infecciones bacterianas como la aplicación de bacteriófagos, ha recibido mayor interés por sus potenciales ventajas, como por ejemplo su especificidad para infectar a una bacteria (Gonçalves-Tenório *et al.*, 2018).

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan específicamente las cepas bacterianas objetivo. Los fagos se pueden encontrar donde exista el huésped bacteriano, eso podría incluir agua dulce y salada, suelo y el cuerpo humano (Walker *et al.*, 2021).

En el caso de la terapia con fagos, se utilizan fagos virulentos o líticos que finalmente conducen a la lisis de la bacteria huésped, siendo reconocidos por su potencial para prevenir o reducir la colonización bacteriana que conduce a enfermedades en el ganado, así como para extender la vida útil de alimentos perecederos (Nair *et al.*, 2018). Si los fagos líticos pueden ser utilizados para combatir bacterias patógenas. ¿Se podrá aislar un fago de aguas residuales con efectos líticos sobre *Salmonella* Typhimurium para su posterior caracterización?

Las ventajas inherentes de los fagos sobre los antibióticos son su abundancia en el medio ambiente y su característica de especificidad hacia las células bacterianas, a diferencia del amplio espectro de los antibióticos. Las aplicaciones de los bacteriófagos se han llevado a cabo en el biocontrol de alimentos contaminados como jamón con

Listeria monocytogenes (Iacumin *et al.*, 2016), salmón ahumado, pollo precocido, lechuga, melón y yogurt con *Shigella sonnei* (Soffer *et al.*, 2017); queso con *Staphylococcus aureus* (El Haddad *et al.*, 2016) y carne con *Salmonella* (Yeh *et al.*, 2017), donde se observaron reducciones significativas en dichas bacterias. Se han empleado fagos (ICP1, ICP2 e ICP3) en conjunto como coctel (ICP) para reducir la colonización de *Vibrio cholerae* en el modelo murino y prevenir la aparición de síntomas de colera en el modelo de conejo (Yen *et al.*, 2017); además se han realizado experimentos para evaluar la eficacia como agente terapéutico del fago lítico vB_KpnP_Bp5 en modelo murino infectado con *Klebsiella pneumoniae* (Zhang *et al.*, 2021).

Esta investigación tiene el fin de aislar y caracterizar un bacteriófago lítico específico para *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El estudio de bacteriófagos contra *Salmonella* sp. tiene amplia data y se ha enfocado en el aislamiento y caracterización de fagos líticos para después evaluar su eficacia para controlar dicha bacteria, como lo reportado por Duc *et al.* (2018), quienes aislaron cinco fagos para su posterior aplicación con muestras de pollo contaminadas con *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, obteniendo resultados significativos en la disminución del recuento bacteriano.

Chen *et al.* (2018) aislaron fagos de aguas residuales, purificaron y determinaron el rango de huésped de fagos que infectaban a *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli*. Los autores concluyeron que los fagos aislados pueden utilizarse como una posible alternativa a los antimicrobianos para reducir infecciones por *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Huang *et al.* (2018) aislaron y caracterizaron un fago proveniente de aguas residuales con el objetivo de evaluar su capacidad para reducir la presencia de *Salmonella* sp. en diferentes matrices alimentarias, tales como la leche, salchicha envasada y lechuga. El fago presentó un tiempo de lisis de 50 min, demostró ser estable en un rango de pH comprendido entre 3 y 7, así como a temperaturas que oscilaron entre 30 °C y 60 °C. Después de un periodo de tratamiento de 6 h, se observó una reducción significativa en la carga bacteriana presente en las mencionadas matrices. De igual manera Xu *et al.* (2018) evaluaron la eficacia del bacteriófago SLMP1 para reducir *S. Typhimurium* en filetes de salmón crudo contaminado y aductores de vieiras, mostrando reducción bacteriana en ambos casos.

Esmael *et al.* (2021) aislaron dos bacteriófagos líticos de amplio espectro que infectan a *Salmonella* Typhimurium. Estos fagos presentaron estabilidad térmica en un rango de temperaturas de 30 °C a 70 °C, además resistencia a pH en el rango de 4 hasta 12. Tras la aplicación conjunta de ambos fagos como un coctel en muestras de pollo, se pudo

evidenciar una reducción en la carga bacteriana de *S. Typhimurium*. Estos hallazgos sustentan la consideración de los autores respecto al coctel de fagos como un agente de biocontrol eficaz en la prevención de la transmisión de *S. Typhimurium* en el ámbito alimentario.

En los últimos años, Sun *et al.* (2022), aislaron y caracterizaron un fago lítico PSDA-2 proveniente de aguas residuales. Con el propósito de evaluar su capacidad para reducir la carga bacteriana en carne de cordero, se realizaron pruebas que revelaron la estabilidad del fago en un rango de pH comprendido entre 3 y 10, así como a temperaturas que oscilaron entre 30 °C y 70 °C. Además, se observó que el fago PSDA-2 permitió una disminución de 1.7 log UFC/mL a una temperatura de 4 °C a una MOI de 100, y de 2.1 log UFC/mL con una MOI de 10000, en el recuento de *S. Typhimurium*. Estos resultados permitieron a los investigadores concluir que el fago PSDA-2 posee un potencial para ser considerado como agente de control en la lucha contra *S. Typhimurium*. Cuyutupa A. (2022), aisló y caracterizó un fago lítico (fago 52) a partir de muestras de intestino de pollo que infecta a *S. Infantis* multidrogo resistente (MDR), presentando estabilidad a temperaturas entre 40 °C a 60 °C y a valores de pH de 3 a 10, por lo que el fago 52 es candidato para utilizar como agente controlador de *S. Infantis* MDR.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan bacterias, ubicuos en ambientes terrestres como en acuáticos, incluso en ambientes extremos (térmicos, hipersalinos, entornos polares), considerados los entes más abundantes presentes en la naturaleza; se estima que en el planeta se encuentre fagos en el orden de 10^{31} (Shapiro & Kushmaro, 2011; Zhan & Chan, 2019). Debido a que atacan bacterias específicas que

se encuentran en diversos hábitats, se sugiere cumplen el rol de ser reguladores de la homeostasis de las comunidades bacterianas (Batinovic *et al.*, 2019).

El material genético de los fagos puede ser ARN o ADN, con una o dos cadenas, que varía en longitud y arreglo (circular o lineal). La gran mayoría de los genomas son ADN de doble cadena (dsADN) seguidos por ADN monocatenario; por el contrario, la diversidad y abundancia de los fagos con genomas de ssARN es mínima comparada al resto (Brüssow & Hendrix 2002; Callanan *et al.*, 2020); el tamaño de los genomas varía de 20 kb (por ejemplo los fagos C2 y Φ 29) hasta 600 kb (por ejemplo un micobacteriófago), el cual codifica para el empaquetamiento y la replicación del material genético, las fibras de la cabeza y cola (en caso presente), la regulación de la transcripción y genes de lisis; conforme aumente el tamaño del genoma, la morfología del fago es más compleja y se interfiere con más actividades celulares (Benler & Koonin, 2021; Hatfull & Hendrix, 2011; Rohwer & Edwards, 2002).

Las cápsides son estructuras proteicas de los fagos, siendo altamente ordenadas para proteger su genoma el cual está estrechamente empaquetado, dependiendo de la composición de las subunidades (pentámera o hexámera), la organización y el número de copias; la cápside puede variar en estabilidad y complejidad (Carmony *et al.*, 2021). Las cápsides icosaédricas y filamentosas son las de mayor frecuencia, los fagos icosaédricos se ensamblan utilizando proteínas o dominios de andamiaje, los cuales ayudan en la formación de una procápside estable, en algunos casos las cápsides se expanden revelando sitios de unión para proteínas los cuales brindan una ventaja física con mayor estabilidad. En el caso de los fagos filamentosos las cápsides se forma anclando proteínas estructurales a la membrana interna del huésped para después ensamblar la cápside en torno del genoma (Asija & Teschke, 2019; Carmody *et al.*, 2021); algunos fagos presentan elementos como una cola contráctil en espiral que presenta proteínas de unión al receptor (RBP) ubicados en el extremo y proteínas de la punta de la cola (TSP) que tienen actividad enzimática degradando los polisacáridos y

lipopolisacáridos, una placa base con fibras que sobresalen permitiendo que se una a receptores específicos en la superficie bacteriana. Cabe mencionar que algunos fagos expresan varios RBP que reconocen varios receptores lo que permite que el fago pueda infectar diversos huéspedes (Sørensen *et al.*, 2021), además pueden presentar envolturas lipídicas; su material genético y su morfología son los factores principales utilizados en la para definir la clasificación taxonómica (Hussain *et al.*, 2021; João *et al.*, 2021).

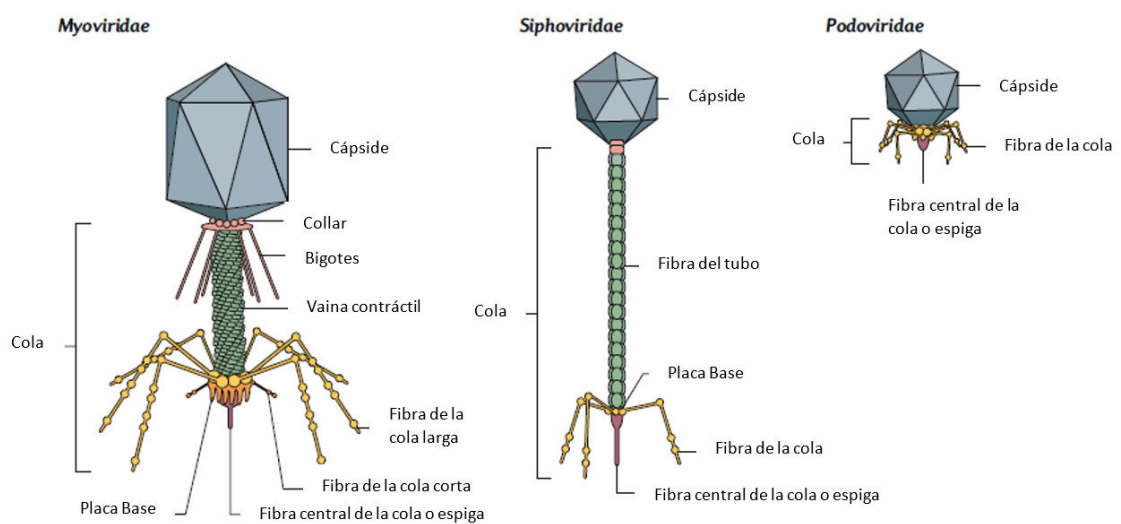


Figura 1. Estructuras representativas de fagos con cola. Modificado de Nobrega *et al.* (2018).

2.2.2. Clasificación de bacteriófagos

La clasificación de fagos ha sido tema de debate a lo largo de los años; se inició con Sir Macfarlane Burnet en 1937 según se observaba la diferencia de tamaño y su actividad frente a agentes fisicoquímicos (Burnet, 1933; Sankaran, 2010); Ruska sugirió una clasificación basada en la estructura según se visualizaba en el microscopio electrónico (Gelderblom & Krüger, 2014; Kruger *et al.*, 2000; Ruska, 1943). En 1948, Holmes clasificó a los virus en tres grandes familias, asignando a los fagos en la familia *Phaginae* (Karthik *et al.*, 2014); Adams realizó una clasificación según criterios morfológicos y serológicos, además propuso que los fagos deberían ser clasificados por

un sistema diferente al ya usados para otros virus (Adams & Wade, 1954); años más tarde en 1966, Lowff propuso que los virus se debían clasificar según sus propiedades de ácidos nucleicos (Lwoff *et al.*, 1966), por su parte Bradley agrupó a los fagos en cinco grupo según su morfología basada en microscopia electrónica, el grupo A presentan cabeza de contorno hexagonal que se le adhiere una cola con vaina contráctil, el grupo B también presente una cabeza de seis lados y una cola flexible, sin apartado contráctil y más largo que la cabeza, el grupo C, que tiene las características del grupo anterior pero la cola es no contráctil y de menor diámetro que la cabeza, el grupo D son fagos que no presentan cola, en el grupo E los fagos presentan un contorno hexagonal regular y simple; además es el único grupo donde el material genético es RNA, el grupo F contiene fagos de forma filamentosa y flexible, sin estructuras adicionales; este sistema fue mejorado por Ackerman y Eisenstark (Ackermann & Eisenstark, 1974, Bradley, 1967). En 1971, el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (ICNV, por sus siglas en inglés) acepta este sistema, pero con modificaciones en los nombres de las familias, dando lugar a las familias *Myoviridae* (cola contráctil), *Podoviridae* (cola corta) y *Siphoviridae* (cola no contráctil y larga) que fueron aceptados por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) en los años 1981 a 1984, además de diez familias como los fagos filamentosos o pleomórficos basada en su tamaño, forma, material genético, presencia de envoltura lipídica. En 1998, Hans-Wolfgang Ackermann unifica todos los fagos con cola en el orden *Caudovirales* representando el 96 % de fagos reportados (Ackermann, 2011; Lavigne *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2002).

Tabla 1. Descripción general de las familias de fagos. Modificado de Ackermann (2011).

Forma	Orden o Familia	Ácido nucleico, partículas, tamaño	Miembros	Número
	<i>Caudovirales</i>	dsDNA (L), sin envoltura		
	<i>Myoviridae</i>	Cola contráctil	T4	1312
	<i>Siphoviridae</i>	Cola larga, no contráctil	λ	3262
	<i>Podoviridae</i>	Cola corta	T7	771
	<i>Microviridae</i>	ssDNA (C), 27 nm	Φ X174	38
	<i>Corticoviridae</i>	dsDNA (C), cápside compleja, lípidos, 63 nm	PM2	3?
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA (L), vesícula lipídica interna, pseudocola, 60 nm	PRD1	19
	<i>Leviviridae</i>	ssRNA (L), 23 nm	MS2	38
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNA (L), segmentado, envoltura lipídica, 70-80 nm	Φ 6	3
	<i>Inoviridae</i>	ssDNA (C), filamentos o varillas, 85-1950 x 7 nm	Fd	66
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA (C), envoltura lipídica, sin cápside, 80 nm	MVL2	5

C: Circular, L: Lineal

2.2.3. Ciclos replicativos

Los fagos pueden presentar dos ciclos de replicación dentro de una célula bacteriana, el ciclo lítico (fagos virulentos) y ciclo lisogénico (fagos templados).

2.2.3.1. Ciclo lítico:

2.2.3.1.1. Adsorción

Esta primera interacción determinará el proceso de infección, la adsorción se da entre la unión específica entre el fago y los receptores de la superficie del huésped (la localización, número y densidad de receptores del huésped afectan la especificidad de la adsorción), en dos etapas adsorción reversible e irreversible. Para bacterias grampositivas los receptores más comunes son los peptidoglicanos y los polisacáridos de la pared celular, junto a otros componentes como ácidos lipoteicoicos y ácidos teicoicos (Li *et al.*, 2016); en el caso de bacterias gramnegativas requieren receptores proteicos, además se puede usar como receptores los pili o el flagelo (Dunne *et al.*, 2018).

2.2.3.1.2. Inyección del ácido nucleico

La estructura proteica de la placa basal cambia lo que genera un poro en la membrana citoplasmática de la bacteria, algunas liasas codificadas por el fago también están involucradas (Stockdale *et al.*, 2013); se produce la inyección del material genético, la vaina se contrae y procede mecanismos de transferencia del ADN o ARN del fago; la cola y la envoltura proteica queda en el exterior de la bacteria (Pires *et al.*, 2016).

2.2.3.1.3. Replicación

Ingresado el material genético comienza la replicación de este, para lo cual deben ocurrir modificaciones (metilación y/o glicosilación) en las bases, a fin de evitar su degradación por las nucleasas de la bacteria; así mismo, se repara el poro de la membrana citoplasmática que se generó al momento de ingreso del material genético (Kozłowska *et al.*, 2017). El ARN polimerasa de la bacteria huésped reconoce los promotores del fago, lo cual permite que la transcripción de los genes tempranos. Se sintetiza el ácido nucleico a partir de los genes tempranos, posteriormente se codifican las proteínas estructurales a partir de genes medios y finalmente se sintetizará las proteínas para la

envoltura (cápside, vaina, fibras), proteínas portales, las subunidades TerS, TerL y la lisozima (que permitirá hidrolizar uniones específicas en el peptidoglicano) a partir de genes tardíos; estos procesos se llevan a cabo utilizando la maquinaria del huésped (Horká *et al.*, 2021; May & Groisman, 2013).

2.2.3.1.4. Ensamblaje

Se lleva a cabo el ensamblaje de las proteínas para formar una partícula viral capaz de infectar a otra bacteria. Las proteínas portales junto con las subunidades TerS y TerL actúan como proteínas motoras impulsadas por ATP que permiten el ingreso del material genético en la cápside preformada, el reconocimiento lo realiza TerS uniéndose al material genético en la secuencia de reconocimiento *pac* o *cos*, después TerS lo transfiere a TerL para su posterior escisión ya que presenta una actividad de nucleasa cortando el material genético largo al tamaño adecuado para la cápside, a pesar de la gran diversidad de fagos, la proteína portal y TerL están codificadas en todos los fagos con cola siendo las proteínas más conservadas, a su vez la cápside se une con las otras estructuras virales (Hayes *et al.*, 2020; Leavitt *et al.*, 2013; Prevelige & Cortines, 2018).

2.2.3.1.5. Lisis

La lisis bacteriana puede ocurrir mediante la acumulación de fagos en el interior de la bacteria huésped o por acción enzimática de holinas y endolisinas, para el caso de bacterias gramnegativas existen tres barreras: la membrana interna, el peptidoglicano y la membrana externa; la holina se acumula en la membrana interna hasta que se activa y provoca que se despolarice y permeabilice, lo que genera poros permitiendo que las endolisinas salgan y pueden generar ruptura en la pared bacteriana; en algunos casos existe una vía alterna donde se utiliza pinholina que genera la formación de pequeños canales heptaméricos, despolimerizando la membrana; para el caso de la ruptura de la membrana externa, se lleva a cabo por medio de un complejo de espanina (o-spanina e i-spanina). Sin este último paso, la progenie de fagos quedaría en la bacteria huésped

muerta (Ramanculov & Young, 2001; Young, 2014). Para algunos fagos que comprenden ssADN y ssARN solo presentan un gen para llevar a cabo la lisis o proteína Sgl, la cual bloquearía la síntesis de la pared bacteriana. Los fagos liberados son considerados fagos maduros capaces de infectar a nuevas bacterias (Chamakura & Young, 2019).

2.2.3.2. Ciclo lisogénico

El ciclo lisogénico difiere del ciclo lítico en que después de la penetración e integración en los extremos del material genético en el huésped para formar un sitio cohesivo (cos), este se integra y mantiene en estado de latencia o también llamado profago, durante este ciclo los genes del profago se reprimen manteniendo su viabilidad (Campbell, 2003, Chen *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2019), en que se deben dar ciertas condiciones para que los fagos pueden realizar lisis en la bacteria huésped para la posterior liberación de viriones, tales como daño en el genoma de la bacteria que contiene el profago por factores ambientales, luz ultravioleta y otros agentes (Nawel, 2022).

Los fagos que realizan este tipo de ciclo son llamados también fagos temperados, pueden continuar replicándose por varias generaciones, esto le permite a la bacteria huésped generar resistencia a ser infectada por otros fagos o tener una reinfección; además, de poder alterar el fenotipo para aumentar la aptitud de la bacteria como, por ejemplo, resistencia a antibióticos, producción de toxinas, esporulación, formación de biopelículas. (Chen *et al.*, 2015; Paul, 2008).

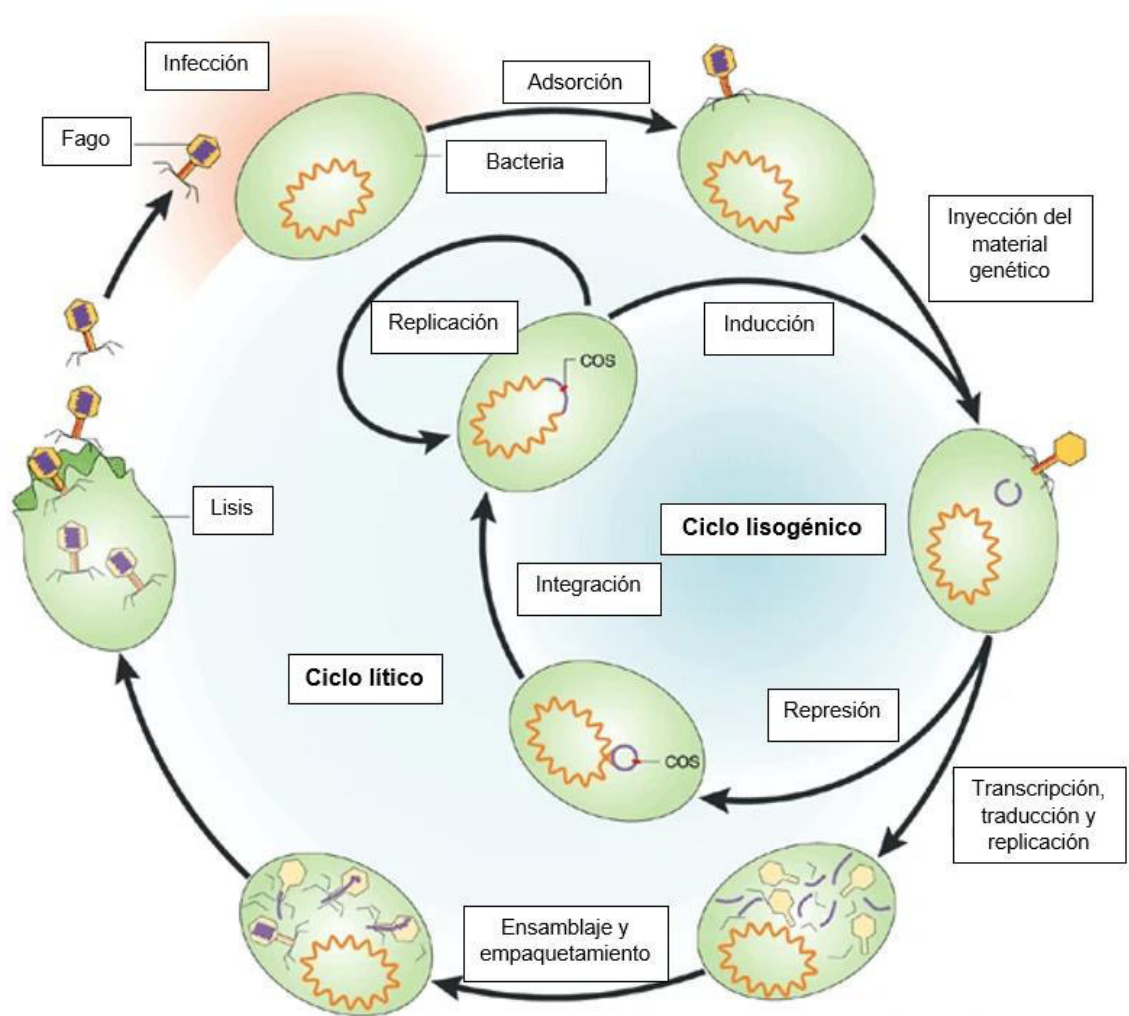


Figura 2. Ciclo replicativo (Lítico y Lisogénico) del bacteriófago. Modificado de Campbell (2003).

2.2.4. *Salmonella* sp.

Son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no esporulados, su tamaño es aproximadamente de 0.8 a 1.5 μm de ancho y de 2 a 5 μm de largo; presenta flagelos peritricos (Gonzalez *et al.*, 2014), pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Encontramos dos especies, *Salmonella enterica* que se divide en seis subespecies y *Salmonella bongori*; la serotipificación de Kauffmann-White divide las subespecies en serovares, mediante la caracterización inmunológica de los antígenos, este esquema se ha ampliado con el transcurrir de los años, por lo que se cuenta con aproximadamente 2500 serovares para el caso de *S. enterica* y para *Salmonella bongori* presenta 22 serovares (Grimont & Weill, 2007; McQuiston *et al.*, 2008; Tindall *et al.*, 2005). *Salmonella* sp. posee un antígeno flagelar (H) y un antígeno somático (O), además pueden presentar otros antígenos como es el caso de *Salmonella* Typhi que tiene el antígeno Vi, que es un polisacárido de superficie. El antígeno H es codificado por el gen *fliC*, que expresa el antígeno H de fase 1 y el gen *fliB*, que expresa la fase 2. El gen *fliC* es homólogo en otras bacterias entéricas, se encuentra en un operón flagelar y está presente en todo el género *Salmonella*, el gen *fliB* es exclusivo de *S. enterica*; ambos genes están regulados de manera coordinada, por lo que solo se expresa un antígeno a través de un mecanismo de variación de fase (McQuiston *et al.*, 2004).

El antígeno O es codificado por los genes *galF* y *gnd*, este antígeno tiene como primer azúcar a *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), algunos serovares presentan el antígeno O con componentes ácidos como el ácido hexurónico (Liu *et al.*, 2014). La expresión del antígeno Vi depende de los loci *viaA*, *viaB* y *ompB*; que contienen los genes necesarios para su síntesis y exportación; este antígeno no es el principal antígeno para desarrollar la enfermedad, pero aumenta la infectividad en *S. Typhi* (Wain *et al.*, 2005).

Las infecciones por *Salmonella* sp. se dan por el consumo de agua y de alimentos contaminados, como carne, mariscos, frutas y huevos; además puede ser transmitida asintomáticamente por animales de sangre caliente, incluyendo animales domésticos y por el contacto de persona a persona o con heces contaminadas (Su & Chiu, 2007; Moffatt *et al.*, 2016). De 10^6 a 10^8 bacterias son requeridas para causar la enfermedad, esto depende del serovar y el estado físico del individuo, el periodo de incubación es de 4 a 72 h después del ingreso de la bacteria, provocando gastroenteritis (Chen *et al.*, 2013), *Salmonella* sp. eleva la respuesta a la tolerancia al ácido (ATR) tolerando el pH ácido del estómago; debido a sus factores de virulencia le permiten mantenerse en el estómago y en el intestino delgado; produce reordenamientos de actina, este proceso es mediado por los genes de invasión (*inv*) y por proteínas efectoras (*Sip* y *Sop*) que interactúan con las células (Do *et al.*, 2017).

2.2.5. Resistencia a antibióticos

Las infecciones causadas por *Salmonella* sp. resistente a antibióticos llevan a una tasa de mortalidad del 1 al 4% a nivel mundial, dos veces mayor a otras cepas. Se ha demostrado la resistencia a fluoroquinolonas adquirida por la mutación en la región determinante de quinolonas (QRDR), además de ser tetrarresistente ASSuT (ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina) y pentarresistente ACSSuT (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina) (Xiang *et al.*, 2020). Dentro de los mecanismos para hacer frente a los antibióticos tenemos a las bombas de expulsión donde participan diez a más genes permitiendo que se elimine los fármacos perdiendo su eficacia (Nishino, 2016), inactivación por enzimas que modifican la estructura de los fármacos, alteración del sitio diana por mutación y modificación (tamaño, selectividad y cantidad) de los canales de porina (Abdi *et al.*, 2017).

2.2.6. Infección por *Salmonella* Typhimurium

Después de la ingesta de alimentos o agua contaminada, *S. Typhimurium* recorre el tracto intestinal y se establece en el intestino grueso con ayuda de sus flagelos y sistemas quimiotácticos para colonizar el epitelio intestinal, donde ocurre la mayor parte de su replicación. El contacto con el epitelio conduce a la activación de los sistemas de secreción de tipo III (T3SSs), permitiéndole la estimulación de respuestas de la célula hospedera y el ingreso de la bacteria por medio de la activación de las GTPasas por parte de las proteínas efectoras de *S. Typhimurium* SopE, SopE2 y SopB conlleva a reordenamiento de citoesqueleto de actina (Galán *et al.*, 2014; Tsolis *et al.*, 2011). En el interior modula el tráfico de vesículas por medio de un segundo T3SSs que es estimulada por condiciones intracelulares como concentración baja de magnesio y pH ácido, de este modo evade las respuestas inmunes y por último se produce la inflamación intestinal por la acción de las proteínas efectoras SopE, SopE2 y SopB (Bruno *et al.*, 2009; Patel & Galán, 2006).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

En aguas servidas de la planta de tratamiento “La Taboada” se encuentran bacteriófagos líticos específicos de *Salmonella* Typhimurium.

3.2. Objetivos

a. Objetivo general:

- Aislar y caracterizar un bacteriófago lítico específico de *Salmonella* Typhimurium a partir de aguas servidas de la planta de tratamiento “La Taboada”, Lima, Perú.

b. Objetivos específicos:

- Aislar un bacteriófago lítico que infecte a *Salmonella* Typhimurium procedente de aguas servidas.
- Establecer las propiedades biológicas del bacteriófago lítico de *Salmonella* Typhimurium.
- Caracterizar fisicoquímicamente el bacteriófago lítico de *Salmonella* Typhimurium.
- Determinar la reducción del crecimiento de *Salmonella* Typhimurium por efecto del bacteriófago lítico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Material biológico

Muestras de aguas residuales provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) “La Taboada”, Lima, Perú. Dichas muestras se recolectaron en frascos de vidrio estériles y fueron transportadas al laboratorio en un cooler con gel pack.

Cepas bacterianas ATCC® pertenecientes a la colección del Laboratorio de Bacteriófagos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM: *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™, *Salmonella* Choleraesuis ATCC® 10708™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Proteus mirabilis* ATCC® 29906™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Shigella dysenteriae* ATCC® 13313™, *Serratia marcescens* ATCC® 43862™, *Klebsiella pneumonia* ATCC® 13883™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 28573™ y *Bacillus cereus* ATCC® 11778™.

4.1.2. Material de vidrio

- Frasco de borosilicato de 1 L
- Pipetas graduadas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Placas de Petri 90 x 14 mm
- Tubo de ensayo de 16 mm x 150 mm

4.1.3. Material de plástico

- Jeringas descartables de 10 mL
- Tubos de centrifuga de polipropileno fondo cónico x 15 mL

- Puntas para micropipeta de 1000 microlitros
- Puntas para micropipeta de 100 microlitros
- Papel Parafilm
- Filtros bacteriológicos de 0,22 micras de porosidad (marca Millipore®)

4.1.4. Medios de cultivo

- Caldo Infusión Cerebro Corazón (marca Millipore®)
- Agar Infusión Cerebro Corazón (marca Millipore®)

4.1.5. Reactivos y otros

- Cloroformo
- Glicerol
- Papel Whatman grado 1
- Gel pack
- Cooler

4.1.6. Equipos

- Balanza electrónica (marca Henkel)
- Centrífuga (marca Thermo Scientific)
- Vórtex Mixer (Globe Scientific)

4.2. Métodos

4.2.1. Reactivación de cepas

Las cepas bacterianas del punto 4.1.1., se reactivaron de viales con Agar Infusión Cerebro Corazón (Agar BHI) en 5 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y se incubaron a 37 °C durante 24 h, para corroborar la pureza de las cepas. Estas fueron sembradas en Agar BHI y se incubaron bajo las mismas condiciones de la reactivación. Las cepas se conservaron en tubos de microcentrifuga con glicerol al 10 % y se conservaron hasta su uso en los ensayos.

4.2.2. Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™

Se incubó la cepa bacteriana en un matraz con 50 mL de caldo BHI durante toda la noche a 37°C. A partir de este cultivo se inoculó 100 µL en un matraz con 100 mL de caldo BHI y se incubó a 37 °C durante 8 h; considerándose este momento como tiempo cero (T_0) y se tomó un mililitro, para realizar diluciones seriadas, sembrar en una placa Petri y verter agar BHI a una temperatura de 45 °C, e incubar a 37 °C por 24 h. Se repitió el procedimiento cada hora, después del tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo en las placas que contenían entre 30 a 300 colonias. Con estos datos se determinó el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) por cada hora.

4.2.3. Aislamiento, purificación y titulación de un bacteriófago

Se recolectó tres muestras de aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas residuales “La Taboada”, ubicada en Lima Metropolitana, se filtraron en papel Whatman grado 1 para eliminar los residuos sólidos, este filtrado fue centrifugado a 4400 rpm por 15 min. Se filtró el sobrenadante con membranas Millipore de 0.45 µm obteniendo un filtrado libre de bacterias.

Luego se realizó la prueba de la gota para la detección cualitativa de bacteriófagos según Segundo *et al.* (2017). Se sembró por diseminación 100 µL de *S. Typhimurium*

ATCC® 14028™ con una espátula de Drigalski en agar BHI y se inoculó 10 µL del filtrado sobre la placa, se incubó a 37 °C por 24 h, la presencia de zonas de aclaramiento evidenció la presencia de bacteriófagos.

El filtrado de bacteriófagos se diluyó en gradiente de 10, 6 veces en solución salina (0.85 %). Luego, se purificó mediante el método de doble capa de agar, se enfrentaron 1 mL de cada dilución y 1 mL de *S. Typhimurium* ATCC® 14028™, se incubaron durante 15 min, y se agregaron 5 mL de medio semisólido BHI (75 %), los cuales se vertieron sobre placas con agar BHI (100%) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Se evidenció la formación de placas de lisis, de las cuales se seleccionó una placa con forma regular, la cual fue recortada con ayuda de un asa de siembra con el aro de nicrom en ángulo recto, depositada en un tubo microcentrífuga de 1,5 mL conteniendo solución salina estéril, se agregó 100 µL de cloroformo y se agitó en vórtex por 1 min. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 min y se filtró con membranas Millipore de 0.45 µm. Se repitió la operación anterior, donde un solo bacteriófago se purificó repetidamente 5 veces para obtener el fago purificado según Ahiwale *et al.* (2013). Para determinar el título del bacteriófago FS01 se realizaron diluciones en gradiente de 10, en solución salina (0.85 %), luego se procedió a realizar la técnica de doble capa de agar como se mencionó anteriormente. Posteriormente se contaron las placas que contenían entre 30 a 300 placas de lisis, este número se multiplicó por la inversa del inóculo y por la inversa del factor de dilución, expresándose en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL).

$$\frac{\text{UFP}}{\text{mL}} = \text{Número de placas de lisis} \times \frac{1}{\text{Inóculo}} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

4.2.4. Propiedades microbiológicas del bacteriófago

4.2.4.1. Determinación de la óptima multiplicidad de infección (MOI)

Para determinar la MOI óptima del bacteriófago denominado FS01, se enfrentó 1 mL de *S. Typhimurium* ATCC® 14028™ a una concentración de 10^8 UFC/mL, y 1 mL de cada suspensión de bacteriófagos a las concentraciones de 10^9 , 10^8 , 10^7 y 10^6 UFP/mL, en un tubo con 8 mL de caldo BHI, obteniendo MOI de 10, 1, 0.1 y 0.01 respectivamente, luego se incubó a 37 °C por 5 h según Li & Zhang (2014). Transcurrido el tiempo de incubación, cada cultivo se centrifugó a 4400 rpm por 15 min y se filtró con membranas Millipore de 0.45 μ m, la concentración de cada prueba se determinó mediante la técnica de doble capa de agar. Cada prueba se realizó por triplicado y la MOI óptima considerada fue la que generó una concentración más alta al final de cada prueba.

4.2.4.2. Determinación del rango de hospedero

El rango de hospedero del fago FS01 se determinó con la prueba de la gota según Segundo *et al.* (2017). Primero, todas las cepas indicadoras se diluyeron a la misma concentración (10^8 UFC/mL), luego 100 μ L de solución diluida de cada cepa indicadora se sembró por diseminación sobre una placa con agar BHI, se dejó secar 10 min. Se procedió a aplicar 20 μ L del fago (2×10^9 UFP/mL) a la placa e incubar a 37 °C durante 24 h.

Las cepas indicadoras fueron:

Salmonella Choleraesuis ATCC® 10708™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Enterobacter aerogenes* ATCC® 13048™, *Proteus vulgaris* ATCC® 6380™, *Proteus mirabilis* ATCC® 29906™, *Enterococcus faecium* ATCC® 35667™, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212™, *Shigella dysenteriae* ATCC® 13313™, *Serratia marcescens* ATCC® 43862™, *Klebsiella pneumonia* ATCC® 13883™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 28573™ y *Bacillus cereus* ATCC® 11778™.

4.2.4.3. Determinación de la constante de tasa de adsorción

Se empleó la metodología según Rahaman *et al.* (2014) y Pereira *et al.* (2016), con modificaciones; un cultivo de bacteriano de *S. Typhimurium* ATCC® 14028™ (10⁸ UFC/mL) se infectó con el bacteriófago FS01 (10⁸ UFP/mL) obteniendo una MOI de 1, incubándose a 37 °C. Se tomaron muestras de 1 mL a diferentes intervalos de tiempo, como 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min, los cuales se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. Los sobrenadantes se filtraron con membranas Millipore de 0.45 µm, y se usaron para hallar el título de cada prueba mediante la técnica de doble capa de agar.

La adsorción se expresó como la disminución porcentual del título de fago en el sobrenadante, en comparación con el tiempo cero, a partir del cual se determinó la constante de adsorción utilizando la fórmula empleada por Flores (2017). Cada ensayo se repitió tres veces de forma independiente.

$$K = \frac{2.3}{Bt} \log \frac{P_0}{P}$$

Donde

K: es la constante de adsorción (mL/min)

B: es la concentración de bacterias

P₀: Título inicial de bacteriófagos no adsorbidos

P: Titulo final de bacteriófagos no adsorbidos

t: Intervalo de tiempo entre P₀ y P.

4.2.4.4. Morfología del bacteriófago

Para la observación morfológica se realizó por el método de tinción negativa según Wong *et al.* (2014), la suspensión del bacteriófago FS01 se mezcló con acetato de uracilo, posteriormente se depositó en una rejilla y se visualizó utilizando el microscopio electrónico de transmisión (TEM) a un voltaje de aceleración de 100 kV y aumento de 120 000 X. Se utilizó las características morfológicas para la clasificación de fagos según las instrucciones de tipificación (Ackermann, 2009). Se obtuvo las imágenes en el microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL JEM-1400 Plus de la Universidad Politécnica de Catalunya, España.

4.2.4.5. Curva de crecimiento de un paso

La curva de un paso del bacteriófago FS01 se realizó según el protocolo de Middelboe *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Una alícuota de 1 mL de la cepa *S. Typhimurium* ATCC® 14028™ en fase logarítmica (10^8 UFC/mL) se colocó en un microtubo de centrifuga de 2 mL junto con 1 mL del bacteriófago FS01 (10^8 UFP/mL), utilizando la multiplicidad de infección (MOI) de 1, se incubó el microtubo de centrifuga a 37 °C por 20 min. Luego se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 10 min, el sobrenadante se descartó y el pellet fue resuspendido con 1 mL de caldo BHI, este procedimiento se realizó 3 veces. Después se resuspendió con 1 mL de caldo BHI y se procedió a homogenizar en un vórtex durante 2 min. Se transfirió 100 µL de este cultivo a un matraz con 100 mL de caldo BHI. Se tomaron 2 muestras de 1 mL cada 5 min desde el inicio ($T_0 = 0$ min) hasta los 90 min. Para determinar el tiempo del periodo latente, la primera muestra de 1 mL se procedió a realizar diluciones seriadas en gradiente de 10, sucesivamente 5 veces en solución salina (0.85 %) para luego determinar el título de cada muestra mediante la técnica de doble capa de agar. La segunda muestra se utilizó para determinar el tiempo del periodo de eclipse, para ello se le agregó 200 µL de cloroformo al microtubo de centrifuga que contenía la muestra, se homogenizó en vórtex durante 1 min, después se centrifugó a 5000 rpm durante 10

min, se transfirió la fase acuosa a otro microtubo de centrifuga estéril y se determinó el título de la misma forma que en la primera muestra.

4.2.5. Caracterización fisicoquímica del bacteriófago

4.2.5.1. Determinación de la estabilidad térmica

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del fago FS01, se realizó de acuerdo con Drulis-Kawa *et al.* (2014). Por tal fin, incubó 1 mL del fago (5×10^9 UFP/mL) en un microtubo de centrifuga, los cuales fueron sometidos a temperaturas de 40, 50, 60, 70 y 80 °C en baño María, durante 5, 15, 30, 45 y 60 min cada temperatura. Cada ensayo se realizó por triplicado. El título de cada suspensión de bacteriófagos a diferentes temperaturas se determinó mediante la técnica de la doble capa de agar.

4.2.5.2. Determinación de la sensibilidad a diferentes pH

Para determinar el efecto de diferentes pH sobre la estabilidad del fago FS01, se realizó de acuerdo con Wang *et al.* (2017). Por tal motivo, 1 mL del bacteriófago (5×10^9 UFP/mL) fue dispensado en tubos de ensayo que contenían 9 mL de solución salina ajustado a diferentes valores de pH, en el rango de 2 a 13, utilizando NaOH 1 M y HCl 1 M, cada muestra se incubó a 37 °C durante 60 min. Cada ensayo se realizó por triplicado. El título de cada suspensión de bacteriófagos a diferentes valores de pH se determinó mediante la técnica de la doble capa de agar.

4.2.5.3. Determinación de la sensibilidad al cloroformo

La determinación de la sensibilidad al cloroformo se realizó de acuerdo con la metodología de Chénard *et al.* (2015) con modificaciones, un volumen de 500 µL del bacteriófago fue dispensado en un microtubo de centrifuga, al cual se le añadió la misma cantidad de cloroformo químicamente puro, manteniéndose en constante agitación a temperatura ambiente durante 60 min. Se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 10 min, la fase acuosa se transfirió a un microtubo de centrifuga y se incubó durante 6 h a

temperatura ambiente para evaporar cualquier cloroformo restante. El control se realizó con el mismo procedimiento al cual se le sustituyó el cloroformo por solución salina (0.85 %). Cada ensayo se realizó por triplicado; el título se determinó mediante la técnica de la doble capa de agar.

4.2.5.4. Determinación de la sensibilidad a la exposición de la luz UV

Se determinó la sensibilidad a la exposición de la luz UV del bacteriófago FS01 de acuerdo con la metodología de Bahador *et al.* (2007) con algunas modificaciones, se inoculó 1 mL del bacteriófago (2×10^8) en una placa Petri, la cual fue expuesta a luz UV de onda corta a una distancia de 20 cm durante 15 s. Asimismo, se repitió el experimento a intervalos de tiempo de 30, 45 y 60 s. Cada ensayo se realizó por triplicado y el título de determinó mediante la técnica de la doble capa de agar.

4.2.6. Determinación de la reducción del crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ por efecto del bacteriófago lítico.

Para determinar la eficiencia en la reducción del crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ se realizó la metodología de Duc *et al.* (2018) con modificaciones. En un matraz con 100 mL de caldo BHI, se inoculó 1 mL de la cepa (1×10^8 UFC/mL) y 1 mL del bacteriófago FS01 (1×10^8 UFP/mL); se realizó un control con la misma concentración de cepa y 1 mL de solución salina (0.85 %). Se incubaron ambos matraces a 37 °C, se tomaron muestras de 1 mL de cada matraz al inicio (0 min) y a intervalos de 1 h, hasta las 12 h que duró el ensayo. Luego se diluyó en gradiente de 10, en solución salina (0.85 %), posteriormente de las 3 últimas diluciones se inoculó 1 mL de cada una de estas en una placa Petri para después incorporarle agar BHI licuado a temperatura de 45 °C. Se dejó solidificar y se incubó a 37 °C durante 24 h, se contaron las placas que presentaron de 30 a 300 colonias. El ensayo se realizó por triplicado.

4.2.7. Análisis estadístico descriptivo

Todos los experimentos se realizarán por triplicado. Los resultados se expresarán como valores promedio y su desviación estándar, mediante el programa Microsoft® Excel. Las tablas de valores se presentan en el anexo correspondiente (Anexo 1 – 8).

5. RESULTADOS

5.1. Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™

En la Figura 3 se muestra los resultados de la curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™, donde se observa que a partir de las 2 hasta las 5 h se encuentra en fase exponencial y que el cultivo bacteriano se encuentra en fase estacionaria a partir de las 6 h, donde se encuentra en su título de 3.0×10^8 UFC/mL.

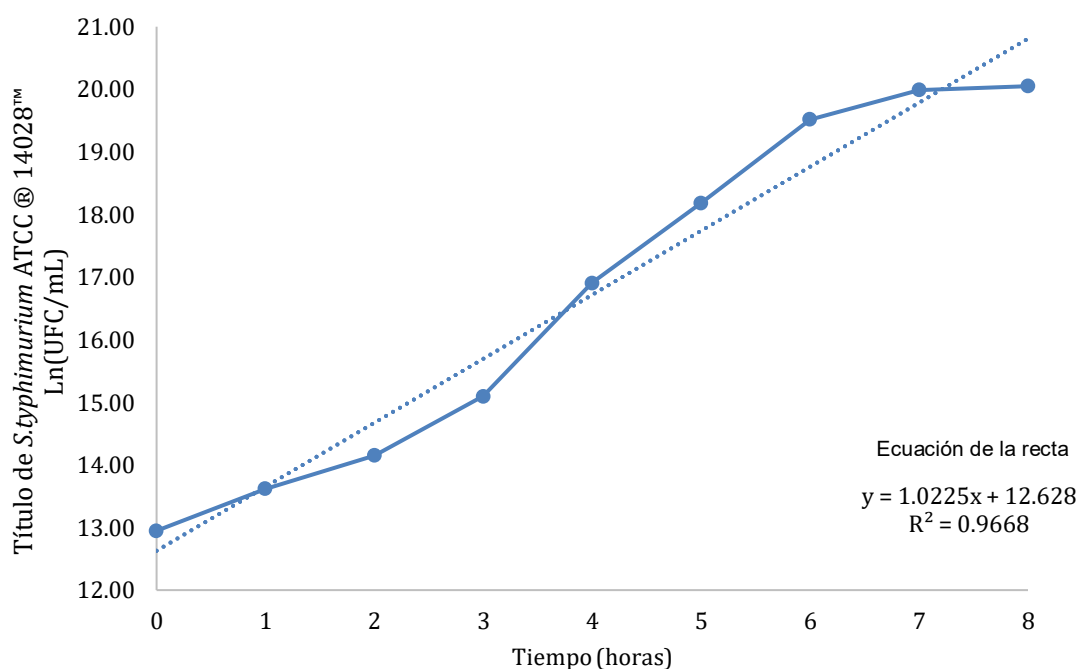


Figura 3. Curva de crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ en caldo BHI a 37 °C durante 8 h.

5.2. Aislamiento y purificación de un bacteriófago

El bacteriófago se aisló mediante la Prueba de goteo utilizando *S. Typhimurium* ATCC® 14028™ como cepa indicadora (Figura 4). Asimismo, se purificó el bacteriófago denominado FS 01 mediante el método de la doble capa, mostrando placas de lisis uniformes, transparente, de forma circular con un diámetro de 0.5 a 1 mm (Figura 5).

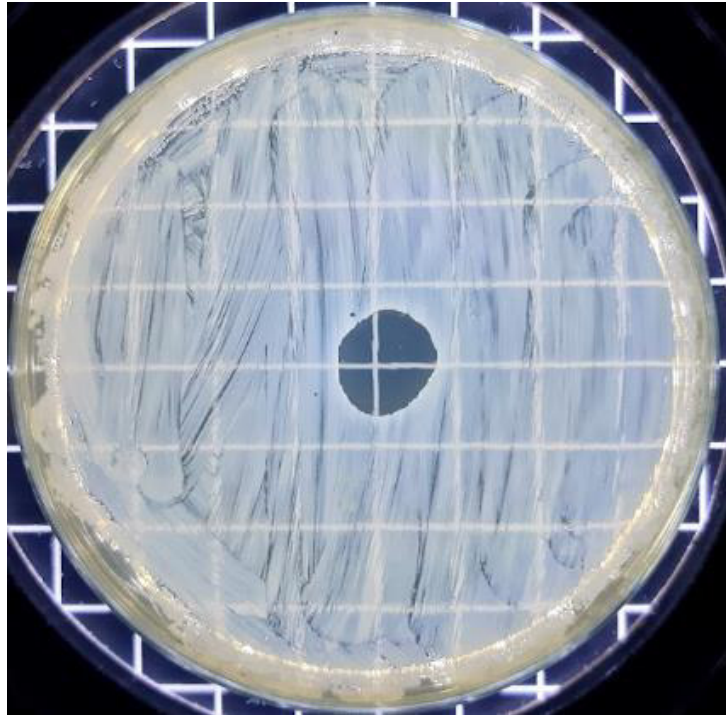


Figura 4. Prueba de goteo. Se observa lisis en la zona del goteo proveniente del filtrado de aguas residuales.

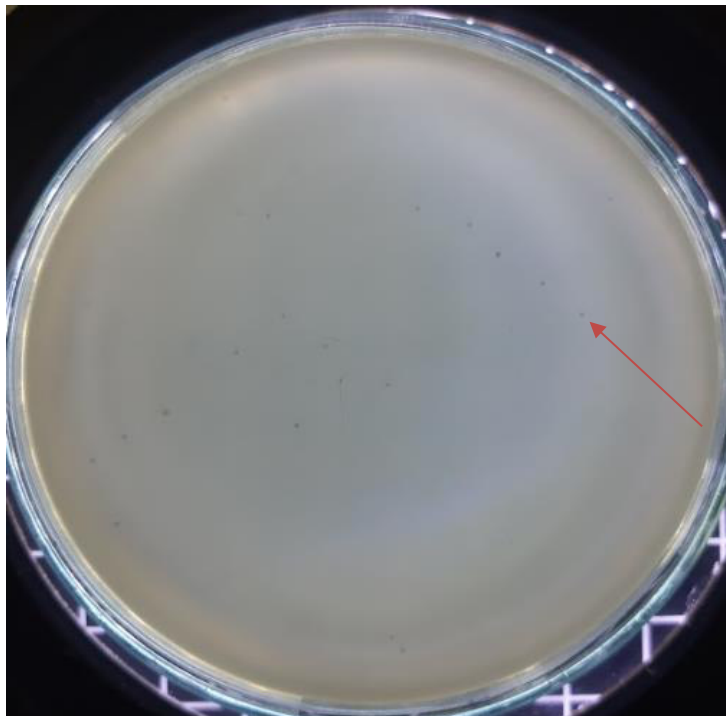


Figura 5. Método de doble capa. Se observan placas líticas proveniente de enfrentamiento del filtrado de aguas residuales y *S. Typhimurium* ATCC® 14028™.

5.3. Propiedades microbiológicas del bacteriófago

5.3.1. Determinación de la multiplicidad de infección (MOI)

En los ensayos por triplicado de los 4 tipos de MOI, *S. Typhimurium* alcanzó la concentración de 10^8 UFC/mL. Se observó aumento de la concentración de partículas virales en la MOI de 1. Esta MOI demostró ser óptima, ya que la concentración del bacteriófago FS01 aumento a $1,1 \times 10^9$ UFP/mL respecto a la MOI de 10 la cual resultó en una disminución en la concentración a $1,5 \times 10^8$ UFP/mL a pesar de que comenzó con un número de 10 veces mayor de virus que la MOI de 1, mientras que en la MOI de 0.1 y 0.01 se observó aumento en la concentración a $5,4 \times 10^8$ y $2,1 \times 10^7$ UFP/mL, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Determinación de la concentración de fagos a diferentes MOI.

MOI	Concentración de fagos (UFP / mL)	Concentración de la bacteria huésped (UFC/ mL)	Concentración de fagos después de 5 h (UFP/ mL)
0.01	3×10^6	10^8	$2,1 \times 10^7$
0.1	3×10^7	10^8	$5,4 \times 10^8$
1	3×10^8	10^8	$1,1 \times 10^9$
10	3×10^9	10^8	$1,5 \times 10^8$

5.3.2. Determinación del rango de hospedero

Se probaron un total de 14 cepas ATCC®, en las cuales solo se observó zonas de lisis en *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™, en las 13 cepas restantes no se observó zonas de lisis mediante la técnica de goteo en placa, por lo que estas cepas son resistentes al bacteriófago FS01 (Tabla 3).

Tabla 3. Determinación el rango de hospedero del bacteriófago FS01 con diferentes cepas bacterianas.

Cepa bacteriana	Lisis
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028™	+
<i>Salmonella</i> Choleraesuis ATCC® 10708™	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922™	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 13048™	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC® 6380™	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 29906™	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC® 35667™	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212™	-
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC® 13313™	-
<i>Serratia marcescens</i> ATCC® 43862™	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC® 13883™	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 9027™	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 28573™	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC® 11778™	-

Lisis positiva: +

Lisis negativa: -

5.3.3. Determinación de la tasa de adsorción

La tasa de adsorción del bacteriófago FS01 fue de 1.9×10^{-9} mL/min. El porcentaje de bacteriófagos sin adsorber fue de 19.85% a los 10 min y disminuyó a 2.86% durante los 20 min (Figura 6).

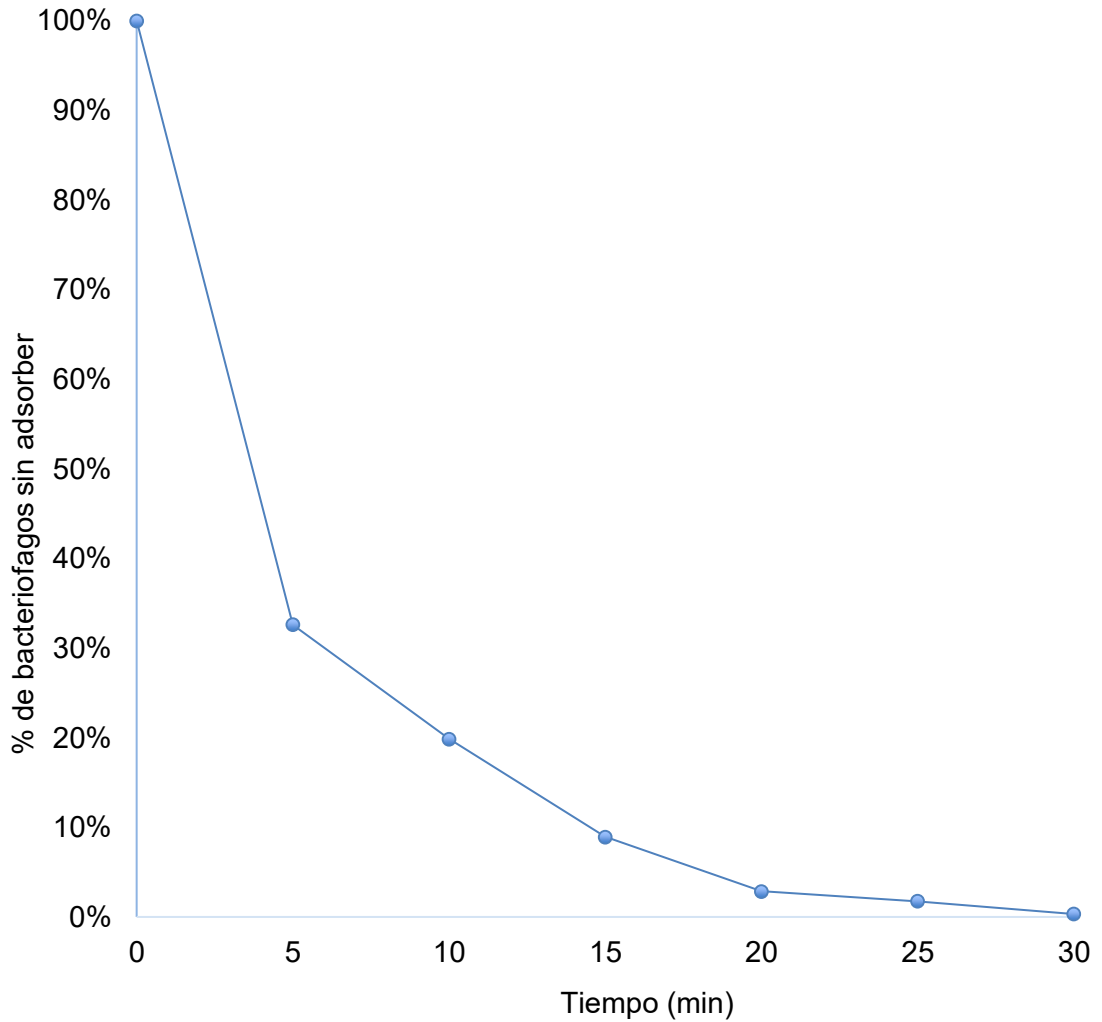


Figura 6. Porcentaje del bacteriófago FS01 sin adsorber a intervalos de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min.

5.3.4. Morfología del bacteriófago

La microscopía electrónica de transmisión reveló que el fago FS01 presenta una cabeza icosaédrica con un diámetro de 64.4 nm, una cola larga y flexible de 182.2 nm de longitud; por lo cual, con estas características el fago FS01 pertenece al orden *Caudovirales* y a la familia *Siphoviridae* (Figura 7).

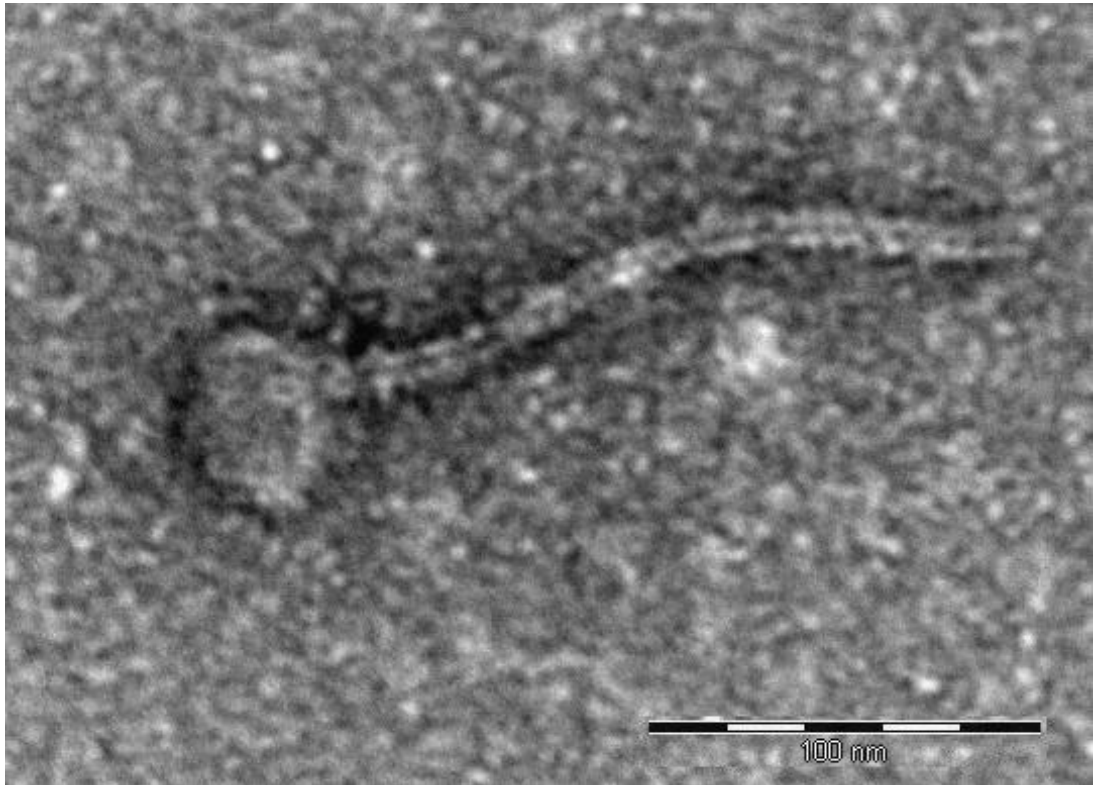


Figura 7. Micrografía electrónica del bacteriófago FS01, la amplificación final de 120,000X, la escala representa 100 nm.

5.3.5. Curva de crecimiento de un paso

En la Figura 8 se observa la curva de crecimiento de un paso del bacteriófago FS01, con la cual se determinó el periodo de eclipse con una duración de 10 min, el de latencia duró 15 min y el tamaño de explosión fue de 10 partículas virales por célula infectada.

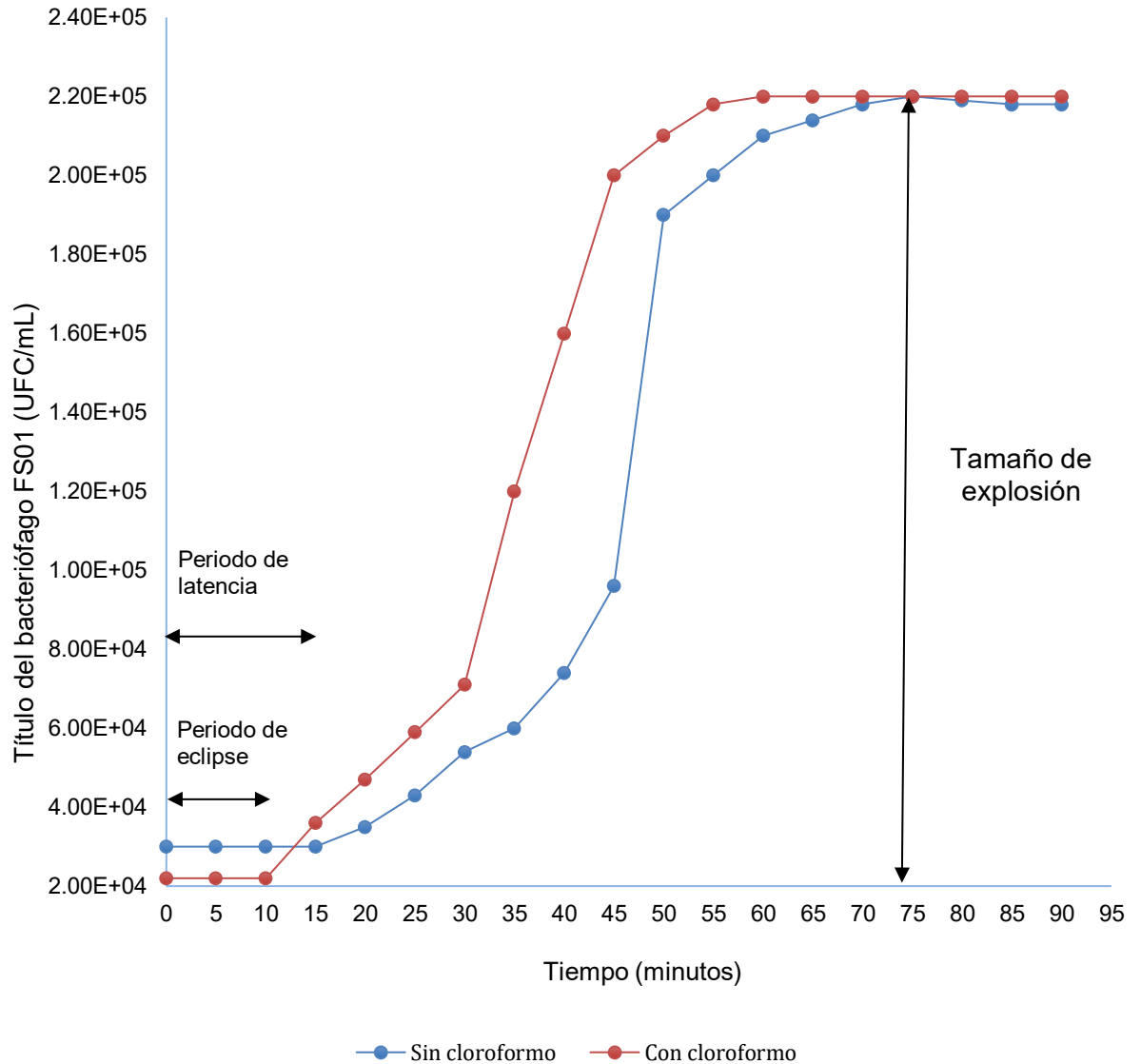


Figura 8. Curva de crecimiento de un paso del bacteriófago FS01 en la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ durante 90 min.

5.4. Caracterización fisicoquímica del bacteriófago

5.4.1. Determinación de la estabilidad térmica

La estabilidad térmica se observa en la Figura 9, dando como resultado que el bacteriófago FS01 se mantiene estable a temperaturas de 40 °C y 50 °C durante los primeros 30 min (1.8×10^8 UFP/mL y 1.5×10^8 UFP/mL, respectivamente), reduciendo su título a 9.9×10^7 UFP/mL y 9.8×10^7 UFP/mL a los 60 min. A 60 °C se reduce a 1.3×10^7 UFP/mL durante los 60 min, en los 70 °C se observa una reducción a 4×10^4 UFP/mL del bacteriófago, siendo inactivo a los 80 °C.

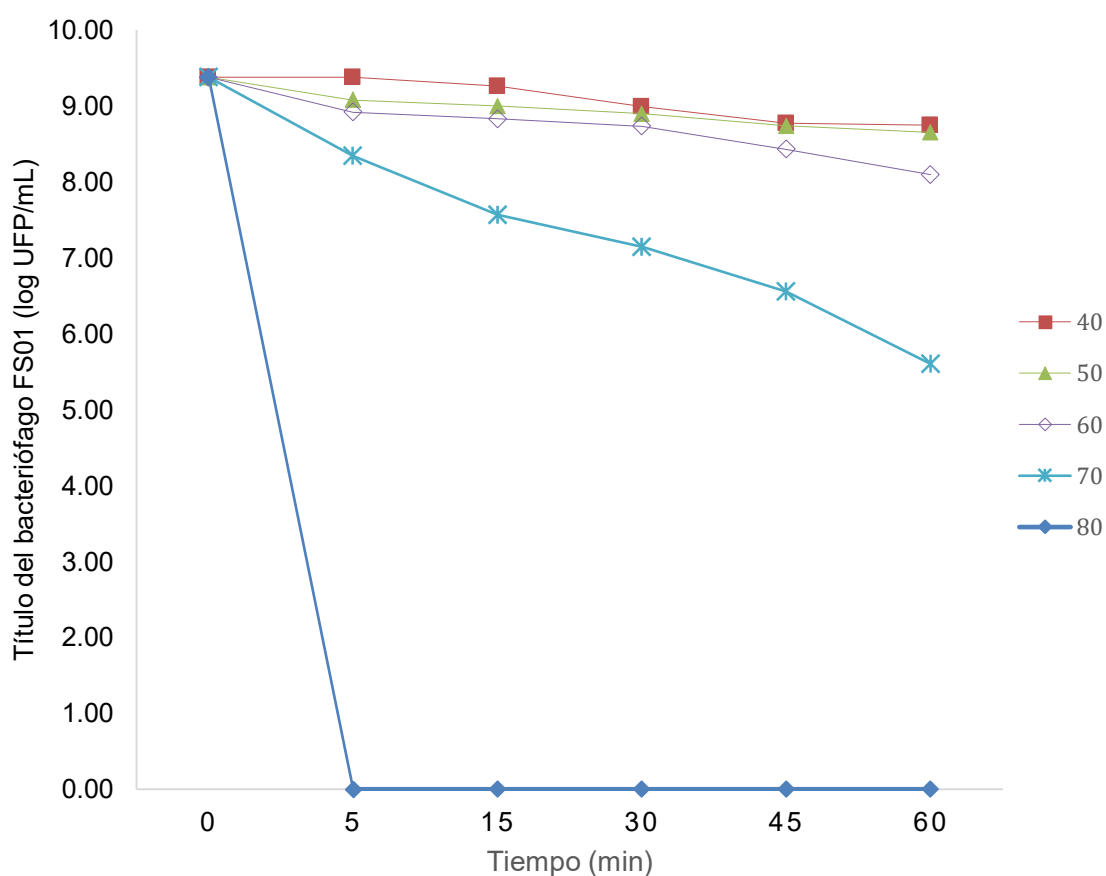


Figura 9. Estabilidad térmica del bacteriófago FS01 a diferentes temperaturas durante 0, 5, 15, 30, 45 y 60 min.

5.4.2. Determinación de la estabilidad a diferentes pH

El bacteriófago FS01 mantuvo su título de 1.7×10^8 UFP/mL a 1×10^8 UFP/mL entre pH de 5 a 9. Los pH ácidos de 2, 3 y 4 afectaron la viabilidad del bacteriófago reduciendo a 1×10^2 UFP/mL, 3.7×10^4 UFP/mL y 8.1×10^5 UFP/mL, respectivamente (Figura 10).

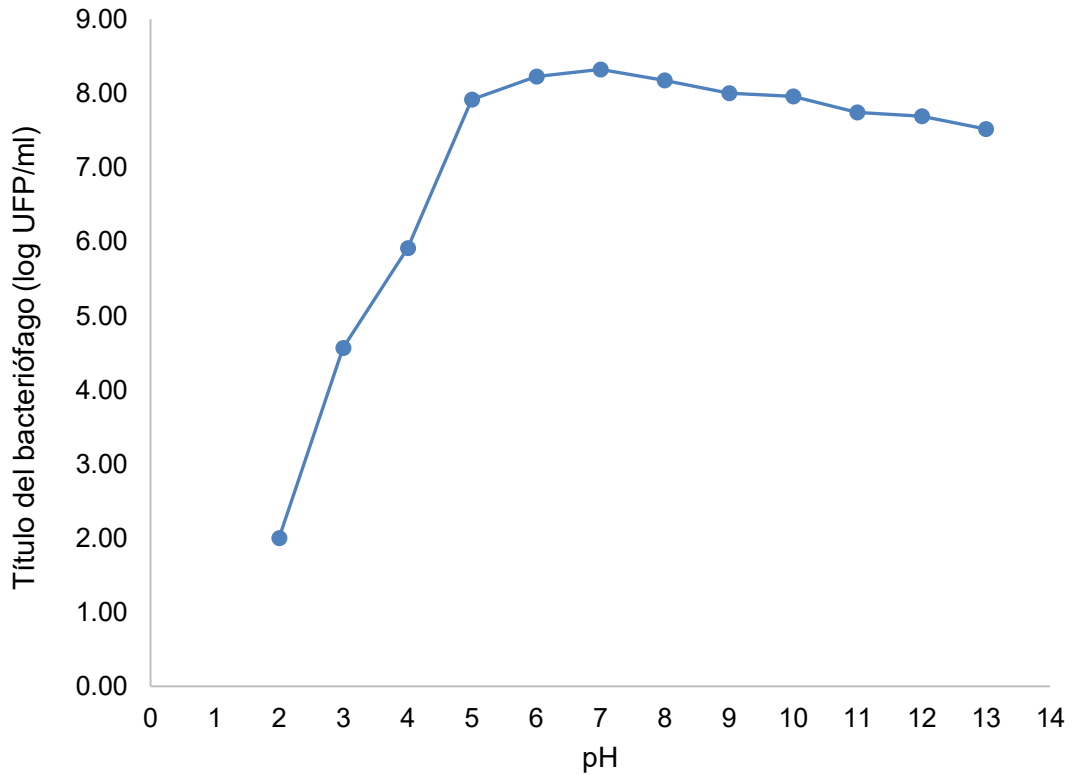


Figura 10. Estabilidad del bacteriófago FS01 a diferentes pH en el rango de 2 a 13, durante 60 min.

5.4.3. Determinación de la sensibilidad al cloroformo

Los resultados ponen en manifiesto que el bacteriófago FS01 expuesto al cloroformo redujo significativamente ($p \leq 0.05$) su título de 6.6×10^9 UFP/mL a 9.1×10^8 UFP/mL (de 9.82 a 8.96 en unidades logarítmicas) durante los 60 min que estuvo expuesta al cloroformo. Se contrasta con el control, en el que se empleó solución salina en lugar de cloroformo (Figura 11).

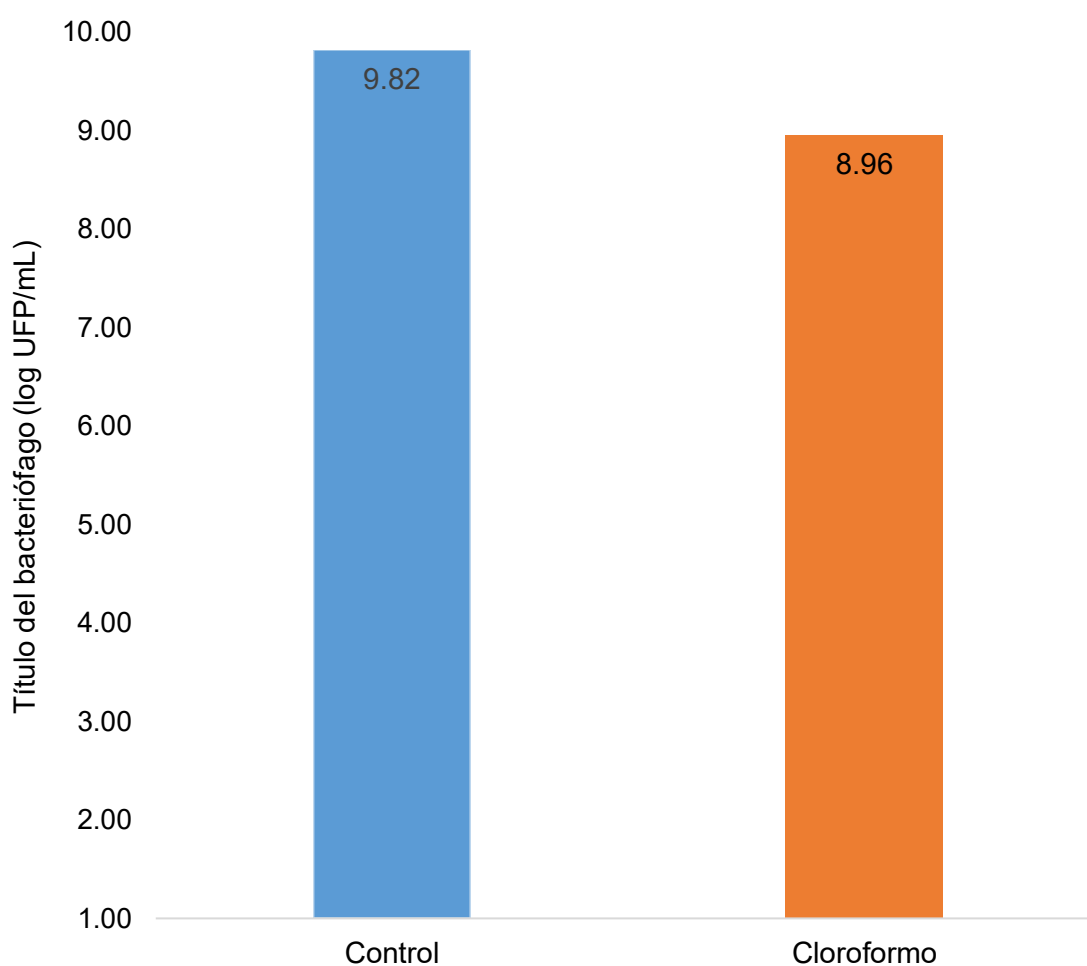


Figura 11. Sensibilidad del bacteriófago FS01 al cloroformo con volumen igual a la suspensión de bacteriófago y el ensayo control, durante 60 min.

5.4.4. Determinación de la sensibilidad a la exposición de la luz UV

Se determinó que el bacteriófago FS01 es sensible a la luz UV. La exposición a la luz UV disminuyó el título del bacteriófago una escala logarítmica cada 15 s, siendo de 2×10^4 UFP/mL a los 60 s después de la exposición comparado al título inicial que fue de 1×10^8 UFP/mL (Figura 12).

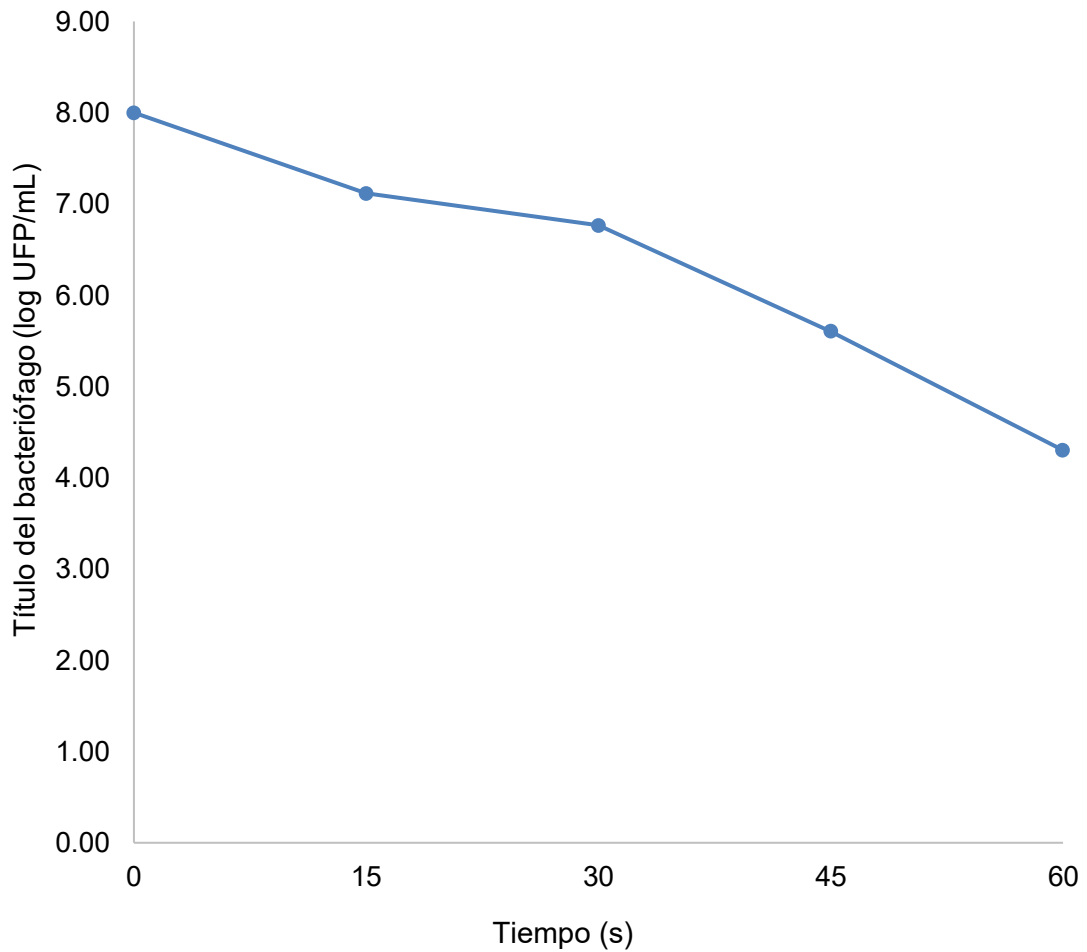


Figura 12. Sensibilidad del bacteriófago FS01 a la luz UV durante 60 s.

5.5. Determinación de la reducción del crecimiento bacteriano

La reducción del crecimiento de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ con el bacteriófago FS01 se observa en la Figura 13, a partir de la hora 3 comienza la reducción en el título de la bacteria hasta la hora 12 por efecto del bacteriófago, donde se observa que el título de la bacteria está en 6.1×10^8 UFC/mL con respecto al control que tiene un título de 3.2×10^9 UFC/mL (sin bacteriófago FS01).

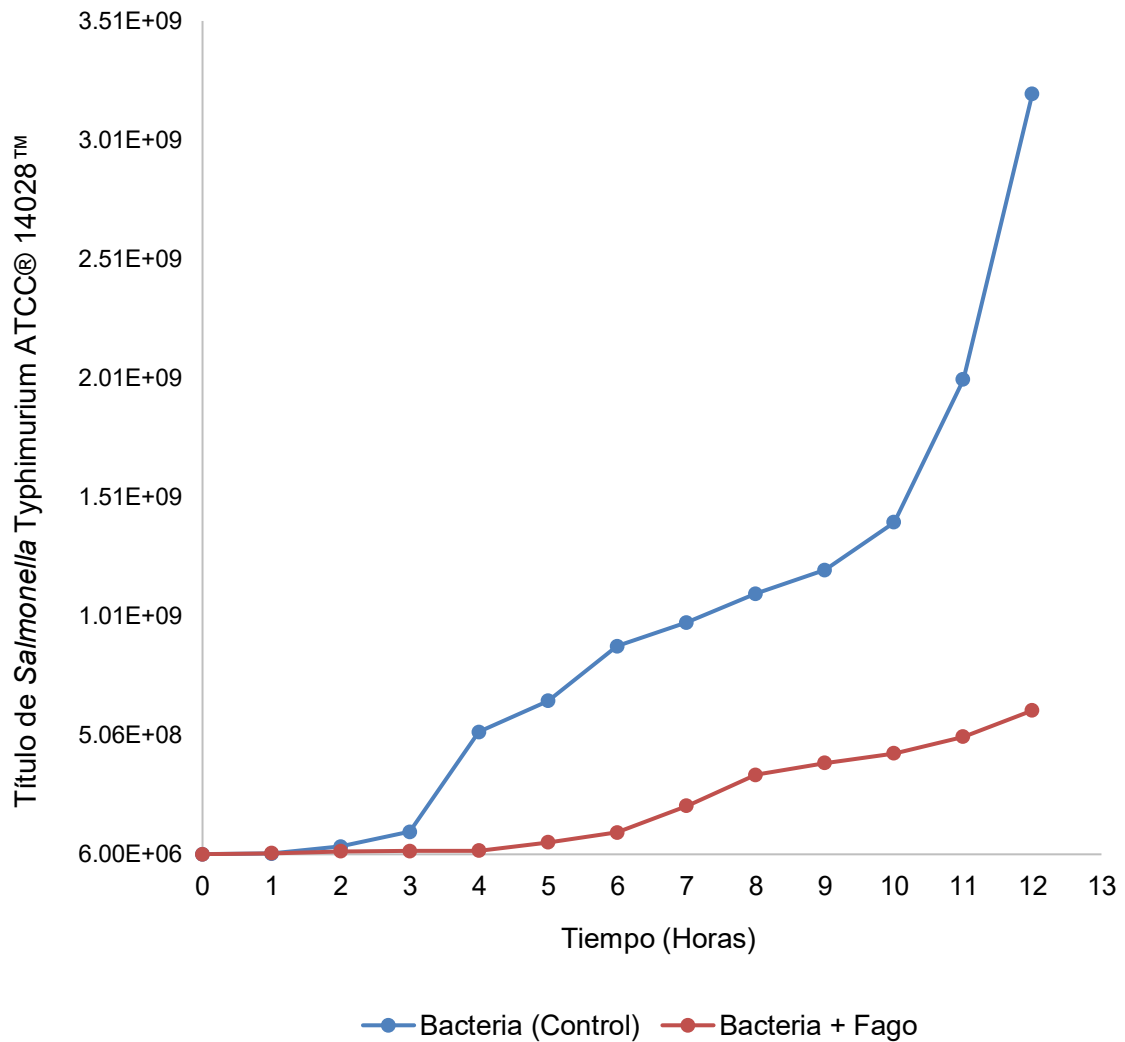


Figura 13. Reducción de la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ durante 12 h por efecto del bacteriófago FS01.

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se describe el aislamiento de un bacteriófago de una planta de tratamiento de aguas residuales con la capacidad de infectar a *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™, observándose su capacidad lítica lo que concuerda con Carey-Smith *et al.* (2006) quienes aislaron bacteriófagos que infectan *S.* Typhimurium PT160, *Salmonella* LT2 y *S.* Infantis a partir de aguas residuales, para ser usado posteriormente como biocontrol de dicha bacteria; Wang *et al.* (2017) aislaron el fago fmb-p1 de aguas residuales de una granja de patos que infecta a la cepa *S.* Typhimurium CMCC50115. Además, Huang *et al.* (2018) aislaron 58 bacteriófagos de *Salmonella* sp. de una planta de tratamiento de aguas residuales, zanjas de granjas de gallineros y cerca de un lago; siendo tres de ellos, LPST10, LPST18 y LPST23 eficientes para infectar *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™. Por estas evidencias, las aguas residuales son una excelente fuente de bacterias asociadas con enfermedad intestinal, como de sus bacteriófagos. El aislamiento de fagos en aguas residuales, generalmente se realiza utilizando cepas bacterianas propias del lugar. Los contaminantes presentes en aguas residuales como metales pesados y químicos tóxicos pueden tener un efecto de inducción de profagos (Liu *et al.* 2021; Salim *et al.* 2022).

Cuando se trata de aplicaciones comerciales, el enfoque se centra en la producción masiva en constante repetición de fagos específicos durante un extenso periodo, para optimizar los procesos de aislamiento y propagación deben ser controladas y estandarizadas, por lo cual la elección de la cepa huésped desempeña un rol importante. Para la propagación del fago también se debe evaluar la capacidad del huésped para alcanzar altas densidades en cortos tiempo además de considerar la estabilidad genéticas del huésped a lo largo de los ensayos, minimizando así la aparición de mutaciones lo que podría disminuir la afinidad del fago a la bacteria o la inducción de profagos (Gill, 2021; Hyman, 2019). El uso de la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ para el aislamiento y posterior propagación del fago,

garantiza la integridad genética y fenotípica de la bacteria; además del bajo riesgo en los ensayos, minimizando los posibles riesgos de contaminación.

El fago FS01 presentó placas de lisis de diámetro de 0.5 a 1 mm, estos diámetros son semejantes a los reportados como el fago Φ st1 que infecta a *S. Typhimurium* y *S. Hadar* produciendo placas claras de 0.5 a 1 mm de diámetro (Wong *et al.*, 2014). Contrariamente, Wang *et al.* (2017) obtuvieron placas de lisis de 2 a 3 mm del fago fmb-p1 al infectar distintos serovares de *Salmonella* sp., esto podría estar relacionado con el tipo de cepa utilizado como huésped, las condiciones de incubación, incluyendo parámetros como la temperatura, tiempo y agitación; además de la capacidad del fago para infectar y lisar las bacterias (Abedon, 2023). Asimismo, los medios utilizados para el cultivo, como la calidad y cantidad de nutrientes; el desarrollo del estado estructural y fisiológico de la bacteria son factores que intervienen en la forma y tamaño de las placas líticas (Fister *et al.* 2016; Amarillas *et al.* 2017).

La multiplicidad de infección (MOI) es la relación entre virus y bacteria siendo la óptima la que permite obtener el mayor incremento de partículas virales tras el enfrentamiento. La MOI de 0.01 y 0.1 incrementaron la concentración de fagos en un orden de magnitud, sin embargo, la MOI de 1 fue la óptima para el fago FS01, aumentando en dos órdenes de magnitud la concentración de partículas virales; resultados similares obtuvo Huang *et al.* (2018), quienes evaluaron al fago LPSE1 a MOI de 1, 10 y 100 contra *S. Enteritidis* ATCC® 13076™ en diferentes alimentos de consumo humano y determinaron que, a una MOI de 1, el fago LPSE1 mostró mejor inhibición de *S. Enteritidis* ATCC® 13076™ en salchicha y lechuga; a diferencia de los resultados obtenidos, Yang *et al.* (2020) obtuvieron una MOI de 0.01 para el fago LPST144 que infecta a *S. Typhimurium* ATCC® 13311™. El fago FS01 a una MOI de 10 se observó una disminución en la concentración de partículas virales, este resultado se debe al fenómeno de lisis desde el exterior, donde la lisis de la bacteria huésped ocurre sin el aumento en el número de fagos (Jung *et al.*, 2017).

La constante de tasa de adsorción es un valor característico, representa la probabilidad de que un solo fago sea adsorbido por una sola bacteria, varía dependiendo de la concentración de fago y bacteria. La probabilidad esta influenciada por factores como la orientación, la energía cinética y la conformación espacial de los fagos y bacterias durante el encuentro (Bull & Gill; 2014); otro factor determinante en este proceso es la colisión aleatoria, la cual sigue una cinética acorde con la ley de acción de masas. A medida que la concentración de fagos aumente en el medio, se produce un incremento en el número de colisiones aleatorias, lo que conlleva a un aumento proporcional en la tasa de adsorción, a menudo se describe utilizando unidades como mL/min o mL/h (Rakhuba *et al.*, 2010; Storms & Sauvageau, 2015). La constante de tasa de adsorción del fago FS01 fue de 1.9×10^{-9} mL/min, este resultado es menor que el reportado por Turner *et al.* (2012) y Flores (2017) quienes hallaron una constante de tasa de adsorción de 6.73×10^{-9} mL/min y 8.5×10^{-8} mL/min respectivamente; los valores mayores a 10^{-9} mL/min son típico de fagos que utilizan receptores con alta representatividad en la superficie bacteriana como polisacáridos, de modo que las colisiones entre fago y bacteria conduzcan a una infección exitosa; en contraste, valores bajos en la constante de adsorción (de 10^{-11} mL/min a menos) son propios de fagos filamentosos que tienen como receptor el pili sexual de la bacteria y fagos que utilizan receptores con baja afinidad o están en menor proporción en la superficie bacteriana (Abedon & Katsaounis, 2018). El porcentaje de adsorción fue de 97.14 % a los 20 min similar a lo encontrado por Flores (2017) donde el fago S6 tuvo el 90% de adsorción a los 20 min, otras investigaciones tuvieron tiempos menores como lo reportado por Rahaman *et al.* (2014), donde el fago SAL-PG obtuvo >95% de adsorción a los 15 min. Los fagos sin adsorber después de los 20 min se debe a la heterogeneidad de fagos, la cual es una parte de la población de fagos que presenta tasas de adsorción más lentas o no se adsorbe, considerada la parte residual, que aparentemente presentan un defecto dificultándose su capacidad de adsorción; se ha llegado a

confirmar que al aislar los fagos residuales e infectando a bacterias en buen estado fisiológico, se observa que la cinética de adsorción es significativamente más lenta (Storms *et al.*, 2014); también se considera la heterogeneidad bacteriana, dado que las variaciones de tamaño de las bacterias pueden influir en la infección por parte del fago, por lo que las bacterias a punto de dividirse tenga más probabilidad de interaccionar con un fago comparado a una bacteria que acaba de dividirse. Se sabe que los fagos pueden mejorar su tasa de adsorción por diferentes cofactores tales como cationes monovalentes de sodio o potasio, cationes divalentes de iones de calcio ya que permite mejorar la transferencia del material genético del fago en la bacteria (Abedon, 2023; Paunikar *et al.* 2012).

La curva de un paso explica las etapas en la replicación de fagos. El periodo de eclipse indica el tiempo entre la infección y la replicación del fago dentro de la bacteria huésped. Respecto al periodo de eclipse el fago FS01 presentó un tiempo de 10 min, resultados que se relacionan con Choi *et al.* (2020) y Yan *et al.* (2020) quienes reportaron periodos de eclipse de 10 min para el fago KFS-ST que infecta a *S. Typhimurium* y para el fago LPSEYT respectivamente. No obstante, Turner *et al.* (2012) determinaron para el fago vB_SenS-Ent1 de *Salmonella* sp. un periodo de eclipse de 20 min.

El periodo de latencia, definido como el intervalo de tiempo que transcurre entre la infección hasta la liberación del primer fago de la bacteria huésped, referente al periodo de latencia del fago FS01 presenta un tiempo de 15 min. De manera similar, en el trabajo realizado por Petsong *et al.* (2019), reportaron periodos de latencia para el fago KP4 en *S. Typhimurium* y para el fago KP5 en *S. Enteritidis* de 15 min para ambos fagos. No obstante, otros estudios reportan variaciones en el tiempo del periodo de latencia, como el caso de Islam *et al.* (2020), Sun *et al.* (2022) y Cuyutupa (2022), donde el fago LPST153, el fago PSDA-2 y el fago 52 tienen un período de latencia de 10 min respectivamente; otros estudios obtuvieron valores diferentes en el periodo de latencia, como en el caso de Park *et al.* (2012) obtuvieron con el fago

SFP10 un periodo de latencia de 25 min, Bao *et al.* (2011) determinaron periodos de latencia de 20 min para los fagos PSPu-95 y PSPu-4-116.

En el caso del fago FS01, se determinó que su tamaño de explosión fue de 10 partículas virales por célula infectada. Se han reportado tamaño de explosión diferentes, como el fago TYM101, el cual presenta un tamaño de explosión de 17 partículas virales por célula infectada (Abhisingha *et al.* 2020). Yang *et al.* 2020 calcularon un tamaño de explosión de 62 partículas virales por célula infectada para el fago LPST144 y Duc *et al.* 2020 reportó el fago PS5 con 204 partículas virales por célula infectada, Bardina (2012) realizó una comparación de los tamaños de explosión de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 en *S. Typhimurium* ATCC® 14028™ con valores de 95 y 55 partículas virales por célula infectada, y en *S. Enteritidis* LK5 los valores fueron reducidos en 3,6 y 5 partículas virales por célula infectada, respectivamente. Los resultados en la curva de un paso muestran que estos resultados dependen del fago y del estado fisiológico de la bacteria hospedera, así como las condiciones de crecimiento como nutrientes en el medio de cultivo y temperatura de incubación (García & Porras 2018; Middelboe 2000).

El fago FS01 posee un rango de hospedero muy estrecho, ya que solo fue sensible a *S. Typhimurium*. Este resultado es diferente a otros estudios reportados por Huang *et al.* (2018), donde los rangos de hospedero para los fagos LPST10, LPST18 y LPST23 fue para diferentes serovares como *S. Paratyphi* B, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*; de igual manera reportaron Yan *et al.* (2020) para los fagos LPSEH, LPSEO, LPSER, LPSEX y LPSEYT, los cuales infectaban a *S. Enteritidis* ATCC® 13076™, *S. Typhimurium* ATCC® 14028™ y *S. Typhimurium* ATCC® 13311™. Los bacteriófagos con un estrecho rango de hospedero no son apropiados para su uso en fagoterapia, ya que la bacteria huésped podría desarrollar resistencia al fago (Vinod *et al.*, 2006), no obstante, el fago FS01 debe ser enfrentado contra otros serovares de *Salmonella* sp. para determinar su rango de hospedero real.

Los bacteriófagos que pertenecen al orden *Caudovirales* se caracterizan por presentar cola y ADN de doble hebra, sus miembros se agrupan en tres familias, siendo la más común la familia *Siphoviridae* que presentan colas largas, no contráctiles y flexibles, los más representativos son el fago λ , el fago SPP1 y el fago T5 (Doval, 2013). El fago FS01 pertenece a la familia *Siphoviridae* por las características morfológicas de la cola con una longitud de 182.2 nm y 64.4 nm de diámetro de la cabeza, Wang *et al.* (2017) caracterizaron el fago fmb-p1 perteneciente a esta familia con diámetro en la cabeza de 57.2 nm y longitud de cola de 171,2 nm, por otro lado, Jung *et al.* (2017) caracterizaron fagos que pertenecen a la familia *Siphoviridae* con tamaño de cabeza de 45 a 66 nm y colas largas de 94 a 186 nm.

El fago FS01 es estable entre 40 °C a 60 °C hasta los 30 min, disminuyendo su viabilidad hasta llegar a los 60 min, Thung *et al.* (2019) obtuvieron una reducción de la concentración del fago ST02 a 50 °C durante 60 min. A los 70 °C se observa una disminución a partir de los 5 min; al llegar a los 30 min, la concentración del fago FS01 disminuyó en 2.21 log, Jung *et al.* (2017) reportaron una disminución similar en 30 min a 70 °C con el fago PBST35. A partir de los 5 min a 80 °C se pierde la viabilidad total del fago FS01, de igual manera Huang *et al.* (2018) no detectaron al fago LPSE1 al calentarlo a 80 °C durante 60 min. Las reducciones del número de fagos pueden explicarse por la desnaturalización de las proteínas y material genético, ya que las altas temperaturas rompen los enlaces de hidrógeno de las proteínas ocasionando daños en su estructura y función, además de romper los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases del material genético (García & Porras, 2018).

El fago FS01 mostró ser estable en un rango de pH comprendido entre 6 a 9, mientras que en rangos básicos de 10 hasta 13, se registró una reducción en una escala logarítmica, lo que indica una tolerancia aceptable dentro de este intervalo. Sin embargo, a medida que el pH disminuye su valor, siendo ácido, se observó una

progresiva disminución en su viabilidad, llegando a reducirse hasta seis escalas logarítmicas a pH 2. Estos resultados concuerdan parcialmente con los hallazgos de Jung *et al.* (2017), quienes también encontraron que los bacteriófagos de *S. Typhimurium* se mantenían estables en un rango de pH de 4 a 11. Por otro lado, Albino *et al.* (2014) expusieron bacteriófagos a un pH entre 2 y 4, lo que resultó en una mayor sensibilidad en esos rangos y una menor tolerancia específicamente al pH 2, lo que confirma la disminución en el título del fago FS01.

El cloroformo ha sido utilizado para evaluar la sensibilidad y el efecto sobre la viabilidad en el estudio de fagos. Se ha demostrado que este compuesto químico puede inactivar o reducir el título de un grupo de fagos. El fago FS01 mostró ser susceptible con reducción de viabilidad de hasta 40%, resultado que concuerda con la mayoría de los reportes respecto al cloroformo como el caso del fago S6, el cual redujo su título al 15 % (Flores, 2017); esta reducción también ha sido reportada para fagos de otras especies de bacteria, Ateba & Akindolire (2019) reportaron la reducción del 40 % del título del fago V8 que infecta a *Escherichia coli* O157:H7, Alegre (2018) reportó la reducción de una escala logarítmica en el título del fago ASCF1 que infecta a *Listeria monocytogenes*; es probable que esto se deba a la presencia de lípidos en la estructura viral. Por otro lado, se ha encontrado algunos fagos como el Φ GF1, presentan resistencia al cloroformo, lo que sugiere la ausencia de lípidos en su estructura (Punil, 2017). No obstante, se sabe que aproximadamente el 30% de los miembros del orden Caudovirales (fagos con cola) son sensibles al cloroformo, aunque no presenten un importante porcentaje de lípidos en su estructura, además fagos no envueltos que pertenecen a las familias *Plasmaviridae*, *Inoviridae*, *Corticoviridae* son susceptibles al cloroformo (Conceição-Neto *et al.* 2015; Hyman, 2019).

La luz ultravioleta (UV) induce daño a los genomas de fagos, rompiendo enlaces y formando lesiones fotodiméricas en los ácidos nucleicos, además provoca daño a otros componentes (Cho *et al.* 2005). La susceptibilidad de un fago a este tipo de radiación viene dada por la combinación de factores, como tamaño, tipo de virión y el tipo de ácido nucleico (Sommer *et al.* 2001). El fago FS01 mostró alta sensibilidad a la exposición de luz UV reduciendo 4 escalas logarítmicas en 1 min, este resultado es diferente a lo reportado en otros fagos resistentes a la luz UV como el caso del fago MS2, Φ X174 y PR772 (Misstear & Gill, 2012).

La infección del fago FS01 a *S. Typhimurium* ATCC® 14028™ se monitoreó durante 12 h, a partir de las 3 h se observó reducción del crecimiento bacteriano en un orden hasta las 12 h. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Yan *et al.* (2020), para el fago LPSEYT observando mayores efectos inhibidores hasta las 9 h contra *S. Typhimurium*; además Islam *et al.* (2020) reportaron la capacidad lítica del fago LPST94 para reducir el crecimiento de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en medio de caldo de triptona de soja. Por otro lado, Kim *et al.* (2014) realizaron un estudio con un coctel, conformado por dos fagos SSU5 y SSU14. Mientras el fago SSU5 no inhibió el crecimiento bacteriano, el fago SSU14 sí logró inhibirlo. Sin embargo, el fago SSU5 infectó a mutantes de *Salmonella* que habían generado resistencia al fago SSU14. Cuando se usó el coctel se retrasó la aparición y crecimiento bacteriano hasta las 7 h.

7. CONCLUSIONES

- Se aisló al bacteriófago lítico FS01 de *Salmonella* Typhimurium ATCC® 14028™ a partir de aguas servidas de la planta de tratamiento “La Taboada”.
- El bacteriófago FS01 presentó una multiplicidad de infección (MOI) óptima de 1, un rango de hospedero muy estrecho y una tasa de adsorción de $1,9 \times 10^{-9}$ mL/min.
- Según las características morfológicas del bacteriófago FS01 pertenece a la familia *Siphoviridae*, con un periodo de eclipse de 10 min, una latencia de 15 min y un tamaño de explosión de 10 partículas virales por célula infectada. Además, se mantiene estable entre 40 °C y 50 °C durante 15 min y a un pH básico, siendo sensible al cloroformo.
- El bacteriófago FS01 es capaz de reducir las poblaciones de *Salmonella* Typhimurium entre 3 a 12 h después de la infección.

8. RECOMENDACIONES

- La caracterización molecular del bacteriófago FS01 para determinar el tipo y tamaño de material genético.
- Secuenciación del genoma del fago FS01 para determinar si hay genes de lisogenia, resistencia o de toxinas.
- La evaluación de la capacidad lítica en conjunto a otros fagos específicos (en un coctel) para reducir el crecimiento bacteriano.
- Se aconseja la ampliación de los ensayos de rango de hospedero mediante la inclusión de diversas cepas bacterianas.
- Se sugiere la evaluación de la capacidad de infección en productos alimenticios contaminado con *S. Typhimurium*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDON, S. T. Bacteriophage adsorption: likelihood of virion encounter with bacteria and other factors affecting rates. *Antibiotics*. (En línea) 2023, vol. 12, nº 4, p. 723.
- ABEDON, S. T., & KATSAOUNIS, T. I. Basic phage mathematics. *Bacteriophages: Methods and Protocols*. (En línea) 2018, vol. 3, p. 3-30.
- ABDI, R. D., MENGSTIE F., BEYI A., BEYENE T., WAKTOLE H., MAMMO B., AYANA D., ABUNNA F. Determination of the sources and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolated from the poultry industry in Southern Ethiopia. *BMC infectious diseases*, (En línea) 2017, vol. 17, nº 1, p. 1-12. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s12879-017-2437-2>>.
- ABHISINGHA, M., DUMNIL, J., PITAKSUTHEEPONG, C. Efficiency of phage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium on chicken meat during low temperature storage. *LWT*, (En línea) 2020, vol. 129, p. 109580. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109580>>.
- ACKERMANN, H., EISENSTARK, A. The present state of phage taxonomy. *Intervirology*, (En línea) 1974, vol. 3, nº 4, p. 201-219. Disponible en: <<https://doi.org/10.1159/000149758>>.
- ACKERMANN, H. Phage classification and characterization. En *Bacteriophages*. Humana press, (En línea) 2009. p. 127-140. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13>.
- ACKERMANN, H. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, (En línea) 2011, vol. 32, nº 2, p. 90-94. Disponible en: <<https://doi.org/10.1071/MA11090>>.
- AHIWALE, S., BANKAR, A., TAGUNDE, S., ZINJARDE, S., ACKERMANN, H., KAPADNIS, B. Isolation and characterization of a rare waterborne lytic phage of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B. *Canadian journal of microbiology*, (En

línea) 2013, vol. 59, nº 5, p. 318-323. Disponible en: <<https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0589>>

- ALBINO, L., ROSTAGNO, M., HUNGARO, H., MENDONÇA, R. Isolation, characterization, and application of bacteriophages for *Salmonella* spp. biocontrol in pigs. *Foodborne pathogens and disease*, (En línea) 2014, vol. 11, nº 8, p. 602-609. Disponible en: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1600>>
- ALEGRE, A. Aislamiento y caracterización de un bacteriófago lítico de *Listeria monocytogenes*. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. (En línea) 2018. Disponible en: <<https://hdl.handle.net/20.500.12672/10963>>
- AMARILLAS, L., RUBÍ-RANGEL, L., CHAIDEZ, C., GONZÁLEZ-ROBLES, A., LIGHTBOURN-ROJAS, L., & LEÓN-FÉLIX, J. Aislamiento y caracterización de phiLLS, un nuevo fago con potencial agente de biocontrol contra *Escherichia coli* multirresistente. *Fronteras en microbiología*, (En línea) 2017, vol. 8, p. 1355. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01355>>
- ASIJA, K., TESCHKE, C. Of capsid structure and stability: The partnership between charged residues of E-loop and P-domain of the bacteriophage P22 coat protein. *Virology*, (En línea) 2019, vol. 534, p. 45-53. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.05.021>>
- ATEBA, C., AKINDOLIRE, M. Isolation and characterisation of bacteriophages with lytic activity against virulent *Escherichia coli* O157: H7: Potential bio-control agents. (En línea) 2019. Disponible en: <<https://doi.org/10.20944/preprints201901.0132.v1>>
- BAHADOR, N., BASERISALEHI, M., KAPADNIS, B. Effect of ultraviolet light and pollutants on survival of bacteriophage isolates from environmental

samples. *Nature, Environment and Pollution Technology*, (En línea) 2007, vol. 6, nº 1, p. 141-147.

- BAO, H., ZHANG, H., WANG, R. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Poultry science*, (En línea) 2011, vol. 90, nº 10, p. 2370-2377. Disponible en: <<https://doi.org/10.3382/ps.2011-01496>>
- BAO, H., ZHANG, P., ZHANG, H., ZHOU, Y., ZHANG, L., WANG, R. Bio-control of *Salmonella* Enteritidis in foods using bacteriophages. *Viruses*, (En línea) 2015, vol. 7, nº 8, p. 4836-4853. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/v7082847>>
- BARDINA C. ESTUDIOS SOBRE TERAPIA FÁGICA CONTRA *S. enterica* EN *Gallus gallus*. Asesores Montserrat Llagostera, Pilar Cortés. Tesis Doctoral Universitat Autònoma de Barcelona, (En línea) 2012. Disponible en: <<https://hdl.handle.net/10803/83948>>
- BATINOVIC, S., WASSEF, F., KNOWLER, S., RICE, D., STANTON, C., ROSE, J., TUCCI, J., NITTAMI, T., VINH, A., DRUMMOND, G., SOBEY, C., CHAN, H., SEVIOUR, R., PETROVSKI, S., FRANKS, A. Bacteriophages innatural and artificial environments. *Pathogens*, (En línea) 2019, vol. 8, nº 3, p. 100. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/pathogens8030100>>
- BENLER, S., KOONIN, E. Fishing for phages in metagenomes: what do we catch, what do we miss?. *Current Opinion in Virology*, (En línea) 2021, vol. 49, p. 142-150. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.05.008>>
- BRADLEY, D. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, (En línea) 1967, vol. 31, nº 4, p. 230. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/br.31.4.230-314.1967>>
- BRUNO, V., HANNEMANN, S., LARA-TEJERO, M., FLAVELL, R., KLEINSTEIN, S., GALÁN, J. *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS pathogens*, (En línea)

- 2009, vol. 5, n° 8, p. e1000538. Disponible en: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000538>>
- BRÜSSOW, H., HENDRIX, R. Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, (En línea) 2002, vol. 108, n° 1, p. 13-16. Disponible en: <[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00637-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00637-7)>
 - BULL, J., GILL, J. The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages. *Frontiers in microbiology*, (En línea) 2014, vol. 5, p. 618. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00618>>
 - BURNET, F. The Classification of Dysentery-Coli Bacteriophages. III. A Correlation of the Serological Classification with Certain Biochemical Tests. *Journal of Pathology and Bacteriology*, (En línea) 1933, vol. 37, p. 179-84. Disponible en: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19342700140>>
 - CALLANAN, J., STOCKDALE, S., SHKOPOROV, A., DRAPER, L., ROSS, R., HILL, C. Expansion of known ssRNA phage genomes: from tens to over a thousand. *Science advances*, (En línea) 2020, vol. 6, n° 6, p. 5981. Disponible en: <<https://doi.org/10.1126/sciadv.aay5981>>
 - CAMPBELL, A. The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews Genetics*. (En línea) 2003, vol. 4, n° 6, p. 471-477. Disponible en: <<https://doi:10.1038/nrg1089>>
 - CAREY-SMITH, G., BILLINGTON, C., CORNELIUS, A., HUDSON, J., HEINEMANN, J. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS microbiology letters*, (En línea) 2006, vol. 258, n° 2, p. 182-186. Disponible en: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00217.x>>
 - CARMODY, C., GODDARD, J., NUGEN, S. Bacteriophage Capsid Modification by Genetic and Chemical Methods. *Bioconjugate Chemistry*, (En línea) 2021, vol.

32, n° 3, p. 466-481. Disponible en:
<<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00018>>

- CHAMAKURA, K., YOUNG, R. Phage single-gene lysis: Finding the weak spot in the bacterial cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, (En línea) 2019, vol. 294, n° 10, p. 3350-3358. Disponible en:
<<https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.001773>>
- CHEN, H., WANG, Y., SU, L., CHIU, C. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics & Neonatology*, (En línea) 2013, vol. 54, n° 3, p. 147-152. Disponible en:
<<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>>
- CHEN, J., RAM, G., PENADÉS, J., BROWN, S., NOVICK, R. Pathogenicity island-directed transfer of unlinked chromosomal virulence genes. *Molecular cell*, (En línea) 2015, vol. 57, n° 1, p. 138-149. Disponible en:
<<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.011>>
- CHEN, X., WEINBAUER, M., JIAO, N., ZHANG, R. Revisiting marine lytic and lysogenic virus-host interactions: kill-the-winner and piggyback-the-winner. *Science Bull*, (En línea) 2021, vol. 66, p. 871-874. Disponible en:
<<https://doi.org/10.1016/j.scib.2020.12.014>>
- CHEN, Y., SUN, E., SONG, J., TONG, Y., WU, B. Three *Salmonella enterica* serovar Enteritidis bacteriophages from the Siphoviridae family are promising candidates for phage therapy. *Canadian journal of microbiology*, (En línea) 2018, vol. 64, n° 11, p. 865-875. Disponible en: <<https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0740>>
- CHÉNARD, C., CHAN, A., VINCENT, W., SUTTLE, C. Polar freshwater cyanophage S-EIV1 represents a new widespread evolutionary lineage of phages. *The ISME journal*, (En línea) 2015, vol. 9, n° 9, p. 2046-2058. Disponible en: <<https://www.nature.com/articles/ismej201524>>

- CHO, M., CHUNG, H., CHOI, W., YOON, J. Different inactivation behaviors of MS-2 phage and *Escherichia coli* in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Applied and environmental microbiology*, (En línea) 2005, vol. 71, n° 1, p. 270-275. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.270-275.2005>>
- CHOI, I., PARK, D., CHIN, B., LEE, C., LEE, J., PARK, M. Exploring the feasibility of Salmonella Typhimurium-specific phage as a novel bio-receptor. *Journal of Animal Science and Technology*, (En línea) 2020, vol. 62, n° 5, p. 668. Disponible en: <<https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.5.668>>
- CONCEIÇÃO-NETO, N., ZELLER, M., LEFRÈRE, H., DE BRUYN, P., BELLER, L., DEBOUTTE, W., YINDA, C., LAVIGNE, R., MAES, P., RANST, V., HEYLEN, I., MATTHIJNSSENS, J. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Scientific reports*, (En línea) 2015, vol. 5, n° 1, p. 16532.
- CUYUTUPA, A. Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos aislados de intestino de pollos y específicos de *Salmonella* Infantis multidrogo-resistente. Tesis para optar al título profesional de Biólogo Microbiólogo - Parasitólogo. Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. (En línea) 2022. Disponible en: <<https://hdl.handle.net/20.500.12672/18550>>
- DO, J., ZAFAR, H., SAIER J., Milton H. Comparative genomics of transport proteins in probiotic and pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains. *Microbial pathogenesis*, (En línea) 2017, vol. 107, p. 106-115. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.022>>
- DOVAL, C. ESTRUCTURA DE FIBRAS DE BACTERIÓFAGOS. (En línea) 2013. Asesor Mark Raaij. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: <<http://hdl.handle.net/10486/660281>>

- DRULIS-KAWA, Z., OLSZAK, T., DANIS, K., MAJKOWSKA-SKROBEK, G., ACKERMANN, H. A giant *Pseudomonas* phage from Poland. *Archives of virology*, (En línea) 2014, vol. 159, nº 3, p. 567-572. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s00705-013-1844-y>>
- DUC, H., SON, H., HONJOH, K., MIYAMOTO, T. Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *Lwt*, (En línea) 2018, vol. 91, p. 353-360. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.072>>
- DUC, H., SON, H., YI, H., SATO, J., NGAN, P. H., MASUDA, Y., MIYAMOTO, T. Isolation, characterization and application of a polyvalent phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in different food matrices. *Food research international*, (En línea) 2020, vol. 131, p. 108977. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108977>>
- DUNNE, M., HUPFELD, M., KLUMPP, J., LOESSNER, M.J. Molecular basis of bacterial host interactions by Gram-positive targeting bacteriophages. *Viruses*, (En línea) 2018, vol. 10, nº 8, p. 397. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/v10080397>>
- EL HADDAD, L., ROY, J., KHALIL, G., ST-GELAIS, D., CHAMPAGNE, C., LABRIE, S., MOINEAU, S. Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. *International journal of food microbiology*, (En línea) 2016, vol. 217, p. 7-13. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.001>>
- ESMAEL, A., AZAB, E., GOBOURI, A., NASR-ELDIN, M., MOUSTAFA, M., MOHAMED, S, BADR O., ABDELATY, A. Isolation and characterization of two lytic bacteriophages infecting a multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium and their efficacy to combat salmonellosis in ready-to-use foods. *Microorganisms*,

(En línea) 2021, vol. 9, nº 2, p. 423. Disponible en:
<<https://doi.org/10.3390/microorganisms9020423>>

- FISTER, S., ROBBEN, C., WITTE, A., SCHODER, D., WAGNER, M. ROSSMANITH, P. Influencia de los factores ambientales en la interacción fago-bacteria y en la eficacia e infectividad del fago P100. *Fronteras en microbiología*, (En línea) 2016, vol. 7, p. 1152. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01152>>
- FLORES, G. Caracterización de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de pollos. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. (En línea) 2017 Disponible en: <<https://hdl.handle.net/20.500.12672/7317>>
- GALÁN, J., LARA-TEJERO, M., MARLOVITS, T., WAGNER, S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annual review of microbiology*, (En línea) 2014, vol. 68, p. 415. Disponible en: <<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155725>>
- GARCÍA I., PORRAS, M. AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGO-RESISTENTE EN AGUAS DE TRES RÍOS DE LA PROVINCIA DE LIMA-PERÚ. Asesor Ruiz Julio. Tesis para Título Profesional (En línea) 2018. Disponible en: <<https://hdl.handle.net/20.500.12672/8241>>
- GELDERBLOM, H., KRÜGER, D. Helmut Ruska (1908–1973): his role in the evolution of electron microscopy in the life sciences, and especially virology. En *Advances in Imaging and Electron Physics*. Elsevier, (En línea) 2014. p. 1-94. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800146-2.00001-1>>

- GILL, J. (2021). The Selection and Optimization of Phage Hosts. *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*, p. 689-698.
- GONÇALVES-TENÓRIO, A., SILVA, B., RODRIGUES, V., CADAVEZ, V., GONZALES-BARRON, U. Prevalence of pathogens in poultry meat: a meta-analysis of European published surveys. *Foods*, (En línea) 2018, vol. 7, nº 5, p. 69. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/foods7050069>>
- GONZALEZ, J., PEREIRA, N., SOTO, Z., HERNÁNDEZ, E., VILLARREAL, J. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* sp. y herramientas moleculares para su detección. *Revista Salud Uninorte*, (En línea) 2014, vol. 30, nº 1, p. 73-94. Disponible en: <<http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v30n1/v30n1a09.pdf>>
- GRIMONT, P., WEILL, F. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, (En línea) 2007, vol. 9, p. 1-166. Disponible en: <<https://www.researchgate.net/publication/283428414>>
- HATFULL, G., HENDRIX, R. Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, (En línea) 2011, vol. 1, nº 4, p. 298-303. Disponible: <<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>>
- HAYES, J., HILBERT, B., GAUBITZ, C., STONE, N., KELCH, B. A thermophilic phage uses a small terminase protein with a fixed helix–turn–helix geometry. *Journal of Biological Chemistry*, (En línea) 2020, vol. 295, nº 12, p. 3783-3793. Disponible en: <<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012224>>
- HORKÁ, M., KARÁSEK, P., ROTH, M., ŠTVERÁKOVÁ, D., ŠALPLACHTA, J., RŮŽIČKA, F., PANTŮČEK, R. Bacteriophage replication on permissive host cells in fused silica capillary with nanostructured part as potential of electrophoretic methods for developing phage applications. *Talanta*, (En línea) 2021, vol. 224, p. 121800. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121800>>

- HUANG, C., VIRK, S., SHI, J., ZHOU, Y., WILLIAS, S., MORSY, M., ABDELNABBY, H., LIU, J., WANG, X., LI, J. Isolation, characterization, and application of bacteriophage LPSE1 against *Salmonella enterica* in ready to eat (RTE) foods. *Frontiers in microbiology*, (En línea) 2018, vol. 9, p. 1046. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01046>>
- HUSSAIN, W., ULLAH, M., FAROOQ, U., AZIZ, A., WANG, S. Bacteriophage-based advanced bacterial detection: Concept, mechanisms, and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, (En línea) 2021, vol. 177, p. 112973. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.112973>>
- HYMAN, P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*, (En línea) 2019, vol. 12, nº 1, p. 35. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/ph12010035>>
- IACUMIN, L., MANZANO, M., COMI, G. Phage inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele dry-cured ham and elimination of biofilms from equipment and working environments. *Microorganisms*, (En línea) 2016, vol. 4, nº 1, p. 4. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/microorganismos4010004>>
- ISLAM, M., ZHOU, Y., LIANG, L., NIME, I., YAN, T., WILLIAS, S., LI, J. Application of a broad range lytic phage LPST94 for biological control of *Salmonella* in foods. *Microorganisms*, (En línea) 2020, vol. 8, nº 2, p. 247. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020247>>
- JOÃO, J., LAMPREIA, J., PRAZERES, D., AZEVEDO, A. Manufacturing of bacteriophages for therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, (En línea) 2021, vol. 49, p. 107758. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107758>>
- JIU, Y., MENG, X., HONG, X., HUANG, Q., WANG, C., CHEN, Z., ZHAO L., LIU X., LU Y., LI, S. Prevalence and characterization of *Salmonella* in three typical commercial pig abattoirs in Wuhan, China. *Foodborne Pathogens and Disease*,

(En línea) 2020, vol. 17, nº 10, p. 620-627. Disponible en: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2737>>

- JUNG, L., DING, T., AHN, J. Evaluation of lytic bacteriophages for control of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, (En línea) 2017, vol. 16, nº 1, p. 1-9. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/s12941-017-0237-6>>
- KARTHIK, K., MUNESWARAN, N., MANJUNATHACHAR, H., GOPI, M., ELAMURUGAN, A., KALAIYARASU, S. Bacteriophages: effective alternative to antibiotics. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, (En línea) 2014, vol. 2, nº 3S, p. 1-7. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.3s.1.7>>
- KIM, M., KIM, S., PARK, B., RYU, S. Core lipopolysaccharide-specific phage SSU5 as an auxiliary component of a phage cocktail for *Salmonella* biocontrol. *Applied and environmental microbiology*, (En línea) 2014, vol. 80, nº 3, p. 1026-1034. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/AEM.03494-13>>
- KOZŁOWSKA, K., TYMECKA-MULIK, J., WĘGRZYN, G. Purified Stx and λ phage initiator O proteins bind specifically to two different origins of replication in vitro. *Protein Expression and Purification*, (En línea) 2017, vol. 131, p. 16-26. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.11.002>>
- KROPINSKI, A., MAZZOCCO, A., WADDELL, T., LINGOHR, E., JOHNSON, R. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. En *Bacteriophages*. Humana Press, (En línea) 2009. p. 69-76. Disponible en: <https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60327-164-6_7>
- KRUGER, D., SCHNECK, P. GELDERBLUM, H. Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *The Lancet*, (En línea) 2000, vol. 355, nº 9216, p. 1713-1717. Disponible en: <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02250-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02250-9)>
- LAVIGNE, R., DARÍO, P., VERANO, E., SETO, D., MAHADEVAN, P., NILSSON, A., ACKERMANN, H., KROPINSKI, A. Classification of Myoviridae

bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC microbiology*, (En línea) 2009, vol. 9, nº 1, p. 1-16. Disponible en: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-224>>

- LEAVITT, J., GILCREASE, E., WILSON, K., CASJENS, S. Function and horizontal transfer of the small terminase subunit of the tailed bacteriophage Sf6 DNA packaging nanomotor. *Virology*, (En línea) 2013, vol. 440, nº 2, p. 117-133. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.02.023>>
- LI, L., PAN, X., CUI, X., SUN, Q., YANG, X., YANG, H. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage K5 genome and identification of its receptor related genes. *Journal of Basic Microbiology*, (En línea) 2016, vol. 56, nº 12, p. 1344-1353. Disponible en: <<https://doi.org/10.1002/jobm.201600116>>
- LI, L., ZHANG, Z. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. *Molecular biology reports*, (En línea) 2014, vol. 41, nº 9, p. 5829-5838. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s11033-014-3457-2>>
- LIU, B., KNIREL, Y., FENG, L., PEREPELOV, A., SENCHENKOVA, S., REEVES, P., WANG, L. Structural diversity in *Salmonella* O antigens and its genetic basis. *FEMS microbiology reviews*, (En línea) 2014, vol. 38, nº 1, p. 56-89. Disponible en: <<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12034>>
- LIU, R., LI, Z., HAN, G., CUN, S., YANG, M., LIU, X. Bacteriophage ecology in biological wastewater treatment systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (En línea) 2021, vol.105, p. 5299-5307. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11414-8>>
- LWOFF, A., TOURNIER, P. The classification of viruses. *Annual Reviews in Microbiology*, (En línea) 1966, vol. 20, nº 1, p. 45-74. Disponible en: <<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.20.100166.000401>>

- MAY, J., GROISMAN, E. Conflicting roles for a cell surface modification in *Salmonella*. *Molecular microbiology*, (En línea) 2013, vol. 88, nº 5, p. 970-983. Disponible en: <<https://doi.org/10.1111/mmi.12236>>
- MCQUISTON, J., HERRERA-LEON, S., WERTHEIM, B., DOYLE, J., FIELDS, P., TAUXE, R., LOGSDON J. Molecular phylogeny of the salmonellae: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *Journal of bacteriology*, (En línea) 2008, vol. 190, nº 21, p. 7060-7067. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/JB.01552-07>>
- MCQUISTON, J., PARRENAS, R., ORTIZ-RIVERA, M., GHEESLING, L., BRENNER, F., FIELDS, P. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *Journal of clinical microbiology*, (En línea) 2004, vol. 42, nº 5, p. 1923-1932. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1923-1932.2004>>
- MIDDELBOE, M. Bacterial growth rate and marine virus–host dynamics. *Microbial Ecology*, (En línea) 2000, vol. 40, nº 2, p. 114-124. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s002480000050>>
- MIDDELBOE, M., CHAN, A., BERTELSEN, S. Isolation and life cycle characterization of lytic viruses infecting heterotrophic bacteria and cyanobacteria. *Manual of aquatic viral ecology*, (En línea) 2010, vol. 13, p. 118-133. Disponible en: <<https://doi.org/10.17504/protocols.io.dxq7mv>>
- MISSTEAR, D., GILL, L. The inactivation of phages MS2, Φ X174 and PR772 using UV and solar photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, (En línea) 2012, vol. 107, p. 1-8. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.012>>
- MOFFATT, C., MUSTO, J., PINGAULT, N., MILLER, M., STAFFORD, R., GREGORY, J., POLKINGHORNE B., KIRK, M. *Salmonella* Typhimurium and

outbreaks of egg-associated disease in Australia, 2001 to 2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, (En línea) 2016, vol. 13, nº 7, p. 379-385. Disponible en: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2110>>

- NAIR, D., VENKITANARAYANAN, K., KOLLANOOR J. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods*, (En línea) 2018, vol. 7, nº 10, p. 167. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/foods7100167>>
- NAWEL, Z., RIMA, O., AMIRA, B. An overview on *Vibrio* temperate phages: Integration mechanisms, pathogenicity, and lysogeny regulation. *Microbial Pathogenesis*, (En línea) 2022, p. 105490. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105490>>
- NISHINO, K. Antimicrobial drug efflux pumps in *Salmonella*. En *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria*. Adis, Cham, (En línea) 2016. p. 261-279. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39658-3_10>
- NOBREGA, F., VLOT, M., DE JONGE, P., DREESENS, L., BEAUMONT, H., LAVIGNE, R., DUTILH, B., BROUNS, S. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*. (En línea) 2018, vol. 16, nº12, 760-773. Disponible en: <<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>>
- PARK, M., LEE, J., SHIN, H., KIM, M., CHOI, J., KANG, D., RYU, S. Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and Environmental Microbiology*, (En línea) 2012, vol. 78, nº 1, p. 58-69. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/AEM.06231-11>>
- PATEL, J., GALÁN, J. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*–host cell interactions. *The Journal of cell biology*, (En línea) 2006, vol. 175, nº 3, p. 453-463. Disponible en: <<https://doi.org/10.1083/jcb.200605144>>

- PAUL, J. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *The ISME journal*, (En línea) 2008, vol. 2, nº 6, p. 579-589. Disponible en: <<https://www.nature.com/articles/ismej200835>>
- PAUNIKAR, W., SANMUKH, S., GHOSH, T. Effect of metal ions and chemical solvents on the adsorption of salmonella phage on salmonella choleraesuis subspecies Indica. *Int J Pharm Bio Sci*, (En línea) 2012, vol. 3, p. 181-190.
- PEREIRA, C., MOREIRINHA, C., LEWICKA, M., ALMEIDA, P., CLEMENTE, C., CUNHA, Â., ALMEIDA, A. Bacteriophages with potential to inactivate *Salmonella* Typhimurium: Use of single phage suspensions and phage cocktails. *Virus research*, (En línea) 2016, vol. 220, p. 179-192. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.020>>
- PETSONG, K., BENJAKUL, S., CHATURONGAKUL, S., SWITT, A., VONGKAMJAN, K. Lysis profiles of *Salmonella* phages on *Salmonella* isolates from various sources and efficiency of a phage cocktail against *S. enteritidis* and *S. typhimurium*. *Microorganisms*, (En línea) 2019, vol. 7, nº 4, p. 100. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms7040100>>
- PIRES, D., OLIVEIRA, H., MELO, D., SILLANKORVA, S., AZEREDO, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, (En línea) 2016, vol. 100, nº 5, p. 2141-2151. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>>
- PREVELIGE J., CORTINES, J. Phage assembly and the special role of the portal protein. *Current opinion in virology*, (En línea) 2018, vol. 31, p. 66-73. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.09.004>>
- PUNIL, R. Caracterización de un bacteriófago específico de *Escherichia coli* aislado de aguas residuales de “La Taboada”, Tesis para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad

Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. (En línea) 2017. Disponible en:
<<https://hdl.handle.net/20.500.12672/7363>>

- RAHAMAN, M., RAHMAN, M., RAHMAN, M., KHAN, M., HOSEN, M., PARVEJ, M., AHMED, S. Poultry *Salmonella* specific bacteriophage isolation and characterization. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, (En línea) 2014, vol. 12, n° 2, p. 107-114. Disponible en:
<<https://doi.org/10.3329/bjvm.v12i2.21264>>
- RAKHUBA, D., KOLOMIETS, E., DEY, E., NOVIK, G. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish journal of microbiology*, (En línea) 2010, vol. 59, n° 3, p. 145. Disponible en:
<<https://doi.org/10.33073/pjm-2010-025>>
- RAMANCULOV, E., YOUNG, R. Genetic analysis of the T4 holin: timing and topology. *Gene*, (En línea) 2001, vol. 265, n° 1-2, p. 25-36. Disponible en:
<[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00365-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00365-1)>
- ROHWER, F., EDWARDS, R. The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of bacteriology*, (En línea) 2002, vol. 184, n° 16, p. 4529-4535. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4529-4535.2002>>
- SALIM, A., MADHAVAN, A., SUBHASH, S., PRASAD, M., NAIR, B. G., PAL, S. *Escherichia coli* ST155 as a production-host of three different polyvalent phages and their characterisation with a prospect for wastewater disinfection. *Scientific Reports*, (En línea) 2022, vol. 12, n° 1, p. 19406.
- SANKARAN, N. The bacteriophage, its role in immunology: how Macfarlane Burnet's phage research shaped his scientific style. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, (En línea) 2010, vol. 41, n° 4, p. 367-375. Disponible en:
<<https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2010.10.012>>

- SEGUNDO-ARIZMENDI, N., HERNÁNDEZ-BALTAZAR, E., VILLEGAS, O., TORRES-ANGELES, O. Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). (En línea) 2015. Disponible en: <<https://www.redalyc.org/pdf/579/57916078003.pdf>>
- SEGUNDO-ARIZMENDI, N., GÓMEZ-GARCÍA, J., FLORES-CUEVAS, K., DUQUE-MONTAÑO, B., LÓPEZ-VILLEGAS, E., BALTAZAR-HERNÁNDEZ, E., TORRES-ANGELES, O. Caracterización parcial del bacteriófago S1, lítico contra *Salmonella enterica*, con posible uso farmacéutico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, (En línea) 2017, vol. 48, nº 2, p. 36-48. Disponible en: <<https://www.redalyc.org/pdf/579/57956615005.pdf>>
- SHAPIRO, O., KUSHMARO, A. Bacteriophage ecology in environmental biotechnology processes. *Current opinion in biotechnology*, (En línea) 2011, vol. 22, nº 3, p. 449-455. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.012>>
- SOFFER, N., WOOLSTON, J., LI, M., DAS, C., SULAKVELIDZE, A., Bacteriophage preparation lytic for Shigella significantly reduces Shigella sonnei contamination in various foods. *PLoS One*, (En línea) 2017, vol. 12, nº 3, p. e0175256. Disponible en: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175256>>
- SOMMER, R., PRIBIL, W., APPELT, S., GEHRINGER, P., ESCHWEILER, H., LETH, H., HAIDER, T. Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation: a comparative approach. *Water Research*, (En línea) 2001, vol. 35, nº 13, p. 3109-3116. Disponible en: <[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00030-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00030-6)>
- SONG, S., GUO, Y., KIM, J., WANG, X., WOOD, T. Phages mediate bacterial self-recognition. *Cell Reports*, (En línea) 2019, vol. 27, nº 3, p. 737-749. e4. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.070>>

- SØRENSEN, A., WOULDSTRA, C., SØRENSEN, M., BRØNDSTED, L. Subtypes of tail spike proteins predicts the host range of Ackermannviridae phages. *Computational and structural biotechnology journal*, (En línea) 2021, vol. 19, p. 4854-4867. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.030>>
- STOCKDALE, S., MAHONY, J., COURTIN, P., CHAPOT-CHARTIER, M., VAN PIJKEREN, J., BRITTON, R., NEVE H., HELLER K., ALDEH B., VOGENSEN F., VAN SINDEREN, D. The Lactococcal Phages Tuc2009 and TP901-1 Incorporate Two Alternate Forms of Their Tail Fiber into Their Virions for Infection Specialization*[S]. *Journal of biological chemistry*, (En línea) 2013, vol. 288, nº 8, p. 5581-5590. Disponible en: <<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444901>>
- STORMS, Z., BROWN, T., COOPER, D., SAUVAGEAU, D., LEASK, R. Impact of the cell life-cycle on bacteriophage T4 infection. *FEMS microbiology letters*, (En línea) 2014, vol. 353, nº 1, p. 63-68. Disponible en: <<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12402>>
- STORMS, Z., SAUVAGEAU, D. Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. *Virology*, (En línea) 2015, vol. 485, p. 355-362. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.007>>
- SU, L., CHIU, C. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, (En línea) 2007, vol. 30, nº 3, p. 210. Disponible en: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17760271/>>
- SUÁREZ, K. Aislamiento y caracterización de un bacteriófago específico de *Vibrio cholerae* procedente de aguas residuales de Lima – Perú. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. (En línea) 2017. Disponible en: <<https://hdl.handle.net/20.500.12672/7454>>

- SUN, Z., WEN, H., MA, L., CHEN, Z. Isolation, characterization and application of bacteriophage PSDA-2 against *Salmonella* Typhimurium in chilled mutton. *PloS one*, (En línea) 2022, vol. 17, nº 1, p. e0262946. Disponible en: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262946>>
- Tindall, B., Grimont, P., Garrity, G., Euzéby, J. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, (En línea) 2005, vol. 55, nº 1, p. 521-524. Disponible en: <<https://doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>>
- THOMAS, J., SODDELL, J., KURTBÖKE, D. Fighting foam with phages?. *Water Science and Technology*, (En línea) 2002, vol. 46, nº 1-2, p. 511-518. Disponible en: <<https://doi.org/10.2166/wst.2002.0527>>
- THUNG, T., LEE, E., MAHYUDIN, N., ANURADHA, K., MAZLAN, N., KUAN, C., RADU, S. Evaluation of a lytic bacteriophage for bio-control of *Salmonella* Typhimurium in different food matrices. *LWT*, (En línea) 2019, vol. 105, p. 211-214. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.033>>
- TSOLIS, R., XAVIER, M., SANTOS, R., BÄUMLER, A. How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infection and immunity*, (En línea) 2011, vol. 79, nº 5, p. 1806-1814. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/IAI.01369-10>>
- TURNER, D., HEZWANI, M., NELSON, S., SALISBURY, V., REYNOLDS, D. Characterization of the *Salmonella* bacteriophage vB_SenS-Ent1. *Journal of general virology*, (En línea) 2012, vol. 93, nº 9, p. 2046-2056. Disponible en: <<https://doi.org/10.1099/vir.0.043331-0>>
- VINOD, M., SHIVU, M., UMESHA, K., RAJEEVA, B., KROHNE, G., KARUNASAGAR, I., KARUNASAGAR, I. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery

environments. *Aquaculture*, (En línea) 2006, vol. 255, nº 1-4, p. 117-124. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.003>>

- WAIN, J., HOUSE, D., ZAFAR, A., BAKER, S., NAIR, S., KIDGELL, C., BHUTTA Z., DOUGAN G. HASAN, R. Vi antigen expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi clinical isolates from Pakistan. *Journal of clinical microbiology*, (En línea) 2005, vol. 43, nº 3, p. 1158-1165. Disponible en: <<https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1158-1165.2005>>
- WANG, C., CHEN, Q., ZHANG, C., YANG, J., LU, Z., LU, F., BIE, X. Characterization of a broad host-spectrum virulent *Salmonella* bacteriophage fmb-p1 and its application on duck meat. *Virus Research*, (En línea) 2017, vol. 236, p. 14-23. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.001>>
- WALKER, N., LI, S., STRAUSS, H., POKHAREL, S. *Salmonella* Typhimurium DT 104 response to Lytic bacteriophage and Lactobionic acid on raw chicken breast. *Food Microbiology*, (En línea) 2021, vol. 100, p. 103862. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103862>>
- WONG, C., SIEO, C., TAN, W., ABDULLAH, N., HAIR-BEJO, M., ABU, J., HO, Y. Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *International journal of food microbiology*, (En línea) 2014, vol. 172, p. 92-101. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.034>>
- XIANG, Y., LI, F., DONG, N., TIAN, S., ZHANG, H., DU, X., ZHOY X., XU X., YANG H., XIE J., YANG C., LIU H., QIU S., SONG H., SUN, Y. Investigation of a salmonellosis outbreak caused by multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium in China. *Frontiers in microbiology*, (En línea) 2020, vol. 11, p. 801. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00801>>
- XU, D., JIANG, Y., WANG, L., YAO, L., LI, F., ZHAI, Y., ZHANG, Y. Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in raw Salmon fillets and scallop adductors by using

- bacteriophage SLMP1. *Journal of food protection*, (En línea) 2018, vol. 81, nº 8, p. 1304-1312. Disponible en: <<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-525>>
- YAN, T., LIANG, L., YIN, P., ZHOU, Y., MAHDY SHAROBA, A., LU, Q., LI, J. Application of a novel phage LPSEYT for biological control of *Salmonella* in foods. *Microorganisms*, (En línea) 2020, vol. 8, nº 3, p. 400. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030400>>
 - YANG, Q., DING, Y., NIE, R., YAO, L., WANG, X., ZHOU, M., WANG, J. WANG, X. Characterization of a novel T7-like *Salmonella* Typhimurium (ATCC13311) bacteriophage LPST144 and its endolysin. *LWT*, (En línea) 2020, vol. 123, p. 109034. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109034>>
 - YOUNG, R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *Journal of microbiology*, (En línea) 2014, vol. 52, nº 3, p. 243-258. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>>
 - ZHAN, Y., CHEN, F. Bacteriophages that infect marine roseobacters: genomics and ecology. *Environmental microbiology*, (En línea) 2019, vol. 21, nº 6, p. 1885-1895. Disponible en: <<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14504>>

10. ANEXO 1

Anexo 1. Datos de la curva de crecimiento de *Salmonella Typhimurium*

Tiempo	UFC/mL	Ln (UFC/mL)
0	4.20E+05	12.95
1	8.20E+05	13.62
2	1.40E+06	14.15
3	3.60E+06	15.10
4	2.20E+07	16.91
5	7.90E+07	18.18
6	3.00E+08	19.52
7	4.80E+08	19.99
8	5.10E+08	20.05

Anexo 2. Cálculo de promedio y desviación estándar de la MOI

MOI	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desv. Estand
0.01	2.07E+07	1.93E+07	2.31E+07	2.10E+07	1.57E+06
0.1	5.32E+08	5.49E+08	5.38E+08	5.40E+08	7.04E+06
1	1.19E+09	1.10E+09	1.02E+09	1.10E+09	6.94E+07
10	1.61E+08	1.47E+08	1.43E+08	1.50E+08	7.72E+06

Anexo 3. Cálculo de promedio y desviación estándar de la Tasa de Absorción

Tiempo	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desv. Estand
0	2.70E+09	2.00E+09	1.80E+09	2.17E+09	3.86E+08
5	6.80E+08	7.30E+08	7.10E+08	7.07E+08	2.05E+07
10	4.80E+08	4.00E+08	4.10E+08	4.30E+08	3.56E+07
15	2.10E+08	1.70E+08	2.00E+08	1.93E+08	1.70E+07
20	7.20E+07	6.50E+07	4.90E+07	6.20E+07	9.63E+06
25	3.40E+07	4.10E+07	3.90E+07	3.80E+07	2.94E+06
30	6.90E+06	7.30E+06	7.10E+06	7.10E+06	1.63E+05

Anexo 4. Cálculo de promedio y desviación estándar de la Curva de un Paso

Tiempo	Ensayo1		Ensayo2		Ensayo3		Promedio		Desv. Estand	
	SS	CC	SS	CC	SS	CC	SS	CC	SS	CC
0	2.80E+04	2.00E+04	2.70E+04	2.10E+04	3.20E+04	2.40E+04	2.90E+04	2.17E+04	2.16E+03	1.70E+03
5	3.10E+04	2.30E+04	2.80E+04	1.90E+04	3.00E+04	2.30E+04	2.97E+04	2.17E+04	1.25E+03	1.89E+03
10	2.70E+04	1.90E+04	3.50E+04	2.50E+04	2.90E+04	2.20E+04	3.03E+04	2.20E+04	3.40E+03	2.45E+03
15	3.30E+04	3.70E+04	3.10E+04	3.70E+04	2.70E+04	3.50E+04	3.03E+04	3.63E+04	2.49E+03	9.43E+02
20	3.70E+04	4.90E+04	3.80E+04	4.20E+04	3.60E+04	5.10E+04	3.70E+04	4.73E+04	8.16E+02	3.86E+03
25	4.20E+04	5.80E+04	4.60E+04	5.80E+04	4.10E+04	6.10E+04	4.30E+04	5.90E+04	2.16E+03	1.41E+03
30	5.00E+04	7.00E+04	5.50E+04	6.90E+04	5.70E+04	7.80E+04	5.40E+04	7.23E+04	2.94E+03	4.03E+03
35	6.80E+04	1.10E+05	5.50E+04	1.70E+05	6.30E+04	1.00E+05	6.20E+04	1.27E+05	5.35E+03	3.09E+04
40	7.60E+04	1.40E+05	7.50E+04	1.50E+05	7.10E+04	1.90E+05	7.40E+04	1.60E+05	2.16E+03	2.16E+04
45	9.70E+04	2.00E+05	9.20E+04	1.90E+05	9.90E+04	2.10E+05	9.60E+04	2.00E+05	2.94E+03	8.16E+03
50	1.85E+05	2.00E+05	1.78E+05	2.18E+05	1.76E+05	2.10E+05	1.80E+05	2.09E+05	3.86E+03	7.36E+03
55	2.10E+05	2.18E+05	1.90E+05	2.15E+05	1.80E+05	2.20E+05	1.93E+05	2.18E+05	1.25E+04	2.05E+03
60	2.10E+05	2.30E+05	2.00E+05	2.10E+05	2.20E+05	2.15E+05	2.10E+05	2.18E+05	8.16E+03	8.50E+03
65	2.20E+05	2.20E+05	2.15E+05	2.28E+05	2.00E+05	2.20E+05	2.12E+05	2.23E+05	8.50E+03	3.77E+03
70	2.10E+05	2.10E+05	2.30E+05	2.40E+05	2.17E+05	2.20E+05	2.19E+05	2.23E+05	8.29E+03	1.25E+04
75	2.30E+05	2.26E+05	2.00E+05	2.29E+05	2.30E+05	2.10E+05	2.20E+05	2.22E+05	1.41E+04	8.34E+03
80	2.25E+05	2.29E+05	2.22E+05	2.10E+05	2.12E+05	2.30E+05	2.20E+05	2.23E+05	5.56E+03	9.20E+03
85	2.18E+05	2.20E+05	2.10E+05	2.30E+05	2.27E+05	2.12E+05	2.18E+05	2.21E+05	6.94E+03	7.36E+03
90	2.28E+05	2.16E+05	2.00E+05	2.17E+05	2.30E+05	2.30E+05	2.19E+05	2.21E+05	1.37E+04	6.38E+03

SC: Sin cloroformo

CC: Con cloroformo

Anexo 5. Cálculo de promedio y desviación estándar de la Estabilidad Térmica

PROMEDIOS

Temperatura	Desviación estándar					
	0 s	5 s	15 s	30 s	45 s	60 s
40 °C	2.40E+08	2.20E+08	2.13E+08	1.80E+08	9.90E+07	9.90E+07
50 °C	2.40E+08	2.00E+08	2.10E+08	1.50E+08	9.70E+07	9.80E+07
60 °C	2.40E+08	8.30E+07	6.80E+07	5.40E+07	2.70E+07	1.25E+07
70 °C	2.40E+08	2.20E+07	3.70E+06	1.47E+06	3.60E+05	4.00E+04
80 °C	2.40E+08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

DESVEST

Temperatura	Desviación estándar					
	0 s	5 s	15 s	30 s	45 s	60 s
40 °C	0.00E+00	2.45E+07	2.46E+07	3.27E+07	1.41E+06	8.16E+05
50 °C	0.00E+00	2.94E+07	2.16E+07	2.16E+07	2.16E+06	8.16E+05
60 °C	0.00E+00	3.56E+06	1.41E+06	2.94E+06	4.32E+06	1.08E+06
70 °C	0.00E+00	4.32E+06	2.16E+05	2.05E+05	2.16E+04	2.16E+04
80 °C	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

Ensayo 1

Temperatura	Tiempo					
	0 s	5 s	15 s	30 s	45 s	60 s
40 °C	2.40E+08	1.90E+08	2.39E+08	1.80E+08	1.00E+08	9.90E+07
50 °C	2.40E+08	2.40E+08	1.80E+08	1.60E+08	1.00E+08	9.70E+07
60 °C	2.40E+08	8.50E+07	6.60E+07	5.00E+07	2.10E+07	1.10E+07
70 °C	2.40E+08	2.40E+07	3.50E+06	1.20E+06	3.70E+05	5.00E+04
80 °C	2.40E+08	0	0	0	0	0

Ensayo 2

Temperatura	Tiempo					
	0 s	5 s	15 s	30 s	45 s	60 s
40 °C	2.40E+08	2.50E+08	2.20E+08	2.20E+08	9.70E+07	9.80E+07
50 °C	2.40E+08	1.90E+08	2.30E+08	1.70E+08	9.50E+07	9.80E+07
60 °C	2.40E+08	8.60E+07	6.90E+07	5.70E+07	2.90E+07	1.35E+07
70 °C	2.40E+08	2.60E+07	4.00E+06	1.50E+06	3.30E+05	6.00E+04
80 °C	2.40E+08	0	0	0	0	0

Ensayo 3

Temperatura	Tiempo					
	0 s	5 s	15 s	30 s	45 s	60 s
40 °C	2.40E+08	2.20E+08	1.80E+08	1.40E+08	1.00E+08	1.00E+08
50 °C	2.40E+08	1.70E+08	2.20E+08	1.20E+08	9.60E+07	9.90E+07
60 °C	2.40E+08	7.80E+07	6.90E+07	5.50E+07	3.10E+07	1.30E+07
70 °C	2.40E+08	1.60E+07	3.60E+06	1.70E+06	3.80E+05	1.00E+04
80 °C	2.40E+08	0	0	0	0	0

Anexo 6. Cálculo de promedio y desviación estándar de la Sensibilidad a diferentes pH.

pH	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desv Estand
2	1.25E+02	8.50E+01	9.00E+01	1.00E+02	1.78E+01
3	3.40E+04	3.60E+04	4.10E+04	3.70E+04	2.94E+03
4	8.50E+05	7.80E+05	8.00E+05	8.10E+05	2.94E+04
5	8.40E+07	8.10E+07	8.10E+07	8.20E+07	1.41E+06
6	1.71E+08	1.75E+08	1.55E+08	1.67E+08	8.64E+06
7	2.00E+08	2.00E+08	2.30E+08	2.10E+08	1.41E+07
8	1.40E+08	1.80E+08	1.30E+08	1.50E+08	2.16E+07
9	1.10E+08	1.10E+08	8.00E+07	1.00E+08	1.41E+07
10	8.60E+07	9.30E+07	9.10E+07	9.00E+07	2.94E+06
11	6.30E+07	5.00E+07	5.20E+07	5.50E+07	5.72E+06
12	4.40E+07	5.20E+07	5.10E+07	4.90E+07	3.56E+06
13	3.70E+07	3.20E+07	3.00E+07	3.30E+07	2.94E+06

Anexo 7. Cálculo de promedio y desviación estándar de la Sensibilidad al cloroformo

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desv. Estand.
Sin cloroformo	6.50E+09	7.10E+09	6.30E+09	6.63E+09	3.40E+08
Con cloroformo	9.00E+08	9.60E+08	8.70E+08	9.10E+08	3.74E+07

Los promedios de esta prueba son diferentes significativamente ($p \leq 0.05$)

Anexo 8. Cálculo de promedio y desviación estándar de la Sensibilidad a la exposición de la luz UV

Tiempo (s)	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio	Desv. Estand.
0	1.00E+08	1.00E+08	1.00E+08	1.00E+08	0.00E+00
15	1.00E+07	1.50E+07	1.40E+07	1.30E+07	2.16E+06
30	5.50E+06	6.10E+06	5.80E+06	5.80E+06	2.45E+05
45	3.50E+05	4.30E+05	4.20E+05	4.00E+05	3.56E+04
60	1.80E+04	2.30E+04	1.90E+04	2.00E+04	2.16E+03

Anexo 9. Cálculo de promedio y desviación estándar de la reducción del crecimiento bacteriano

Tiempo	Ensayo1		Ensayo2		Ensayo3		Promedio		Desv. Estand	
	Bacteria (Control)	Bacteria + Fago	Bacteria (Control)	Bacteria + Fago	Bacteria (Control)	Bacteria + Fago	Solo bacteria	Bacteria + fago	Solo Bacteria	Bacteria + fago
0	7.20E+06	6.50E+06	6.50E+06	6.40E+06	6.70E+06	6.60E+06	6.80E+06	6.50E+06	2.94E+05	8.16E+04
1	9.40E+06	9.90E+06	9.80E+06	9.90E+06	9.60E+06	9.60E+06	9.60E+06	9.80E+06	1.63E+05	1.41E+05
2	4.10E+07	1.50E+07	3.70E+07	2.30E+07	3.60E+07	1.90E+07	3.80E+07	1.90E+07	2.16E+06	3.27E+06
3	1.20E+08	1.70E+07	9.00E+07	2.10E+07	9.00E+07	2.20E+07	1.00E+08	2.00E+07	1.41E+07	2.16E+06
4	4.70E+08	1.60E+07	5.60E+08	2.30E+07	5.30E+08	2.40E+07	5.20E+08	2.10E+07	3.74E+07	3.56E+06
5	6.00E+08	5.50E+07	6.70E+08	5.50E+07	6.80E+08	5.80E+07	6.50E+08	5.60E+07	3.56E+07	1.41E+06
6	9.00E+08	9.90E+07	8.70E+08	9.70E+07	8.70E+08	9.80E+07	8.80E+08	9.80E+07	1.41E+07	8.16E+05
7	9.70E+08	1.80E+08	9.90E+08	2.40E+08	9.80E+08	2.10E+08	9.80E+08	2.10E+08	8.16E+06	2.45E+07
8	1.30E+09	3.70E+08	1.00E+09	3.10E+08	1.00E+09	3.40E+08	1.10E+09	3.40E+08	1.41E+08	2.45E+07
9	1.40E+09	3.50E+08	1.10E+09	4.10E+08	1.10E+09	4.10E+08	1.20E+09	3.90E+08	1.41E+08	2.83E+07
10	1.40E+09	4.00E+08	1.50E+09	4.70E+08	1.30E+09	4.20E+08	1.40E+09	4.30E+08	8.16E+07	2.94E+07
11	2.30E+09	5.20E+08	1.80E+09	4.80E+08	1.90E+09	5.00E+08	2.00E+09	5.00E+08	2.16E+08	1.63E+07
12	3.50E+09	5.80E+08	3.30E+09	6.20E+08	2.80E+09	6.30E+08	3.20E+09	6.10E+08	2.94E+08	2.16E+07

Anexo 10. Procedimiento de filtración del fago FS01. Laboratorio de Bacteriófagos S7.



Anexo 11. Centrifugación del agua residual para el aislamiento del fago FS01. Laboratorio de Bacteriófagos S7.



Anexo 12. Planta de tratamiento de aguas residuales Taboada, Lima, Perú
(Fuente: Suárez, 2017)

