

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE**  
**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Efecto de la temperatura y pH en la actividad lítica de bacteriófagos**  
**aislados de aguas residuales, sobre *Klebsiella pneumoniae***

**AUTORES:**

BACH. Hora López, Elida Mariana

BACH. Ruiz Velásquez, Carlos Eduardo

**ASESOR:**

Dr. Azañero Díaz, Carlos Alberto

**Nuevo Chimbote, Perú**

**2025**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Efecto de la temperatura y pH en la actividad lítica de bacteriófagos  
aislados de aguas residuales, sobre *Klebsiella pneumoniae***

**AUTORES:**

Hora López, Elida Mariana

Ruiz Velásquez, Carlos Eduardo

**REVISADO Y APROBADO POR EL ASESOR:**

---

Dr. Azañero Díaz, Carlos Alberto  
DNI: 18093785  
ID ORCID: 0000-0002-5612-4104

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Efecto de la temperatura y pH en la actividad lítica de bacteriófagos  
aislados de aguas residuales, sobre *Klebsiella pneumoniae***

**AUTORES:**

Hora López, Elida Mariana

Ruiz Velásquez, Carlos Eduardo

**REVISADO Y APROBADO POR EL JURADO EVALUADOR:**

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

DNI: 32406295

ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

Dr. Lecca Zavaleta, Victor Eduardo

DNI: 42636735

ID ORCID: 0000-0002-3759-8128

Dr. Azarero Díaz, Carlos Alberto

DNI: 18093785

ID ORCID: 0000-0002-5612-4104

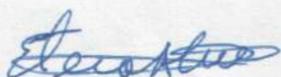
## ACTA DE CALIFICACION DE SUSTENTACION DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el auditorio de la facultad de Ciencias siendo las 16 horas del día 04 de abril dando cumplimiento a la Resolución N° 085-2025-UNS-CFC, se reunió el jurado evaluador presidido por M Sc Eterio ALVA MUÑOZ teniendo como miembros a Dr Víctor LECCA ZAVALA (integrante) y Dr Carlos AZAÑERO DIAZ (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de **licenciado en Biotecnología** realizado por los tesisistas **Elida Mariana HORA LOPEZ** y **Carlos Eduardo RUIZ VELASQUEZ** quienes sustentaron la tesis intitulada **Efecto de la temperatura y pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre Klebsiella pneumoniae**

Terminada la sustentación los tesisistas respondieron a las preguntas formuladas por los miembros del jurado

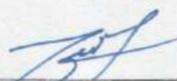
El jurado luego de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de **17** puntos, según artículo 111 del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2002-CU-R-UNS)

Siendo las 17 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del jurado en señal de conformidad



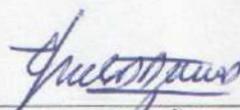
Nombre: Eterio ALVA MUÑOZ

Presidente



Nombre: Víctor LECCA ZAVALA

Secretario



Nombre: Carlos AZAÑERO DIAZ

Integrante

Distribución: Integrantes J.E (03), tesisistas () y archivo FC (02).



## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: ELIDA MARIANA HORA LOPEZ  
Título del ejercicio: INFORME DE TESIS - 2025  
Título de la entrega: Efecto de la temperatura y pH en la actividad lítica de bacterió...  
Nombre del archivo: INFORME\_DE\_TESIS\_FINAL.pdf  
Tamaño del archivo: 2.24M  
Total páginas: 91  
Total de palabras: 18,034  
Total de caracteres: 98,207  
Fecha de entrega: 08-abr.-2025 12:02p. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entrega: 2639371947

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Efecto de la temperatura y pH en la actividad lítica de bacteriófagos  
aislados de aguas residuales, sobre *Klebsiella pneumoniae*

AUTORES:

BACH. Hora López Elida Mariana

BACH. Ruiz Velásquez Carlos Eduardo

ASESOR:

Dr. Azañero Díaz Carlos Alberto

Nuevo Chimbote, Perú

2024

# Efecto de la temperatura y pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales, sobre *Klebsiella pneumoniae*

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	8%
2	<a href="http://www.dspace.unitru.edu.pe">www.dspace.unitru.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://repositorio.uns.edu.pe">repositorio.uns.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
4	<a href="http://www.scielo.org.co">www.scielo.org.co</a> Fuente de Internet	<1%
5	<a href="http://repositorio.xoc.uam.mx">repositorio.xoc.uam.mx</a> Fuente de Internet	<1%
6	<a href="http://sedici.unlp.edu.ar">sedici.unlp.edu.ar</a> Fuente de Internet	<1%
7	<a href="http://repositorio.upao.edu.pe">repositorio.upao.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="http://www.dspace.uce.edu.ec">www.dspace.uce.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1%
9	<a href="http://up-rid.up.ac.pa">up-rid.up.ac.pa</a> Fuente de Internet	<1%
10	<a href="http://www.redalyc.org">www.redalyc.org</a> Fuente de Internet	<1%
11	<a href="http://cybertesis.unmsm.edu.pe">cybertesis.unmsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1%

## **Dedicatoria**

Elida Mariana Hora López:

Dedico esta tesis a mi madre, cuyo amor incondicional y sacrificio diario han forjado la persona que soy hoy. A Lorena Ponte, por su apoyo incondicional, su inspiración y su confianza en mis capacidades ha sido un faro que me ha guiado en este camino. Gracias por ser una luz en mi camino.

Ruiz Velásquez Carlos Eduardo:

A mi querida mamá Clara, cuyo amor y dedicación han sido mi fuente de inspiración y motivación. Gracias por creer en mí y apoyarme en cada paso de mi camino.

A mi hermana Sandra, compañera de aventuras y momentos inolvidables. Tu presencia en mi vida es un regalo precioso.

A mi abuelito José, quien, aunque ya no esté con nosotros, su legado y enseñanzas siguen vivas en mi corazón. Te extraño y te recuerdo con cariño.

Y a mi abuela Elena, una mujer fuerte y sabia, cuyo amor y apoyo han sido mi roca en momentos difíciles. Gracias por ser un ejemplo a seguir y por estar siempre presente en mi vida.

A todos ustedes, les dedico este trabajo con todo mi amor y gratitud. Espero que se sientan orgullosos de mí y que este logro sea un reflejo del amor y apoyo que me han brindado a lo largo de los años.

## **Agradecimiento**

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de esta investigación.

Agradecemos conjuntamente al *Dr. Guillermo Gonzáles Cabeza*, quien nos introdujo al campo de los bacteriófagos.

A nuestro asesor *Carlos Alberto Azañero Díaz*, por su guía, paciencia y valiosos consejos durante todo el proceso de investigación. Su experiencia y orientación fueron fundamentales para culminar este trabajo con éxito.

De manera individual, *Elida Mariana Hora López* agradezco a *Lorena Del Rocío Ponte Avelino*, por su apoyo y orientación han sido fundamentales en el desarrollo de esta tesis. Gracias por compartir tu conocimiento y por estar siempre dispuesta a ayudarme. Tu dedicación y compromiso han hecho una gran diferencia en mi trabajo, y no podría haber llegado hasta aquí sin ti. Estoy

verdaderamente agradecida por todo lo que has hecho.

De manera individual, *Carlos Eduardo Ruiz Velásquez* agradezco profundamente a Dios, por haberme guiado y fortalecido en este camino académico. Su presencia en mi vida me llena de gratitud y paz.

A mi mamá *Clara* y a mi hermana *Sandra*, gracias por ser mis pilares de amor y apoyo. Su dedicación y cariño han sido fundamentales en mi crecimiento personal y académico. Las quiero más que a nada en este mundo.

A mis queridos abuelos *José* y *Elena*, gracias por su legado de amor, sabiduría y valores. Su influencia en mi vida ha sido invaluable y los recuerdo con cariño y gratitud.

A mis tíos y a toda la familia Velásquez, gracias por su apoyo y cariño. Su presencia en mi vida es un regalo precioso. Este logro no habría sido posible sin el respaldo de todos ustedes.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Descripción y formulación del problema .....	15
1.2. Enunciado del Problema .....	16
1.3. Objetivos de la investigación.....	17
1.3.1. <i>Objetivo general</i> .....	17
1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	17
1.4. Formulación de la Hipótesis .....	17
1.5. Justificación e importancia .....	17
II. MARCO TEÓRICO .....	19
2.1. Antecedentes .....	19
2.2. Marco conceptual.....	21
2.2.1. <i>Bacteriófagos</i> .....	21
Estructura del bacteriófago.....	22
Clasificación del bacteriófago .....	23
Mecanismos de replicación. ....	23
Fagoterapia .....	27
2.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29
2.2.3. <i>Aguas residuales</i> .....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
3.1. Materiales.....	32
3.1.1. <i>Bacteria huésped activada</i> .....	32
3.1.2. <i>Cóctel de fagos aislados</i> .....	32
3.2. Métodos .....	33
3.2.1. <i>Diseño</i> .....	33
3.2.2. <i>Procedimiento</i> .....	34
3.2.2.1. <i>Activación de bacteria hospedera Klebsiella pneumoniae.</i> .....	34
3.2.2.2. <i>Curva de crecimiento de Klebsiella pneumoniae</i> .....	35

3.2.2.3. Aislamiento, purificación y amplificación de bacteriófagos. ....	36
3.2.2.4. Evaluación de la actividad lítica del bacteriófago. ....	39
3.2.2.5. Evaluación de temperatura y pH. ....	43
3.2.2.6. Determinación de la estabilidad de la actividad lítica del bacteriófago. .....	45
3.2.2.7. Almacenamiento de Bacteriófagos .....	45
3.2.3. Análisis de datos .....	45
IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN .....	46
4.1. Efecto de la temperatura en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre <i>K. pneumoniae</i> .....	46
4.2. Efecto del pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre <i>K. pneumoniae</i> .....	48
4.3. Demostrar la estabilidad de la actividad lítica, la tasa de adsorción y el ciclo de infección del bacteriófago sobre <i>K. pneumoniae</i> a diferentes rangos de temperatura y pH. ....	51
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
VII. ANEXOS.....	72
ANEXO I: ANTIBIOGRAMA DE BACTERIA <i>K. pneumoniae</i> .....	72
ANEXO II: COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR HIERRO TRIPLE AZÚCAR .....	73
ANEXO III: COMPOSICIÓN DEL CALDO LURIA BERTANI (CALDO LB) .....	73
ANEXO IV: COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR NUTRITIVO .....	73
ANEXO V: COMPOSICIÓN DE BUFFER SM .....	74
ANEXO VI: COMPOSICIÓN DEL TOP AGAR .....	74
ANEXO VII: EQUIPOS Y MATERIALES .....	75
ANEXO VIII: IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO.....	78
ANEXO IX: FASES 01, 02, 03 Y 04.....	82
ANEXO X: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del bacteriófago T <sub>4</sub> .....	22
Figura 2. Esquema de una curva de un ciclo lítico.....	25
Figura 3. Esquema de los ciclos líticos y lisogénicos de los fagos.....	26
Figura 4. Procedimiento de metodología de la investigación .....	34
Figura 5. Efecto de la temperatura en la actividad lítica de bacteriófagos .....	47
Figura 6. Efecto del pH en la actividad lítica de bacteriófagos .....	49
Figura 7. Constante de adsorción (K).....	55
Figura 8. Curva de un solo paso .....	58
Figura 9. Cabina de bioseguridad nivel II marca Logic.....	765
Figura 10. Espectrofotómetro de luz visible marca Thermo Scientific .....	765
Figura 11. Agua destilada .....	776
Figura 12. Micropipetas.....	776
Figura 13. Incubadora marca Memmert .....	787
Figura 14. Autoclave marca Lab Tech.....	787
Figura 15. Medidor portátil de pH marca Hanna .....	798
Figura 16. Vial con cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	78
Figura 17. <i>Klebsiella pneumoniae</i> en agar MacConkey .....	79
Figura 18. <i>Klebsiella pneumoniae</i> en agar TSI .....	79
Figura 19. Agua residual de dos puntos diferentes .....	810
Figura 20. Diluciones seriadas .....	820

Figura 21. Unidades formadoras de placas (UFP) .....	821
Figura 22. Curva de crecimiento por conteo .....	862
Figura 23. Curva de crecimiento por densidad óptica .....	82
Figura 24. Título final (UFP/mL) por cada MOI .....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la temperatura en la actividad lítica de bacteriófagos.....	46
Tabla 2. Efecto del pH en la actividad lítica de bacteriófagos. ....	49
Tabla 3. Comparación de la actividad lítica bajo diferentes condiciones de temperatura y pH. ....	51
Tabla 4. Constante de Adsorción (K). ....	54
Tabla 5. Periodo de eclipse del fago. ....	56
Tabla 6. Resultados de antibiograma de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 27853. ....	732
Tabla 7. Composición del medio TSI.....	73
Tabla 8. Composición del Caldo Luria Bertani (Caldo LB). ....	743
Tabla 9. Composición del medio Agar nutritivo. ....	743
Tabla 10. Composición de Buffer SM.....	74
Tabla 11. Composición del Top Agar. ....	74
Tabla 12. Curva de crecimiento por conteo y según DO.....	873
Tabla 13. Multiplicidad de infección (MOI) en proporciones.....	85
Tabla 14. Porcentajes (%) y concentración de fagos libres (UFP/mL). ....	87
Tabla 15. Análisis de datos de temperatura. ....	88
Tabla 16. Análisis de datos de pH.....	90

## RESUMEN

Esta tesis tiene como objetivo evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad lítica de los bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *Klebsiella pneumoniae*. Se evaluaron tres temperaturas (35°C, 40°C y 50°C) y tres niveles de pH (6, 7 y 8).

La actividad lítica del bacteriófago se evaluó utilizando la técnica de doble capa para determinar su título y tasa de adsorción, lo que permitió medir los fagos libres a intervalos de tiempo. El ciclo de infección se analizó con la técnica de curva de un solo paso, lo que permitió calcular el periodo de eclipse, el periodo latente y el tamaño de explosión (burst size). La estabilidad térmica del bacteriófago se evaluó mediante incubación a distintas temperaturas y su estabilidad a diferentes pH ajustando estos con HCl y NaOH.

Los resultados indican que la actividad lítica es óptima a 35°C, con un 89% de estabilidad durante 60 minutos. A pH 7, la estabilidad también es máxima con una actividad del 89%. La tasa de adsorción mostró alta eficiencia, favoreciendo el inicio del proceso infeccioso, lo cual se reflejó en el ciclo de infección, con un periodo de eclipse de 20 minutos y un periodo latente hasta los 60 minutos.

En conclusión, el bacteriófago exhibe mayor estabilidad a temperaturas bajas y es sensible a condiciones extremas de pH. Las condiciones óptimas para su actividad lítica son 35°C y pH 7, lo que subraya la importancia de controlar estos factores para maximizar la eficacia de los tratamientos con bacteriófagos.

**Palabras claves:** *Klebsiella pneumoniae*, bacteriófagos, actividad lítica, temperatura, pH, estabilidad, fagoterapia.

## ABSTRACT

This thesis aims to evaluate the effect of temperature and pH on the lytic activity of bacteriophages isolated from wastewater against *Klebsiella pneumoniae*. Three temperatures (35°C, 40°C, and 50°C) and three pH levels (6, 7, and 8) were evaluated.

The lytic activity of the bacteriophage was assessed using the double-layer technique to determine its titer and adsorption rate, which allowed for the measurement of free phages at time intervals. The infection cycle was analyzed using the one-step curve technique, which allowed for the calculation of the eclipse period, the latent period, and the burst size. The thermal stability of the bacteriophage was assessed by incubation at different temperatures and its stability at different pH levels, adjusting these with HCl and NaOH.

The results indicate that lytic activity is optimal at 35°C, with 89% stability for 60 minutes. At pH 7, stability is also maximal, with an activity of 89%. The adsorption rate showed high efficiency, favoring the initiation of the infectious process. This was reflected in the infection cycle, with an eclipse period of 20 minutes and a latent period of up to 60 minutes.

In conclusion, the bacteriophage exhibits greater stability at low temperatures and is sensitive to extreme pH conditions. The optimal conditions for its lytic activity are 35°C and pH 7, which underscores the importance of controlling these factors to maximize the efficacy of bacteriophage treatments.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, bacteriophages, lytic activity, temperature, pH, stability, phage therapy.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Descripción y formulación del problema

El aumento de las infecciones causadas por bacterias multirresistentes representa un desafío significativo para la salud pública a nivel global. Entre estos patógenos, *K. pneumoniae* se destaca como uno de los más problemáticos debido a su capacidad para desarrollar resistencia a una amplia gama de antibióticos, incluyendo carbapenémicos, considerados como el último recurso terapéutico (World Health Organization [WHO], 2017). Esta situación ha impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas innovadoras, entre las cuales destaca el uso de bacteriófagos.

Los bacteriófagos, o fagos, son virus que infectan y lisan específicamente bacterias. Estos microorganismos han demostrado ser efectivos contra infecciones bacterianas resistentes debido a su especificidad, capacidad de coevolucionar con las bacterias y la ausencia de efectos secundarios graves en el ser humano (Abedon et al., 2011). En este contexto, la actividad lítica de los bacteriófagos se presenta como una herramienta prometedora, no solo para el control de patógenos en entornos clínicos, sino también en aplicaciones industriales y ambientales. Sin embargo, el rendimiento de los bacteriófagos está influenciado por factores ambientales como la temperatura y el pH, que pueden afectar su estabilidad y eficacia (Joerger, 2003).

Aguas residuales provenientes de centros médicos constituyen un reservorio importante de bacterias patógenas y bacteriófagos. Estas aguas no solo albergan microorganismos con potencial terapéutico, sino también ofrecen un escenario único para estudiar las interacciones entre fagos y bacterias bajo condiciones variables de temperatura y pH (Chan et al., 2013). La comprensión de cómo estos factores

ambientales afectan la actividad lítica de los bacteriófagos es esencial para optimizar su aplicación en el tratamiento de infecciones bacterianas.

El problema central que motiva esta investigación radica en la necesidad de evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la eficacia de bacteriófagos aislados contra *K. pneumoniae*. Aunque se han realizado estudios previos sobre la estabilidad y actividad de los fagos en condiciones controladas, persiste una brecha en el conocimiento sobre su comportamiento en entornos que imitan las condiciones reales, como las aguas residuales. Además, la diversidad genética y funcional de los bacteriófagos aislados de estas fuentes puede influir significativamente en su respuesta a diferentes condiciones ambientales (Rohde et al., 2018).

Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*. Este trabajo no solo contribuirá al entendimiento de los mecanismos que regulan la actividad de los fagos bajo distintas condiciones, sino que también proporcionará información útil para su aplicación efectiva en entornos clínicos y ambientales.

## **1.2. Enunciado del Problema**

¿Cuál es el efecto de la temperatura y el pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*?

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar el efecto de la temperatura en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*.
- Determinar el efecto del pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*.
- Demostrar la estabilidad de la actividad lítica, la tasa de adsorción y el ciclo de infección del bacteriófago sobre *K. pneumoniae* a diferentes rangos de temperatura y pH.

### **1.4. Formulación de la Hipótesis**

**H0:** Los cambios en la temperatura y el pH no afectan a la actividad lítica del bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*, manteniendo así su estabilidad.

**H1:** Los cambios en la temperatura y el pH afectan a la actividad lítica del bacteriófago aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*, ocasionando inestabilidad.

### **1.5. Justificación e importancia**

El incremento en la prevalencia de infecciones causadas por bacterias multirresistentes ha llevado a una crisis terapéutica global que requiere soluciones urgentes y sostenibles. En este contexto, los bacteriófagos ofrecen una alternativa

prometedora debido a su especificidad para atacar bacterias patógenas sin afectar a las bacterias beneficiosas ni a las células humanas (Abedon et al., 2011). A diferencia de los antibióticos tradicionales, los fagos pueden coevolucionar con sus hospedadores, lo que reduce significativamente el riesgo de resistencia a largo plazo (Chan et al., 2013).

La elección de *K. pneumoniae* como modelo de estudio se fundamenta en su relevancia clínica, ya que esta bacteria es una de las principales causantes de infecciones nosocomiales graves, como neumonía y septicemia, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Rohde et al., 2018). Además, la capacidad de *K. pneumoniae* para adquirir elementos genéticos que confieren resistencia múltiple convierte su control en un desafío significativo (WHO, 2017).

El estudio de la influencia de la temperatura y el pH en la actividad lítica de los bacteriófagos no solo es relevante desde una perspectiva biológica, sino también desde una aplicación práctica. Por ejemplo, los resultados podrían optimizar el diseño de terapias fágicas para pacientes, así como el desarrollo de sistemas de tratamiento de aguas residuales que utilicen fagos para reducir la carga bacteriana (Joerger, 2003). Asimismo, comprender cómo las condiciones ambientales afectan la eficacia de los bacteriófagos podría facilitar su implementación en países en desarrollo, donde las infecciones bacterianas son una causa importante de morbilidad y mortalidad.

Este estudio también contribuirá al avance del conocimiento científico sobre las interacciones entre bacteriófagos y bacterias en condiciones que simulan entornos reales, abordando una brecha clave en la investigación actual (Rohde et al., 2018). Finalmente, los resultados obtenidos podrán servir como base para futuros estudios sobre el uso de fagos en diferentes aplicaciones biotecnológicas y médicas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

En España, en el año 2021, Castro llevó a cabo un estudio con el objetivo de adquirir parámetros de crecimiento esenciales para los bacteriófagos, centrándose en la caracterización de dos fagos líticos, vB\_Kp-VAC110 y vB\_Kp-VAC70, que actúan sobre cepas de *K. pneumoniae* aisladas de hospitales. Castro reportó que el período de adsorción de la cepa VAC70 fue de 11 minutos, mientras que para VAC110 fue de solo 5 minutos. En términos de período de latencia y tamaño de explosión, se utilizó el método de curva de un paso, observando que VAC70 tenía un período de latencia de 15 minutos y un tamaño de explosión de 26 partículas por célula huésped infectada. En contraste, VAC110 presentó un período de latencia de 10 minutos y un tamaño de explosión de 9 partículas. Castro concluyó que el amplio rango de huésped y la actividad bacteriolítica de estos fagos aumentan su potencial para ser utilizados en terapia de fagos y en la formulación de cócteles de fagos en combinación con antibióticos.

Por otro lado, Domingo-Calap et al. (2020) realizaron un estudio en España donde aislaron cuatro fagos con capacidad de infectar *K. pneumoniae* tipo capsular K22 a partir de muestras ambientales obtenidas de plantas de tratamiento de aguas residuales en Valencia. A través de secuenciación completa, se determinó que estos fagos pertenecen a la familia Podoviridae, la cual codifica depolimerasas que permiten la digestión de las cápsulas específicas de *K. pneumoniae*. Los autores recomendaban la caracterización de la diversidad de fagos en muestras ambientales para desarrollar paneles que puedan ser utilizados en la tipificación y el control de cepas multirresistentes.

En Georgia, Karumidze et al. (2012) aislaron seis fagos líticos de *Klebsiella* provenientes de aguas residuales, pertenecientes a las familias Podoviridae y Siphoviridae. Se centraron en dos fagos, vB\_Klp\_5 y vB\_Klox\_2, de la familia Podoviridae, destacando sus propiedades, como cortos tiempos de latencia y alta resistencia a pH y cloroformo, lo que los hace adecuados para ser incluidos en cócteles de fagos como agentes terapéuticos.

Dini (2011) en Argentina, aisló 20 bacteriófagos de materia fecal vacuna, carne bovina picada y chorizo de cerdo, utilizando técnicas de recuento como el spot test y la doble capa. Los fagos de esta familia demostraron características que los convierten en candidatos primordiales para el biocontrol, perteneciendo al grupo T7, conocido por sus propiedades líticas. Además, Dini realizó análisis in vitro con uno de los fagos aislados, mostrando su efectividad en tratamientos in vivo.

En Perú, Punil (2017) se enfocó en aislar y caracterizar un bacteriófago lítico que infecta *Escherichia coli* a partir de la planta de tratamiento de aguas residuales "La Taboada". Este autor caracterizó parámetros físicos del fago  $\Phi$ GF1, que mostró estabilidad a temperaturas de 40 y 50°C durante 60 minutos de exposición. Se observó que un pH entre 5 y 8 es óptimo para su concentración, asimismo a mayor pH, aumenta el porcentaje de reducción en su concentración (afectando el grado de partículas vitales); caso contrario cuando es más ácido, reduce la concentración en escalas logarítmicas; sin embargo, ningún pH elimina las partículas vitales en su totalidad.

Finalmente, Meza (2016) comparó aguas contaminadas de Lima e Iquitos con el propósito de aislar y caracterizar bacteriófagos específicos para *Acinetobacter baumannii*, que presentan resistencia a desinfectantes y antibióticos. En total, se

aislaron 48 fagos líticos, de los cuales 27 fueron de Lima y 21 de Iquitos. De estos, 10 mostraron un alto potencial terapéutico, destacando uno con un tamaño de explosión de  $9.5 \times 10^9$  UFP (NSI814φSWI001).

## **2.2. Marco conceptual**

### **2.2.1. Bacteriófagos**

Son agentes infecciosos que infectan exclusivamente a bacterias, actuando como reguladores naturales de las poblaciones bacterianas al parasitarlas. Son conocidos como depredadores bacterianos, ya que pueden afectar a más de 140 géneros bacterianos diferentes. Los fagos desempeñan un papel fundamental en los ciclos biológicos naturales; siendo accesibles en su detección de cualquier ecosistema; por ello, en el planeta, 1031 fagos como masa biológica aproximadamente, siendo una de las entidades más abundantes (Reina J. y Reina N., 2018).

Para Tan et al., 2008, lograron aislar y caracterizar 8 fagos líticos de aguas residuales; el cual, utilizaron tres cepas diferentes de *E. coli* (TG, ER2738 y BL2) como huésped. Los métodos fueron por su morfología, análisis de ácidos nucleicos y perfil proteico. Además, demostraron que estos fagos son líticos por la similitud con bacteriófagos de la serie T, asimismo, no encontraron fagos lisogénicos en estas muestras de aguas residuales.

En 1915, cuando Frederick Twort, un médico bacteriólogo británico, reportó haber observado la presencia de agentes filtrables y fue él quien aventajó la hipótesis de que podrían ser virus; no obstante, fue hasta dos años después cuando el Francocanadiense Félix D'Herelle, les dio el nombre de bacteriófagos por primera vez en 1917 (Segundo et al., 2010).

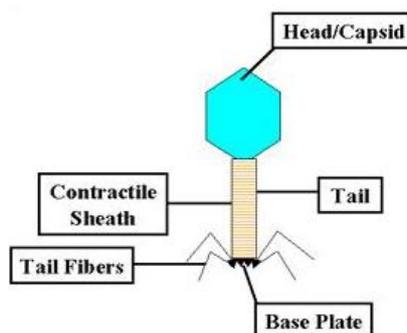
## Estructura del bacteriófago

Compuesta por ácidos nucleicos y proteínas, por su tipo puede presentar ADN o ARN; asimismo, sus bases modificadas protegiéndose de sus endonucleasas del huésped durante la infección. Los fagos comunes presentan estructura de cabeza o cápside variando su tamaño y forma, siendo icosaédricos (20 caras), y otros filamentosos (Figura 1); el cual, cumple la función de cubierta protectora para el ácido nucleico; compuesta por capa de lípidos, proteínas y carbohidratos. Sus componentes permiten la interacción del virus con su célula hospedera; y por último, la cápside protege al ácido nucleico, facilita la fijación y penetración del virus en la célula hospedadora (Brooks et al., 2010).

Muchos fagos pueden presentar una cola unida a su cabeza permitiendo el pase del ácido nucleico durante la infección. Al extremo de la cola, los fagos más complejos, T4, presentan una placa en la base, y una o más fibras unidas a ella; las cuales, están involucradas en la unión de los fagos a la célula bacteriana (Mayer, 2015). La mayoría de los fagos del orden Caudovirales, las familias Siphoviridae, Myoviridae y Podoviridae poseen cola, los fagos poliédricos, filamentosos y pleomórficos, constituyen menos de 4% de estos virus (Jorquera et al., 2015).

**Figura 1.**

Estructura del bacteriófago T<sub>4</sub>.



*Nota:* Tomado de Bacteriófagos, por Mayer, 2015.

## **Clasificación del bacteriófago**

Según el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus, los bacteriófagos se dividen en 13 familias distintas, clasificadas según su forma, tamaño, tipo de ácido nucleico y la presencia o ausencia de envolturas o lípidos en su estructura. Muchos de estos bacteriófagos pertenecen a la orden Caudovirales, que se caracteriza por tener cabezas icosaédricas y colas, así como ADN de doble cadena en su composición (Ackerman, 2001).

Según las características morfológicas de la cola, están clasificados en tres familias, caracterizadas por ser fagos sin membrana lipídicas, compuestos de una cabeza con simetría icosaédrica: Myxoviridae (cola contráctil), Siphoviridae (cola larga no contráctil) y Podoviridae (cola extremadamente corta), También se encuentra clasificados según su forma poliédrica (familia Microviridae, Corticoviridae y Tectiviridae) o pleomórficas sin cápside (Plasmaviridae y Fuselloviridae), así como los fagos filamentosos que puede ser largos o cortos, y se agrupan en 3 familias (Inoviridae, Lipothrixviridae y rudiviridae).

## **Mecanismos de replicación.**

**Ciclo lítico**, durante este ciclo el fago se replica en el interior de la bacteria, el proceso finaliza con la lisis del huésped inducida por el fago y la liberación de la progenie. Para la replicación, el fago hace uso de la maquinaria metabólica de la célula hospedadora (Dini, 2011).

En la primera etapa del proceso de infección, los bacteriófagos reconocen los receptores en la superficie celular, los cuales varían según el tipo de bacteria. Los fagos se unen a la bacteria a través de receptores celulares como proteínas de

cápside, cola, placa basal o fibras. En las bacterias gram positivas, los receptores pueden incluir elementos de peptidoglucano, ácidos teicoicos, lipoteicoicos y proteínas asociadas a la pared celular, mientras que en las bacterias gram negativas, pueden incluir componentes de los lipopolisacáridos (LPS), proteínas de la membrana externa, porinas y proteínas de transporte. Un mismo fago puede reconocer varias moléculas como receptores en su estructura, lo que amplía su rango de huéspedes potenciales (Punil, 2017).

Una vez dada la adsorción del bacteriófago, se produce un cambio en la estructura de la membrana (celular), generando un poro donde se contrae la vaina del fago, ocasionando la inyección del genoma viral que se desplaza desde la cápside hasta el citoplasma bacteriano tomándole desde segundos hasta minutos. Esta transferencia, se hace posible gracias a la liberación de la presión de la cápside (Letellier et al., 2004).

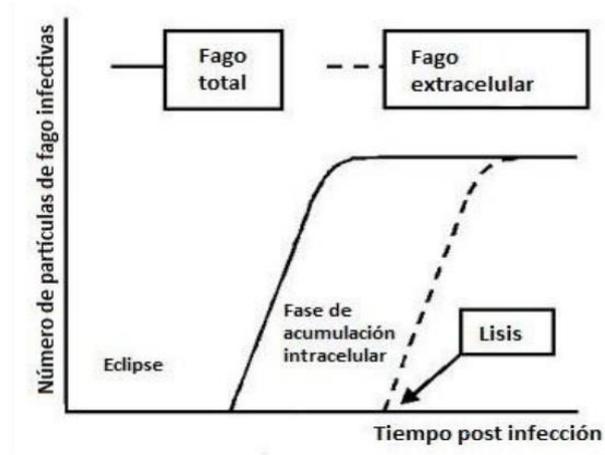
Posteriormente, la replicación depende del genoma del fago y de la cepa hospedera; puesto que, en este proceso utilizará la maquinaria de replicación de su hospedero. Además de replicarse el ADN, también genera proteínas nuevas en su estructura del bacteriófago, usando las enzimas de la célula huésped, como ARN polimerasa, ADN polimerasa, ribosomas y nucleótidos. Asimismo, el ARNm tardío codifica proteínas que son esenciales para la formación de la estructura del bacteriófago, como la cápside y la cola, contribuyendo al ensamblaje del virus. Sin embargo, estas proteínas no se incorporan físicamente a la estructura final del bacteriófago. Además, algunas proteínas generadas por el ARNm tardío tienen la función específica de inducir la lisis celular, facilitando la liberación de los nuevos virus hacia el exterior (Engelkirk y Duben, 2011).

El ensamblaje de los fagos ocurre en el interior celular y una vez maduras, lisan a su hospedero para así liberar la progenie viral e infectar a otras bacterias. La lisis del hospedero puede ocurrir por acumulación de fagos maduros en el interior de la célula, o por acción de enzimas específicas para esta función, como son: endolisina; el cual, degrada el peptidoglicano de la pared celular generando así inestabilidad bacteriana; y holina causa la formación de poros en la membrana bacteriana, lo que lleva a su desorganización (Engelkirk y Duben, 2011).

**Curva de crecimiento de bacteriófagos líticos**, seguimiento del tiempo durante el ciclo lítico del bacteriófago, donde se calcula el tiempo que demora un fago en replicarse y generar una progenie. El intervalo de tiempo, desde la infección del hospedero hasta la liberación de los fagos maduros por la lisis de la bacteria, se conoce como tiempo de latencia; mientras que; el número de virus liberado por la bacteria es llamado tamaño de explosión.

**Figura 2.**

Esquema de una curva de un ciclo lítico.



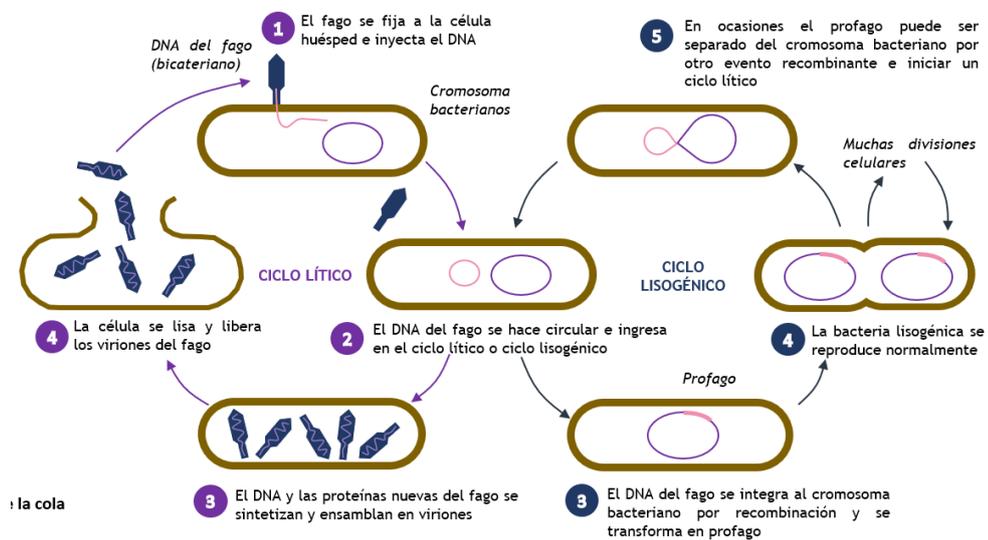
*Nota:* Tomado de Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), por C. Dini, 2011.

**Ciclo lisogénico**, son fagos que poseen la capacidad de incorporarse al genoma del huésped de forma reversible; es decir, realiza la replicación del genoma viral como profago (Figura 3), haciendo de forma paralela su replicación de ADN del huésped, durante la división celular; por consiguiente, la bacteria huésped se convierte en bacteria lisogénica. Estos fagos son llamados también profagos o fagos temperados, por su presencia en la evolución; el cual, genera diversidad bacteriana brindando características en la transferencia de genes; por ejemplo, toxinas, virulencia o resistencia a antibióticos (Dini, 2011).

Los genomas de los profagos se dividen en 2 grandes grupos; el primero, interviene en la integración y mantenimiento del genoma vírico; y segundo, induce la escisión llevándolo al ciclo lítico (Punil, 2017).

**Figura 3.**

Esquema de los ciclos líticos y lisogénicos de los fagos.



*Nota.* Adaptado de Microbiology: an introduction, por G. Tortora et al., 2010.

Al instante que la bacteria lisogénica es expuesta a condiciones adversa finaliza el estado lisogénico, y a este proceso se denomina inducción; asimismo, favorece en desecación, exposición a luz UV o radiación ionizante, exposición a los químicos mutagénicos, etc. (Mayer, 2015).

### **Fagoterapia**

La fagoterapia es una alternativa terapéutica basada en el uso de bacteriófagos, virus que infectan y destruyen bacterias de manera específica. Su relevancia ha cobrado mayor fuerza ante la creciente amenaza de la resistencia antimicrobiana, fenómeno que limita la eficacia de los antibióticos convencionales y complica el tratamiento de infecciones causadas por patógenos como *K. pneumoniae*. En este contexto, los bacteriófagos ofrecen una solución prometedora debido a su capacidad para atacar cepas bacterianas multirresistentes, contribuyendo así al desarrollo de nuevas estrategias de control bacteriano, especialmente en ambientes de alto riesgo como las aguas residuales (Kortright et al., 2019).

Los primeros ensayos utilizando este tratamiento como terapia para combatir infecciones bacterianas, 1919, en el Hospital Enfants-Malades de París, Félix d'Herelle realizó exitosos experimentos utilizando bacteriófagos para tratar la disentería en un niño de 12 años. D'Herelle empleó una preparación de bacteriófagos dirigida específicamente contra cepas de *Shigella*, seleccionadas para tratar al niño que padecía una forma severa de disentería, caracterizada por entre 10 y 12 deposiciones diarias con presencia de sangre. Se suministró 2 mL del preparado; horas después, el niño presentó solo 3 deposiciones con sangrado; en la noche, hubo ausencia de sangrado. Luego de las observaciones diarias, el niño mostró recuperación. Por ello, este preparado fue eficaz, y se corroboró en niños entre 3 y 10 años; el cual, presentaban los mismos síntomas teniendo su recuperación en 24

h. Otro estudio en 1921, por Richard Bruynoghe y Joseph Maisin, utilizaron bacteriófagos para tratar infecciones estafilocócicas de piel (Prada et al., 2015).

Asimismo, en Alejandría, Egipto, hubo un caso con 4 pacientes que estaban en barco, pasaban a través del canal de Suez y padecían de peste bubónica, enfermedad causada por *Yersinia pestis*. Entonces, D'Herelle les inyectó bacteriófagos antipeste en los ganglios linfáticos y los pacientes se recuperaron rápidamente (García et al., 2003).

En 1923, dos médicos de Baylor, obtuvieron exitoso resultado en su ensayo de terapia con fagos realizado en Estados Unidos; el cual, alegó que los bacteriófagos se pueden emplear como nueva arma capaz de combatir enfermedades infecciosas (Gokar et al., 2014).

En las décadas de 1920 y 1930, se propagaron los brotes de cólera en la India considerándose zona endémica. Por consiguiente, suministraron 2 mL de bacteriófagos específicos para este brote, diluidos en 20 mL de agua, redujeron síntomas y mortalidad por esta enfermedad (Frunciano, 2007).

La fagoterapia usada por D'Herelle fue controversial; por falta de conocimiento de la biología de fagos, error en los protocolos experimentales, falta en el uso de fagos líticos o lisogénicos como control, presencia de celulares bacterianos en el proceso de lisis y poca información sobre farmacocinética, para certificar la eliminación de partículas fágicas; por ello, aparecen los antibióticos, y así el abandono del uso de terapia de fagos en Occidente (Segundo et al., 2010).

Sin embargo, la búsqueda de tratamientos o alternativas de solución contra bacterias multirresistentes, abre el interés al uso de esta técnica siendo importante

para varias ramas como; agricultura, ganadería y medicina humana. Brindando ciertas ventajas al usar esta terapia de fagos:

- Alta especificidad de infección.
- Mecanismo de acción distinto a los diversos antibióticos, siendo efectivos incluso frente a bacterias multirresistentes.
- Capacidad de mutar para adaptarse y superar la resistencia de las bacterias a la infección.
- Los bacteriófagos tienen la capacidad de estimular de manera efectiva el sistema inmunitario adaptativo.

Para obtener resultados eficaces al emplear fagos, se debe conocer el tipo de fago, con características de ser inocuos para la flora comensal y su resistencia en el pasaje gastrointestinal, para así obtener concentraciones suficientes que provoquen infección (Dini, Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), 2011).

### **2.2.2. *Klebsiella pneumoniae***

Patógeno bacteriano asociado a infecciones nosocomiales, afectando a los pacientes con problemas en su sistema inmunológico; el cual, ocasiona alta morbilidad y mortalidad (Gonzales et al., 2013). Esta bacteria es bacilo Gram negativos, no móvil (por ello sin flagelo) y pertenece a Enterobacteriaceae (familia), se observa su forma de bastón, corta, mide entre 1-2  $\mu\text{m}$  y 0.5-0.8  $\mu\text{m}$ , de largo y diámetro respectivamente. Se encuentran individualmente, en cadenas, algunas veces en grupo, y posee una cápsula prominente (Izquierdo, 2003).

Esta especie puede desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno libre; por consiguiente, se considera especie anaeróbica facultativa y sobrevive en pH alcalino, siendo su desarrollo óptimo en medio con pH neutro (López y Echevarría, 2010). En su proceso fermentativo de lactosa (posee enzimas  $\beta$ -lactamasas), su formación de gas en 48 horas, entre 15°C y 40°C. Posee cápsula que protege de la desecación; y esta, aumenta su virulencia al actuar como una barrera física, evadiendo la respuesta inmune del hospedero. *K. pneumoniae* en la naturaleza se encuentra en superficies de aguas, tierra, plantas o en las mucosas de algunos mamíferos como caballos, cerdos y humanos.

Los principales reservorios para la transmisión, se encuentran en el ambiente hospitalario, tracto gastrointestinal de los pacientes y manos del personal al cuidado de ellos. La infección del tracto urinario es más común para esta bacteria Gram negativo, como también *E. coli*; y ambas representan entre 3% y 7% de infecciones bacterianas a nivel mundial; el cual, hace que su ubicación esté dentro de 8 patógenos hospitalarios más importante (López y Echevarría, 2010). Esto se debe, por  $\beta$ -lactamasas (mediadas por plásmidos), puesto que dificulta los tratamientos contra infecciones por su resistencia de antibióticos del grupo  $\beta$ -lactámicos (Gonzales et al., 2013).

### **2.2.3. Aguas residuales**

Las aguas residuales municipales, son entidades con mayor carga fecal. Las aguas residuales, se cree que su origen es producto de algún desecho industrial de todas las fábricas que existen, también se le atribuye al título por la red de alcantarillado de toda la ciudad (Ramos, 2008). Su evaluación fue por la densidad de fagos infecciosos en estas aguas; el cual, fue por observación directa mediante métodos de cultivo y partículas de ellos. Por ello, existen pocos resultados

cuantitativos sobre la densidad de estos fagos que portan genes bacterianos en el ambiente (Muniesa et al., 2010).

Las aguas residuales contienen abundantes enterobacterias, que sirven como huésped susceptible y adaptable para el crecimiento de bacteriófagos (Tan et al., 2008). Cada año, se reportan casos sobre la presencia de productos farmacéuticos en aguas residuales provenientes de aguas albañal. Diversos investigadores detallan que estas aguas representan un problema, debido a las elevadas concentraciones de enterobacterias, coliformes fecales, como aseveran los autores anteriores. La concentración de bacterias en aguas de albañal de hospitales fue de  $2.4 \times 10^3$  100 mL<sup>-1</sup> a  $3 \times 10^5$  100 mL<sup>-1</sup>. Además, los efluentes de un hospital fueron identificados enterovirus y adenovirus (como indicadores de contaminación viral) (Ramos, 2008).

Las aguas residuales que fluyen a través de los sistemas de alcantarillado, contienen la comunidad microbiana compleja, siendo los bacteriófagos tan abundantes como las bacterias o incluso más. Se han aislado fagos que infectan cepas comunes y patógenos bacterianos transitorios en aguas residuales sin tratar. Sin embargo, los fagos del intestino humano no se replican durante su tránsito por las alcantarillas; sino, predominan en la entrada de las plantas de tratamiento de aguas residuales; el cual, las poblaciones dominantes de bacterias y fagos sufren rápidos cambios. Se realizan algunas investigaciones sobre aplicación de fagos que controlen patógenos bacterianos en estas aguas, o bacterias que no permitan la eficacia de los tratamientos de estas aguas, incluyendo la formación de biopelículas en las membranas (Ballesté et al., 2022).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. *Bacteria huésped activada*

El microorganismo utilizado en este estudio fue proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Privada Antenor Orrego, ubicada en Trujillo, Perú. Se trata de un bacilo Gram negativo, perteneciente al género *Klebsiella* y a la especie *K. pneumoniae*, con la denominación ***Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853**. Según el antibiograma realizado (ver ANEXO I), se trata de una bacteria multirresistente a varios antibióticos, incluyendo ampicilina, sulbactam, cefazolina, ceftriaxona y sulfametoxazol.

##### 3.1.2. *Cóctel de fagos aislados*

El cóctel de fagos utilizado en este estudio fue preparado a partir de una mezcla de bacteriófagos aislados de aguas residuales. Los fagos incluidos en el cóctel fueron seleccionados en función de su capacidad para infectar *K. pneumoniae*. El cóctel fue preparado en condiciones estériles, asegurando la homogeneidad de la mezcla y la concentración adecuada de cada fago. La titulación del cóctel de fagos se realizó previamente para determinar el número de unidades formadoras de placas (UFP/mL) y asegurar la actividad lítica en las condiciones experimentales.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Diseño

La investigación se enmarca dentro del enfoque cuantitativo y adopta un diseño experimental simple unifactorial. De acuerdo con Sampieri et al. (2014), este tipo de diseño permite analizar de forma precisa la influencia de un único factor (variable independiente) sobre la variable de respuesta (variable dependiente), asegurando que las conclusiones derivadas se atribuyan exclusivamente a dicho factor.

En este estudio, las variables independientes consideradas son la temperatura y el pH, mientras que la variable dependiente corresponde a la actividad lítica. La evaluación de la actividad lítica de los bacteriófagos aislados de aguas residuales frente a *Klebsiella pneumoniae* se realizó analizando la termoestabilidad del bacteriófago a temperaturas de 35 °C, 40 °C y 50 °C, así como en diferentes condiciones de pH: 6, 7 y 8. Logrando tener dos diseños con cada variable.

Donde, X<sub>a</sub>: Temperatura (); Y<sub>b</sub>: pH (); A: Actividad lítica.

		Temperatura C°				
		X <sub>1</sub> (35)	X <sub>2</sub> (40)	X <sub>3</sub> (50)		
pH	7(Y)	X <sub>1y</sub>	X <sub>2y</sub>	X <sub>3y</sub>	A <sub>T</sub>	Actividad lítica
		Actividad lítica				

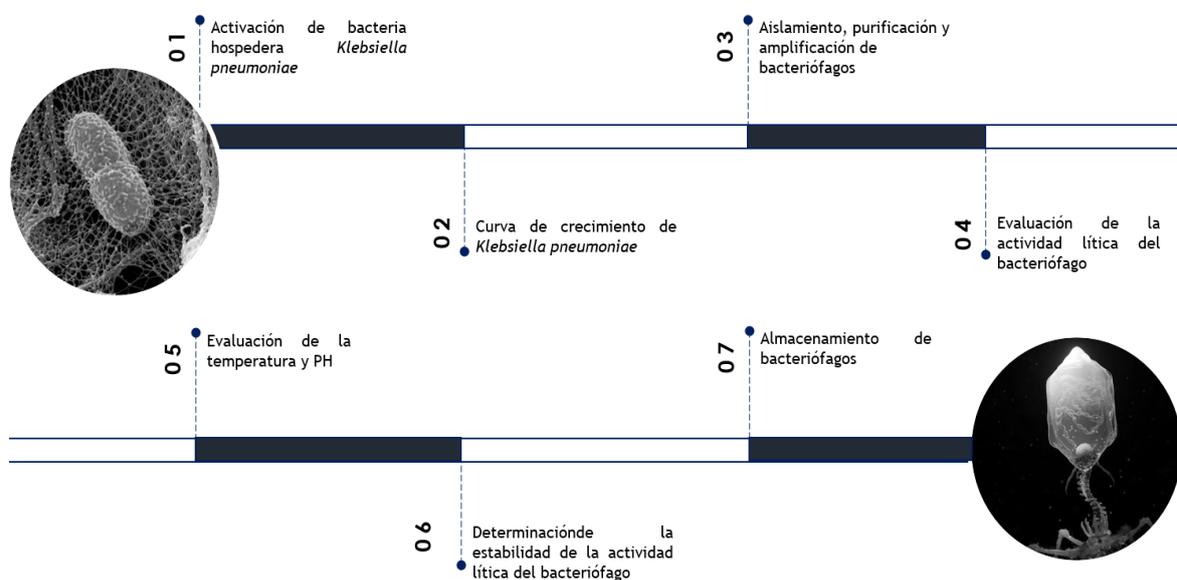
		pH				
		Y <sub>1</sub> (6)	Y <sub>2</sub> (7)	Y <sub>3</sub> (8)		
Temperatura C°	37(Y)	X <sub>1y</sub>	X <sub>2y</sub>	X <sub>3y</sub>	A <sub>T</sub>	Actividad lítica
		Actividad lítica				

### 3.2.2. Procedimiento

Los organismos fueron sometidos al siguiente procedimiento de 7 fases, con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de temperatura y pH en la actividad lítica del bacteriófago, las cuales fueron identificadas durante el desarrollo del experimento.

Figura 4.

Procedimiento de metodología de la investigación



Nota: Fuente propia

#### 3.2.2.1. Activación de bacteria hospedera *Klebsiella pneumoniae*.

A partir del vial con cultivo de *K. pneumoniae* ATCC 27853 (ANEXO I), se sembró usando el método de aislamiento con asa bacteriológica en placas con agar Nutritivo, durante 24 horas a 37°C.

### 3.2.2.2. Curva de crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*

Se realizó la curva de crecimiento bacteriano mediante el método de conteo en placa (UFC/mL); para ello, se preparó un cultivo overnight (cultivo de 16 horas) de *K. pneumoniae* ATCC 27853 en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) (ANEXO III). Después del tiempo de incubación, 0.1 mL del cultivo se inoculó en matraz (250 mL) con 100 mL de caldo LB. El matraz fue incubado en shaker con 300 rpm a 37°C por 9 horas.

Para conocer su concentración al momento de incubar el matraz, se extrajo 100 µL de muestra y se añadió en tubos de ensayo tapa rosca con 9.9 mL agua destilada estéril, homogeneizó; posteriormente, se extrajo 100 µL para el tubo siguiente realizando diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ , repitiéndose el proceso para las diluciones siguientes. Una vez que se realizó todas las diluciones, se extrajo 100 µL de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$ ; y se añadió en placas con agar nutritivo (ANEXO IV), y se extendió con ayuda de un asa Digralsky, posteriormente, fue incubado por 9 horas a 37°C.

Al mismo tiempo, se tomaron tres alícuotas de 300 µL y se colocó en cubetas de espectrofotometría para realizar su lectura en espectrofotómetro 550 nanómetros (nm), la primera lectura fue considerada como tiempo cero ( $T_0$ ), este procedimiento se realizó cada hora hasta cumplirse las 9 horas ( $T_{10}$ ). Pasado el tiempo de incubación se efectuó el conteo en placa determinándose el número de unidades formadoras de colonia de cada placa por mililitro (UFP/mL). Con los resultados recopilados se graficó el  $\log_{10}$  UFP/mL, y así se logró determinar la duración de cada fase de la curva de crecimiento (Maier et al., 2008).

Y para poder determinar la concentración de UFC/mL aplicamos la siguiente fórmula para cada dilución.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias por placas} \times \text{Factor de dilución}}{mL \text{ de muestra sembrada}}$$

\* *Factor de dilución: inverso de la dilución*

### **3.2.2.3. Aislamiento, purificación y amplificación de bacteriófagos.**

***Obtención de muestra de aguas de residuales***, se recolectaron 50 mL de aguas residuales (área de emergencia) en la temporada de septiembre del presente año, del Hospital Regional Eleazar Guzmán Barrón y Hospital La Caleta.

Para la recolección se utilizaron 2 frascos de vidrio estériles de 100 mL, con guantes y con precaución se tomó la muestra, e inmediatamente fueron trasladados en un cooler (con hielo para mantener las muestras), al laboratorio de Microbiología Molecular de General Control Group GCG S.A.C. Posteriormente, fueron centrifugadas a 2700 rpm por 15 min, luego se procedió a filtrar, usando filtros de membrana de 0.22 µm de porosidad, el sobrenadante se almacenó a -20°C (Punil, 2017).

***Aislamiento de bacteriófagos a partir de las aguas residuales de centros médicos***, se preparó cultivo overnight de *K. pneumoniae* en caldo LB, y se dejó durante 16 horas a 37°C. Fue necesario realizar enriquecimiento previo para aumentar la probabilidad de recuperar los fagos en las muestras (Cookies y Kropinski, 2009).

El aislamiento de los fagos se dio según la metodología de Dini (2011) con algunas modificaciones. El enriquecimiento de las muestras se realizó después de 24 horas, se tomó 1 mL de las muestras filtradas y almacenadas (en el proceso de obtención de muestra), se colocaron en dos tubos de ensayo que contenían 6 mL de

buffer SM (ANEXO V); los tubos, se rotularon y colocaron en agitación 300 rpm a 37°C por 10 minutos, a diferencia de Dini; no emplea agitación. Pasado el tiempo de incubación, se adicionó 1 mL de caldo LB con doble concentración a cada tubo, se colocó en centrífuga refrigerada durante 15 minutos a 4000 rpm, con la finalidad de remover los restos bacterianos. Luego de 15 minutos, se procedió a pasar el sobrenadante a tubos estériles con ayuda del filtro de membrana (0.22 µm de porosidad, con la finalidad de retener la masa microbiana y poder obtener los fagos) (aproximadamente 5.5 mL); en ello, se inoculó 500 µL del cultivo overnight de *K. pneumoniae* a tubos de ensayo, se agregó 1% de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 10 mM; posteriormente, fue incubado por 24 horas a 37°C.

Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionó medio volumen de cloroformo 4% v/v (50% de muestra, 50% de cloroformo), a cada tubo de ensayo, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reposo se colocaron los tubos a centrifugación durante 15 minutos a 4000 rpm, y luego se extrajo el sobrenadante.

***Confirmación de bacteriófagos extraídos mediante el método de la gota (Spot test)***, a través de este método se determinó la actividad lítica de los bacteriófagos seleccionados; el cual, se colocó una pequeña gota del fago sobre la placa inoculada con la bacteria, siendo este un método cualitativo mas no cuantitativo (Flores, 2017).

Esta prueba también fue usada durante las prácticas obteniendo resultados de actividad lítica como en trabajos como (Dini,2011; Flores, 2017; Punil, 1017); para ello se preparó un cultivo overnight de *K. pneumoniae* en 5 mL de caldo LB por 8 horas a 37°C. Pasadas las 8 horas, se rotularon dos tubos de ensayo (para cada punto de

muestreo del agua de albañal), con 5 mL de Top agar (6 g/L de agar en Caldo LB). Se agregó 200  $\mu$ L del cultivo overnight en cada tubo, se homogeneizó con vortex por 10 segundos, luego se añadió el contenido a dos placas Petri; asimismo, se agregó agar nutritivo fundido; posteriormente se mezclaron y se dejó solidificar por 15 minutos, luego se agregó 10  $\mu$ L (1 gota al centro), del sobrenadante extraído en aislamiento de bacteriófagos, se colocó en las placas petri por 24 horas a 37°C. Pasada las 24 horas, se puede lograr observar la presencia de zonas de aclaramiento evidenciando así la presencia de bacteriófagos (Cervený et al., 2002).

**Purificación de bacteriófagos**, al confirmar la presencia de fagos se procedió con esta función de placas de lisis; en el cual se utilizó la técnica de doble capa (ADC). En ello, implicó realizar diluciones de la muestra filtrada

Para la purificación de los bacteriófagos se realizaron diluciones seriadas de la muestra filtrada (aislamiento de bacteriófagos). Para ello, primero se tuvo que preparar 10 tubos con 9 mL de agua destilada estéril, cada uno rotulados desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ , luego se tomó 1 mL del filtrado agregando al primer tubo y homogeneizando, luego se transfirió 1 mL al siguiente tubo repitiendo hasta el último tubo. Posteriormente, se prepararon 10 placas Petri con agar nutritivo y fueron enumeradas del  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ , inoculando en cada placa Petri 200  $\mu$ L de cultivo overnight de *K. pneumoniae* en fase logarítmica (a las 8 horas de cultivo), más 200  $\mu$ L de cada dilución de bacteriófagos con 5 mL de Top agar, para finalizar las placas se dejaron en incubación durante 24 horas a 37°C.

Después de realizar la técnica de la doble capa se identificaron las placas de lisis (halos donde no se observa crecimiento bacteriano), únicas con solo una morfología; las cuales, se sembraron en tubos estériles con 5 mL de caldo LB doble

concentrado, agregándole 200  $\mu$ L de cultivo overnight de *K. pneumoniae* en fase logarítmica, incubando por 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se repitió la técnica de la doble capa con la finalidad de obtener otra placa lítica aislada, este proceso se realizó por triplicado (Akhtar et al., 2014).

**Amplificación de Bacteriófagos**, una vez logrado bacteriófagos puros, se prepararon 50 mL de caldo LB doble concentrado en frasco Schott; el cual, se adicionó 1 mL del medio LB doble concentrado conteniendo los bacteriófagos y 1.5 mL de cultivo overnight de *K. pneumoniae* en fase logarítmica, y se incubó a 37°C por 24 horas.

Pasado las 24 horas, observamos un aclaramiento en el caldo, debido a la actividad lítica de los bacteriófagos; y por ello, se sembró 1 mL de cultivo overnight en 50 mL de caldo LB doble concentrado (siendo este el control de crecimiento bacteriano). Posterior a ello, se agregó cloroformo 4% v/v (2 mL) y se llevó a centrifugar a una velocidad de 5000 rpm a 4°C durante 10 minutos, el sobrenadante se vertió en un frasco Schott y el filtrado (con ayuda de un filtro de membrana) se almacenó a 4°C en oscuridad (Wong, 1994).

#### **3.2.2.4. Evaluación de la actividad lítica del bacteriófago.**

**Determinación de multiplicidad de infección**, se entiende por multiplicidad de infección (MOI) a la relación entre el número de bacteriófagos (UFP/mL) y el número de células objetivo, en este caso, las bacterias huésped (UFC/mL). Para ello, se evaluaron tres proporciones: 1, 0.1 y 0.01. Estas fueron llevadas a incubación durante 37°C por 4 horas.

- **MOI 1:** Donde existe 10 bacteriófagos por cada bacteria.

$$MOI = \frac{1 \times 10^9 \text{ UFP/mL}}{1 \times 10^8 \text{ UFC/mL}} = 10$$

- **MOI 0.1:** Donde existe 1 bacteriófago por cada bacteria.

$$MOI = \frac{1 \times 10^8 \text{ UFP/mL}}{1 \times 10^8 \text{ UFC/mL}} = 1$$

- **MOI 0.01:** Donde existe 0.1 bacteriófagos por cada bacteria (o 1 bacteriófago por cada 10 bacterias).

$$MOI = \frac{1 \times 10^7 \text{ UFP/mL}}{1 \times 10^8 \text{ UFC/mL}} = 0.1$$

Después, se procedió a centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos. Luego el sobrenadante fue filtrado y se determinó el título de cada proporción, mediante la técnica de la doble capa (Zhang, 2014).

**Determinación de la tasa de adsorción**, en un matraz de 50 mL de cultivo se adicionó 500 µL del bacteriófago, de tal modo que la proporción entre ellos tuvo una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 y se dejó en una incubadora con agitación a 37°C, luego se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos). Se tomó la medida de los fagos libres, el cual fue determinado mediante la técnica de la doble capa (RAHAMAN et al., 2014).

La evaluación de la adsorción fue realizada mediante el porcentaje de fagos libres utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de bacteriófagos libres} = (N/N_0) \times 100$$

*Dónde:*

- $N_0$  son las UFP por mililitro de fagos en el  $T = 0$  min
- $N$  es UFP por mililitro en el  $T = 10, 20, 30, 40, 50$  y  $60$  min

La tasa de adsorción se halló mediante la fórmula empleada por Kropinski

$$(2009): K = \frac{2.3}{Bt} \log \frac{P_0}{P}$$

*Donde:*

- $K$ : es la constante de adsorción (mL/min)
- $B$ : es la concentración de bacterias
  - $P_0$ : Título inicial de bacteriófagos no adsorbidos
  - $P$ : Título final de bacteriófagos no adsorbidos
  - $t$ : es el intervalo de tiempo entre  $P_0$  y  $P$

**Determinación del ciclo de infección**, se llevó a cabo mediante la técnica de la curva de un solo paso (one step). Inicialmente, se tomó 100  $\mu$ L de un cultivo overnight de *K. pneumoniae* y se agregó a un tubo con caldo LB, el cual se incubó a 37°C hasta que alcanzamos una densidad óptica que correspondió a la escala de McFarland de 0,5. Una vez que la densidad logró alcanzar este valor, se tomaron alícuotas de 1 mL de bacterias y fagos, los cuales se mezclaron en un tubo de microcentrífuga, obteniendo una multiplicidad de infección de 0,01.

Esta mezcla fue incubada durante 20 minutos a 37°C para permitir la absorción de los fagos por las bacterias. Después de la incubación, se centrifugaron los tubos a 8000 rpm durante 5 minutos para eliminar los fagos no absorbidos, y el precipitado se volvió a suspender en 1 mL de LB. Este procedimiento se repitió tres veces para obtener triplicados (Middelboe et al. 2010).

Luego del lavado del precipitado, procedimos a resuspender en 1 mL de LB y a homogeneizar mediante un vortex. De este cultivo resuspendido, se tomó una muestra que fue etiquetada como "tubo A", y se transfirió 100  $\mu$ L a un matraz que contiene 100 mL de caldo LB. Además, se tomaron dos muestras de 1 mL cada una, que sirvieron como tiempo cero (T=0). En el primer tubo de T=0, se añadió 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó y homogeneizó en vortex durante 1 minuto, y luego fue centrifugado a 8000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa se separó del cloroformo y se trasladó a otro tubo de microcentrífuga. Se realizaron diluciones seriadas de esta muestra en solución salina estéril y se determinó el título mediante la técnica de doble capa para calcular el periodo de eclipse del virus. El segundo tubo a diferencia del primero, después de ser homogeneizado se procedió a diluir de la misma forma, luego, se halló su título mediante la técnica de doble capa. Este procedimiento fue elaborado para determinar el tiempo de periodo latente.

Por otro lado, en el segundo tubo de T=0, después de la homogeneización, se diluyó y se halló su título mediante la técnica de doble capa para determinar el periodo latente. Se tomaron muestras en intervalos regulares, inicialmente cada 5 minutos hasta el minuto 10, y luego cada 10 minutos durante 50 minutos para ambos tubos. El cultivo sobrante del tubo A se centrifugó, se realizaron diluciones y se determinó el título para calcular la cantidad de fagos libres (Middelboe et al. 2010). Este protocolo completo permitió comprender los diferentes aspectos del ciclo de infección del bacteriófago en *K. pneumoniae*, incluyendo el cálculo del burst size.

El burst size se halló mediante la división del título fágico final entre el título inicial (T=0).

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de placas de lisis} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de inóculo}}$$

### **3.2.2.5. Evaluación de temperatura y pH.**

La evaluación de temperatura y pH, son sometidos a intervalos de tiempo seleccionados (20, 30 y 60 minutos) que fueron elegidos con el fin de monitorear la estabilidad del bacteriófago bajo condiciones específicas de temperatura y pH, observando cómo su viabilidad cambia en distintas etapas de exposición. En este contexto, el tiempo se considera una variable de control, utilizado para capturar los efectos progresivos de la temperatura y el pH sobre la actividad lítica del bacteriófago, manteniendo la homogeneidad que permite realizar comparaciones integrales entre ambas variables.

Respecto al intervalo de 20 minutos, Zhang et al. (2013) demostraron que la inactivación térmica de bacteriófagos puede volverse significativa en los primeros 30

minutos de exposición, lo que justifica la elección de este tiempo inicial para detectar cambios tempranos en la viabilidad del bacteriófago.

En cuanto a los 30 minutos, Liu et al. (2017) reportaron que los efectos sobre la viabilidad del bacteriófago se vuelven más evidentes a partir de este tiempo, brindando una visión más detallada sobre cómo los factores externos, como la temperatura y el pH, afectan al bacteriófago a lo largo del tiempo.

Por último, en relación con los 60 minutos, Jones et al. (2014) demostraron que después de este tiempo, las condiciones térmicas y de pH pueden inducir la pérdida casi completa de la viabilidad del bacteriófago, lo que lo convierte en un tiempo adecuado para evaluar los efectos a largo plazo sobre su estabilidad.

***Determinación de la termoestabilidad (Wong, 1994)***, se llevó a cabo una evaluación de la estabilidad térmica del bacteriófago a temperaturas de 35, 40 y 50 °C a un pH neutro (pH 7). Inicialmente, el bacteriófago fue diluido a una concentración de  $5.0 \times 10^8$  UFP/mL en caldo LB y luego expuesto a cada una de las temperaturas mencionadas utilizando baño María. Se tomaron alícuotas de las diluciones a intervalos de 20, 30 y 60 minutos, y se evaluó la viabilidad del bacteriófago.

***Determinación de la estabilidad a diferentes pH (Dini, 2011)***, se añadió 100 µL del bacteriófago a 900 µL de solución salina (0,9% p/v), ajustándose a diferentes valores de pH (6, 7 y 8) con HCl 1M y NaOH 1M. Como control, se utilizó una mezcla similar sin ajuste de pH. Estas muestras se incubaron durante 24 horas a 37°C y luego se reajustó el pH a 7. Posteriormente, se determinó el título del bacteriófago en cada muestra, a intervalos de 20, 30 y 60 minutos, para evaluar su viabilidad después del tratamiento.

### **3.2.2.6. Determinación de la estabilidad de la actividad lítica del bacteriófago.**

La estabilidad de la actividad lítica se evaluará considerando los parámetros de temperatura y pH óptimos previamente determinados. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones serán comparados con aquellos registrados en un entorno con temperatura y pH estándar, permitiendo analizar las variaciones en la actividad lítica del bacteriófago y su adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales.

### **3.2.2.7. Almacenamiento de Bacteriófagos**

Se tomaron alícuotas de 5 mL de los tubos de ensayo con bacteriófagos confirmados, se distribuyó en tubos Eppendorf y se almacenó en caldo LB a -20°C.

### **3.2.3. Análisis de datos**

Se analizó cómo las diversas temperaturas (35, 40 y 50 °C) y diferentes niveles de pH (6, 7 y 8) afectan la actividad lítica de bacteriófagos aislados sobre *K. pneumoniae*. El análisis estadístico se realizó en Microsoft Excel (Office 16), utilizando un nivel de confianza del 95% y un nivel de significancia de  $P < 0.05$ , para identificar diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos bajo las diferentes condiciones experimentales.

#### IV. RESULTADO Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Efecto de la temperatura en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae*

Se prepararon diluciones del bacteriófago para alcanzar una concentración inicial de  $5.0 \times 10^8$  UFP/mL, mediante la técnica de doble capa, inoculando placas de agar e incubando a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas; después de ello, estas muestras fueron sometidas a tres temperaturas diferentes ( $35^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$  y  $50^\circ\text{C}$ ) durante 1 hora. Mientras que la actividad lítica se calculó como un porcentaje de la actividad inicial utilizando fórmula donde se divide título después de incubación con el título inicial. (Ver tabla 1)

**Tabla 1.**

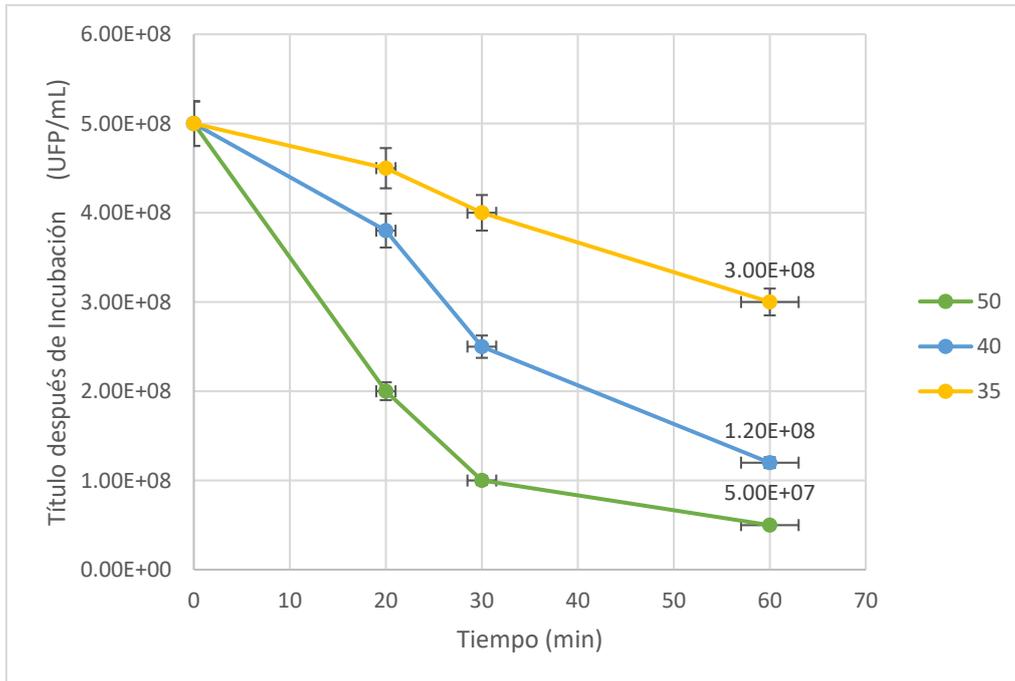
Efecto de la temperatura en la actividad lítica de bacteriófagos

Tiempo (min)	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Título Inicial (UFP/mL)	Título Después de Incubación (UFP/mL)	% de Actividad Lítica
0	35	$5.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$	100%
20			$4.5 \times 10^8$	90%
30			$4.0 \times 10^8$	80%
60			$3.0 \times 10^8$	60%
0	40	$5.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$	100%
20			$3.8 \times 10^8$	76%
30			$2.5 \times 10^8$	50%
60			$1.2 \times 10^8$	24%
0	50	$5.0 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$	100%
20			$2.0 \times 10^8$	40%
30			$1.0 \times 10^8$	20%
60			$5.0 \times 10^7$	10%

Nota: Fuente propia

**Figura 5.**

Efecto de la temperatura en la actividad lítica de bacteriófagos



*Nota:* Fuente propia

Estos resultados coinciden con los de Middelboe et al. (2001), quienes informaron que, a temperaturas moderadas, los bacteriófagos muestran una mejor estabilidad y su actividad lítica permanece relativamente intacta. Esto sugiere que temperaturas alrededor de 35 °C son tolerables para los fagos sin causar una pérdida considerable de su capacidad infectiva.

Por otro lado, a 40 °C, la viabilidad de los fagos se redujo considerablemente, alcanzando solo el 50% después de 30 minutos y el 24% después de 60 minutos, lo que indica que temperaturas ligeramente más altas comienzan a tener un impacto significativo en la estabilidad del bacteriófago. En concordancia con estos resultados, estudios previos como los de Reese et al. (2013) sugieren que temperaturas superiores a 37 °C comienzan a comprometer la viabilidad y la infectividad de los

fagos, debido probablemente a la desnaturalización de proteínas estructurales clave en la cápside viral.

Finalmente, a 50 °C, el bacteriófago mostró una rápida inactivación, con solo un 40% de viabilidad después de 20 minutos y solo un 10% después de 60 minutos. Este comportamiento es consistente con los hallazgos de Weitz et al. (2013), quienes informaron que altas temperaturas (por encima de los 45 °C) pueden inducir una desnaturalización acelerada de las proteínas virales y daños en el material genético del fago, lo que lleva a una pérdida de su capacidad lítica. Este patrón de inactivación térmica también se observó en otros estudios de estabilidad térmica de fagos, como los realizados por Guerin et al. (2015), quienes sugirieron que temperaturas superiores a 50 °C son particularmente dañinas para los bacteriófagos debido a la descomposición estructural irreversible de la cápside.

#### **4.2. Efecto del pH en la actividad lítica de bacteriófagos aislados de aguas residuales sobre *K. pneumoniae***

Se prepararon diluciones del bacteriófago para alcanzar una concentración inicial de  $5.0 \times 10^8$  UFP/mL, mediante la técnica de doble capa, inoculando placas de agar e incubando a 37°C durante 24 horas; después de ello, estas muestras fueron sometidas a tres pH diferentes (6,7 y 8) durante 1 hora. Mientras que la actividad lítica se calculó como un porcentaje de la actividad inicial utilizando fórmula donde se divide título después de incubación con el título inicial. (Ver tabla 2)

**Tabla 2.**

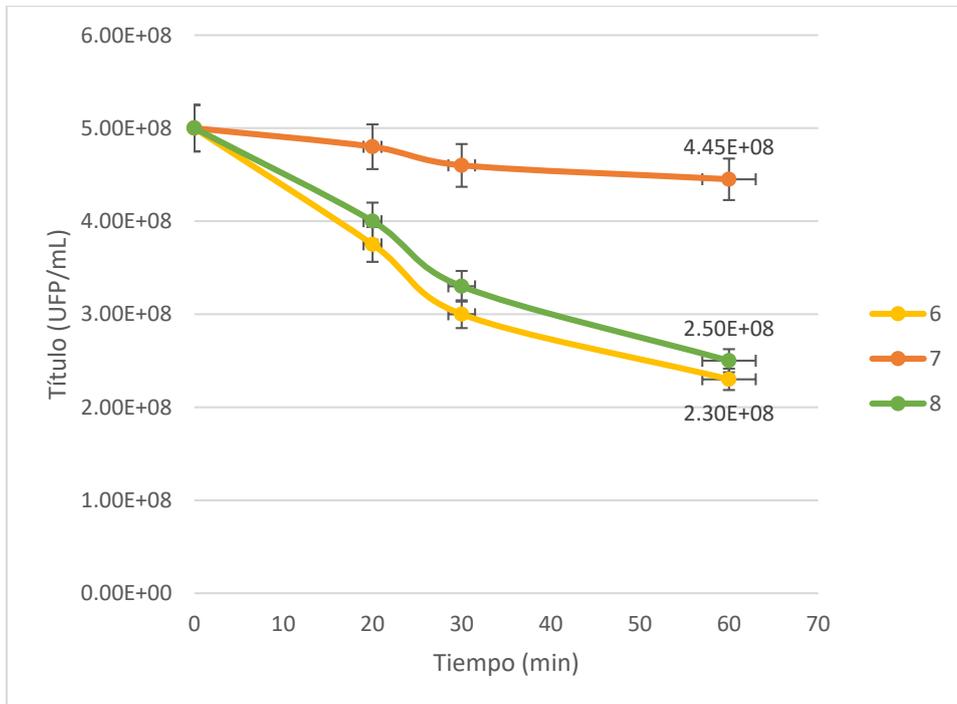
Efecto del pH en la actividad lítica de bacteriófagos

Tiempo (min)	pH	Título Inicial (UFP/mL)	Título Después de Incubación (UFP/mL)	% de Actividad Lítica
0	6	5.0 x 10 <sup>8</sup>	5.0 x 10 <sup>8</sup>	100%
20			3.75 x 10 <sup>8</sup>	75%
30			3.0 x 10 <sup>8</sup>	60%
60			2.3 x 10 <sup>8</sup>	46%
0	7	5.0 x 10 <sup>8</sup>	5.0 x 10 <sup>8</sup>	100%
20			4.8 x 10 <sup>8</sup>	96%
30			4.6 x 10 <sup>8</sup>	92%
60			4.45 x 10 <sup>8</sup>	89%
0	8	5.0 x 10 <sup>8</sup>	5.0 x 10 <sup>8</sup>	100%
20			4.0 x 10 <sup>8</sup>	80%
30			3.3 x 10 <sup>8</sup>	66%
60			2.5 x 10 <sup>8</sup>	50%

Nota: Fuente propia

**Figura 6.**

Efecto del pH en la actividad lítica de bacteriófagos



Nota: Fuente propia

Las muestras sometidas a pH 6, El bacteriófago mostró una mediana estabilidad, con un 46% de actividad lítica; aunque algo menor que a pH neutro (pH 7), donde se obtuvo 89%; mientras que a pH 8 se redujo al 50%.

En el control (pH 7.0), se observó una actividad lítica del 89%, lo que indica que el bacteriófago mantuvo su viabilidad y actividad lítica en condiciones neutras. Este hallazgo es respaldado por investigaciones que indican que el pH neutro es el más favorable para muchos bacteriófagos, ya que favorece la estabilidad de sus estructuras y la efectividad de sus mecanismos de infección (Wang et al., 2018).

A un pH 6.0 (ácido), la actividad lítica se redujo al 46%, con una disminución significativa en el título de bacteriófagos después de la incubación. Esta caída en la viabilidad es consistente con lo que se ha reportado en estudios previos, que señalan que los bacteriófagos suelen perder actividad en ambientes ácidos debido a la desnaturalización de sus proteínas estructurales, como la cápside, que afecta su capacidad para interactuar con los receptores de la célula huésped (Yoon et al., 2016; Mahalingam et al., 2017).

En un pH 8.0 (alcalino), la actividad lítica disminuyó al 50%, lo que sugiere que, aunque el bacteriófago es menos sensible a los pH alcalinos que a los ácidos, también se ve afectado por un pH ligeramente elevado. De hecho, algunos estudios han demostrado que los bacteriófagos pueden seguir siendo funcionales en condiciones alcalinas moderadas, pero pueden experimentar una disminución en la eficiencia de adsorción y replicación viral a medida que el pH se aleja del valor óptimo (Gorski et al., 2006; Loc-Carrillo et al., 2012).

**4.3. Estabilidad de la actividad lítica, la tasa de adsorción y el ciclo de infección del bacteriófago sobre *K. pneumoniae* a diferentes rangos de temperatura y pH.**

La estabilidad de la actividad lítica del bacteriófago fue evaluada en función de las condiciones de temperatura y pH, para determinar su viabilidad y capacidad para infectar *K. pneumoniae* bajo diferentes escenarios ambientales. (Ver tabla 3)

**Tabla 3.**

Comparación de la actividad lítica bajo diferentes condiciones de temperatura y pH

Condición	Temperatura (°C)	pH	Título Inicial (UFP/mL)	Título Después de Incubación (UFP/mL)	% de Actividad Lítica
Óptimo (Referencia)	37°C	pH 7	$5.0 \times 10^8$	$4.45 \times 10^8$	89%
Baja Temperatura (35°C)	35°C	pH 7	$5.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^8$	60%
Alta Temperatura (50°C)	50°C	pH 7	$5.0 \times 10^8$	$5 \times 10^7$	10%
Bajo pH (pH 6)	37°C	pH 6	$5.0 \times 10^8$	$2.3 \times 10^8$	46%
Alto pH (pH 8)	37°C	pH 8	$5.0 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	50%

*Nota:* Las condiciones experimentales implicaron la incubación del bacteriófago a diferentes temperaturas (35°C, 40°C y 50°C) y pH (6, 7 y 8) durante intervalos de tiempo establecidos. Posteriormente, se ajustaron los títulos virales de cada muestra y se calculó el % de actividad lítica en comparación con las condiciones estándar.

Así mismo se pudo identificar que, en relación con el efecto de la temperatura, al incrementar a 50°C, la actividad lítica cae drásticamente, alcanzando solo un 10%

después de la incubación. Esto muestra que el bacteriófago es sensible a temperaturas elevadas, lo cual es coherente con la literatura que sugiere que temperaturas altas pueden desnaturalizar las proteínas del bacteriófago, afectando su capacidad de infectar al huésped (Loc-Carrillo et al., 2012).

En relación con el efecto del pH, a pH 6, la actividad lítica disminuye a 46% en comparación con el valor óptimo de pH 7. Los pH bajos pueden alterar las interacciones entre el bacteriófago y la membrana celular del huésped, lo que reduce la eficiencia de la infección (Yoon et al., 2016). Mientras que a pH 8, la actividad lítica también disminuye, pero de manera menos drástica, con 50% de actividad lítica, lo que sugiere que el bacteriófago puede tolerar condiciones ligeramente alcalinas sin una pérdida significativa de viabilidad.

Por lo que se podría determinar que cuando las condiciones de alta temperatura (50°C) y pH ácido (6) o pH alcalino (8) se combinan, la actividad lítica disminuye aún más. Esto resalta la importancia de mantener condiciones ambientales óptimas para garantizar la efectividad de la terapia con bacteriófagos.

De esta manera, se determinó que, en condiciones óptimas de 37°C y pH 7, el bacteriófago mantiene una actividad lítica del 89%, lo que indica que estas condiciones favorecen la estabilidad y la actividad máxima del bacteriófago sobre *K. pneumoniae*.

Por consiguiente, se determinó la actividad lítica identificando la tasa de adsorción del bacteriófago, la cual fue evaluada mediante la cuantificación del porcentaje de fagos libres en diferentes intervalos de tiempo (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos) durante el experimento. En el análisis de los porcentajes de fagos libres a lo largo del tiempo, se observó que la concentración de fagos libres disminuyó

progresivamente, lo que indica que la adsorción de los fagos a las células de *K. pneumoniae* fue eficiente. Estos resultados confirman que, conforme transcurrió el tiempo, una mayor proporción de fagos se adsorbió en las bacterias, reduciendo su concentración libre en el medio.

La disminución en el porcentaje de fagos libres a lo largo del tiempo es indicativa de la adsorción eficiente de los fagos a las células bacterianas. Este comportamiento es esperado, dado que los fagos se unen a las bacterias y, al hacerlo, dejan de estar disponibles en el medio. La caída abrupta en los porcentajes de fagos libres entre los minutos 0 y 30 puede ser atribuida a una alta eficiencia en las primeras etapas del proceso de adsorción, que se va estabilizando a medida que el número de fagos libres disminuye. Diversos estudios han documentado que la alta densidad de receptores bacterianos facilita la captura inicial de los fagos, permitiendo una rápida saturación de los sitios de unión (Clokie et al., 2011; Bourdin et al., 2014). Esta rápida adsorción inicial es crítica, ya que reduce el tiempo necesario para la infección efectiva, incrementando la capacidad del fago para controlar poblaciones bacterianas en un periodo corto (Abedon, 2011).

**Tabla 4.**

Constante de Adsorción (K)

Tiempo t (min)	P <sub>0</sub>	P	K (mL/min)
0	5×10 <sup>8</sup>	5.0×10 <sup>8</sup>	-
10	5×10 <sup>8</sup>	4.0×10 <sup>8</sup>	1.8 x 10 <sup>-8</sup>
20	5×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>8</sup>	2.5 x 10 <sup>-8</sup>
30	5×10 <sup>8</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>	2.2 x 10 <sup>-8</sup>
40	5×10 <sup>8</sup>	3.0×10 <sup>8</sup>	4.0 x 10 <sup>-8</sup>
50	5×10 <sup>8</sup>	7 x10 <sup>7</sup>	5.5 x 10 <sup>-9</sup>
60	5×10 <sup>8</sup>	1 x10 <sup>7</sup>	2.0 x 10 <sup>-9</sup>

*Nota:* El cálculo de estos datos se basaron en la fórmula de  $K = \frac{2.3}{b.t} \log\left(\frac{P_0}{P}\right)$ , donde B es la concentración de bacterias (1.8×10<sup>6</sup> UFC/mL), t es el tiempo de adsorción en minutos, P<sub>0</sub> es la concentración inicial de fagos no absorbidos (5 × 10<sup>8</sup> UFP/mL); y P es la concentración de fagos libres en el medio después de cada intervalo de tiempo. Elaboración propia.

Por otro lado, la constante de adsorción (K) fue calculada en función de los porcentajes de fagos libres observados en cada intervalo de tiempo, utilizando la fórmula correspondiente. La constante de adsorción muestra una tendencia decreciente con el tiempo, lo que sugiere que la velocidad de adsorción de los fagos es más rápida en los primeros minutos, y disminuye conforme los sitios de adsorción en las bacterias se van ocupando.

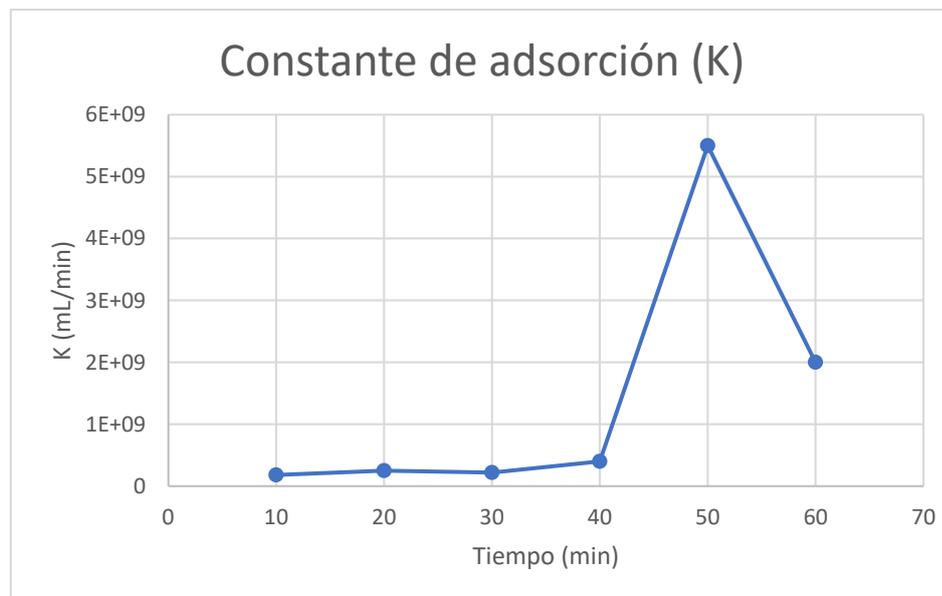
La constante de adsorción mostró una tendencia variable a lo largo de los diferentes intervalos de tiempo. Inicialmente, el valor de la constante de adsorción fue alto en el minuto 10, lo que indica que la adsorción fue rápida en las primeras etapas. Sin embargo, observamos que en el minuto 40, la constante de adsorción aumentó drásticamente a 4.0 × 10<sup>-8</sup> mL/min, lo que sugiere que hubo una nueva fase de adsorción rápida, probablemente debido a la liberación de nuevos sitios disponibles

en la superficie de las bacterias para unirse a los fagos. Este aumento en la constante de adsorción en el minuto 40 es interesante y podría indicar que las bacterias comenzaron a liberar algunos fagos libres, lo que permitió un proceso de adsorción más eficiente. Este fenómeno es característico de los sistemas biológicos donde la adsorción inicial ocurre a una velocidad elevada y posteriormente alcanza un equilibrio dinámico entre los fagos libres y aquellos adsorbidos a las células bacterianas (Kropinski, 2009).

Después de este pico, la constante de adsorción disminuyó en los siguientes intervalos de tiempo (minutos 50 y 60), lo que refleja una desaceleración del proceso conforme los sitios de adsorción se saturaron o alcanzaron un equilibrio.

**Figura 7.**

Constante de adsorción (K)



*Nota:* Elaboración propia.

En cuanto a la “Determinación del ciclo de infección del bacteriófago en *K. pneumoniae*” se realizó utilizando la técnica de la curva de un solo paso (one step curve), con un MOI de 0.1. El cultivo de bacterias se preparó a una densidad óptica correspondiente a la escala de McFarland de 0.5, y luego se permitió la adsorción del bacteriófago durante 20 minutos a 37°C.

Después de la incubación, las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en medio LB. El título de fagos libres se determinó a tiempo cero (T=0) y en intervalos regulares para obtener el periodo de eclipse y el periodo latente. (Ver tabla 5).

**Tabla 5.**

Periodo de eclipse del fago

Periodos	Tiempo (min)	Título de fagos (UFP/mL)	Burst Size
Latente	0	$5 \times 10^8$	0
	5	$4.8 \times 10^8$	0
Latente (Eclipse)	10	$4.5 \times 10^8$	0
	20	$4.0 \times 10^8$	0
Latente	30	$3.8 \times 10^8$	0
	40	$3.5 \times 10^8$	0
	50	$2.5 \times 10^8$	0
	60	$2.0 \times 10^8$	0.4

*Nota:* El período de eclipse corresponde al tiempo durante el cual los fagos están dentro de la célula bacteriana y no se pueden detectar en el medio; mientras que el período latente es el intervalo de tiempo en el cual los fagos recién producidos aún no han sido liberados al medio, debido a que están dentro de las células infectadas. Elaboración propia.

Como se observa en la tabla, el periodo eclipse comienza en el minuto 10. Durante este periodo, los fagos están siendo absorbidos por las bacterias y no se observan fagos libres en el medio. La cantidad de fagos libres disminuye gradualmente, lo que indica que el proceso de absorción está en marcha. En este caso, el título de fagos libres sigue cayendo hasta el minuto 20. La duración de este periodo coincide con lo reportado para fagos líticos que infectan enterobacterias, donde el eclipse oscila generalmente entre 15 y 25 minutos, dependiendo tanto de las condiciones del cultivo como de la fisiología específica de la bacteria huésped (Abedon, 2011).

Mientras que, el periodo latente comienza en T0 y se extiende hasta el minuto 60. Durante esta fase, el fago está dentro de la célula y se está replicando, pero no se libera todavía. Estos hallazgos son consistentes con descripciones previas, donde fagos específicos de *K. pneumoniae* presentan periodos latentes que oscilan entre los 0 y 60 minutos bajo condiciones óptimas de crecimiento (Chhibber et al., 2013).

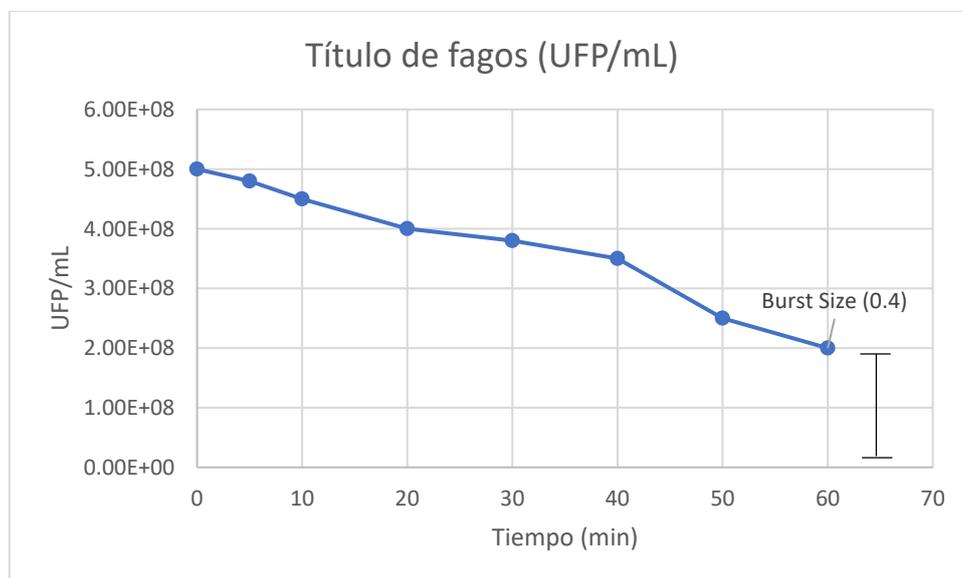
Después de superar el periodo de eclipse, la liberación de fagos empieza a acelerarse, iniciándose una fase de aumento en el título de fagos libres. El fin del periodo latente se considera alrededor del minuto 60, ya que en este momento se alcanza el valor máximo de fagos libres en el medio.

Asimismo, también fue necesario realizar el cálculo del Burst Size, que se refiere a la cantidad de fagos que se liberan de la bacteria huésped, para ello se calculó dividiendo el título final de fagos ( $2 \times 10^8$  UFP/mL) entre el título inicial en el momento T=0 ( $5 \times 10^8$  UFP/mL). De esta manera, el burst size fue de 0.4. Este valor es bajo, lo cual es consistente con el uso de un MOI bajo (0.1), que no favorece una rápida producción de fagos. El "burst size" se obtiene observando el título final de

fagos libres en relación con el título inicial. En este caso, es relativamente bajo, lo cual refleja una liberación más gradual del fago desde las células infectadas. Estudios comparativos han reportado tamaños de explosión variables, que van desde 10 hasta más de 100 UFP/célula, dependiendo de la cepa bacteriana, el fago empleado y las condiciones experimentales (Chan et al., 2013).

**Figura 8.**

Curva de un solo paso



Nota: Elaboración propia.

De esta manera, la tasa de adsorción demostró una alta eficiencia, reflejando una afinidad significativa entre el fago y *K. pneumoniae*, que facilita el inicio del proceso infeccioso. Esta interacción eficaz se refleja posteriormente en el ciclo de infección, donde se identificó un periodo de eclipse de 20 minutos, seguido por un periodo latente que se extendió hasta los 60 minutos. Finalmente, la liberación inicial de viriones se observó a los 60 minutos, alcanzando un tamaño de explosión de 0.4 UFP por célula.

## V. CONCLUSIONES

5.1. La actividad lítica del bacteriófago aislado de aguas residuales sobre *K. pneumoniae* se ve significativamente afectada por la temperatura. A 35 °C, la actividad se mantuvo casi al 100% durante 60 minutos, mientras que, a 40 °C y 50 °C, la actividad disminuyó drásticamente, alcanzando solo un 10% a 50 °C. Por lo tanto, se puede concluir que el bacteriófago exhibe una mayor estabilidad a temperaturas más bajas, siendo la temperatura de 35°C la más favorable para su actividad lítica.

5.2. La actividad lítica también varió según el pH del medio. A pH 7, el bacteriófago mantuvo un 89% de actividad, siendo este el pH óptimo. Sin embargo, a pH 6 y 8, la actividad se redujo a 46% y 50%, respectivamente, lo que demuestra que el bacteriófago es sensible a condiciones extremas de pH.

5.3. La estabilidad de la actividad lítica es mayor a 35 °C y pH 7, favoreciendo la interacción inicial con *K. pneumoniae*. En este entorno, la elevada tasa de adsorción evidencia una afinidad significativa entre el fago y la bacteria, facilitando eficazmente el inicio de la infección. Como resultado, se observó un periodo de eclipse de 20 minutos y un periodo latente de hasta 60 minutos, con la liberación inicial de viriones a los 60 minutos y un tamaño de explosión de 0.4 UFP por célula. Estos hallazgos consolidan el entendimiento del ciclo infectivo del bacteriófago en condiciones óptimas, destacando su potencial terapéutico contra *K. pneumoniae*. Los resultados respaldan la hipótesis alterna ( $H_1$ ), indicando que las variaciones en temperatura y pH impactan significativamente la actividad lítica, y

descartan la hipótesis nula ( $H_0$ ), subrayando la importancia de determinar condiciones óptimas para su uso en aplicaciones biotecnológicas.

5.4. Finalmente, los resultados alcanzados abren la posibilidad de que este cóctel de bacteriófagos sea una estrategia prometedora frente a las infecciones por *K. pneumoniae*. Su potencial terapéutico, respaldado por los estudios obtenidos en conjunto con estudios adicionales, traza una ruta clara hacia futuras aplicaciones clínicas, abriendo una posibilidad de incorporar nuevas herramientas en la lucha contra las bacterias multirresistentes.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66–85.  
<https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Ackerman, H. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), 843-857.  
<https://doi.org/10.1007/s007050170120>
- Ackerman, H. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives of Virology*, 146(5), 843-857. doi:10.1007/s007050170120
- Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers.
- Akhtar, M., Viazis, S., & Diez-Gonzalez, F. (2014). Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against Salmonella. *Elsevier*, 67-74.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2010). *Microbiología Médica*. Mexico: Mc Graw Hill.
- Castro, A. (2021, Julio). *Caracterización de 2 bacteriófagos líticos, vB\_Kp-VAC110 y vB\_Kp-VAC70, frente cepas clínicas de Klebsiella pneumoniae*. TESIS, La Coruña. Retrieved from [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29193/BanaCastro\\_Antia\\_TFM\\_2021.pdf?sequence=2](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29193/BanaCastro_Antia_TFM_2021.pdf?sequence=2)
- Cervený, K., DePaola, A., Duckworth, D., & Gulig, P. (2002). Phage Therapy of Local and Systemic Disease Caused by *Vibrio vulnificus* in Iron-Dextran-Treated Mice. *Infection and Immunity*.

- Chan, B. K., Abedon, S. T., & Loc-Carrillo, C. (2013). Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, *8*(6), 769-783. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.47>
- Chang-Ro, L., Jung, L., Kwang, P., Jeong, J., Young, K., Chang-Jun, C., . . . Sang, L. (2017). Resistencia antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta: epidemiología, determinantes asociados a hipervirulencia y mecanismos de resistencia. *Front Cell Infect Microbiol*, *7*(483). doi:10.3389/fcimb.2017.00483
- Chhibber, S., Kaur, T., & Kaur, S. (2013). Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: Effective treatment in eliminating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS ONE*, *8*(2), e56022.
- Clokie, M. R. J., & Kropinski, A. M. (2009). *Bacteriophages: Methods and protocols*. Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-165-4>
- De Oliveira, D., Forde, B., Kidd, T., Harris, P., Schembri, M., Beatson, S., . . . Walker, M. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(3).
- Dini, C. (2011). *Aislamiento y caracterización molecular de bacteriófagos de bacterias enteropatógenas para biocontrol de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. Universidad Nacional de la Plata. Retrieved from [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2686/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2686/Documento_completo.pdf?sequence=1)
- Domingo-Calap, P., Beamud, B., Vienne, J., González-Candelas, F., & Sanjuán, R. (2020). Isolation of Four Lytic Phages Infecting *Klebsiella pneumoniae* K22

Clinical Isolates from Spain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 425. doi:10.3390/ijms21020425

Engelkirk, P., & Duben, J. (2011). *Burton's Microbiology for the health science*. Texas - United States: Lippincott Williams & Wilkins.

Eskenazi, A., Lood, C., Wubbolts, J., Hites, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., . . . Pirnay, J. (2022). Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Communications*, 13(302). doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27656-z>

Fernández, C., Flores, V., & Medina, M. (2017). Aislamiento y caracterización del bacteriófago Va1 específico a *Vibrio alginolyticus*. *Revista Peruana de Biología*, 24(1), 93-100. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13103>

Flores, G. (2017). *Caracterización de bacteriófagos líticos de Salmonella enterica aislados de muestras de pollos*. TESIS PREGRADO, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7317>

Flores, G. (2017). *Caracterización de bacteriófagos líticos de Salmonella enterica aislados de muestras de pollos*. Tesis pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7317>

Frunciano, E. (2007). Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. *Canadian Journal*

*of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 18(1), 19-26.  
doi:10.1155/2007/976850

Gadaleta, P. (1995). *Aislamiento, caracterización, y relaciones filogenéticas de un bacteriófago de Kluyvera sp.* TESIS DOCTORAL. Retrieved from [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis\\_n2784\\_Gadaleta](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n2784_Gadaleta)

García, E., Elliott, J., Ramanculov, E., Chain, P., Chu, M., & Molineux, I. (2003). The Genome Sequence of Yersinia pestis Bacteriophage  $\phi$ A1122 Reveals an Intimate History with the Coliphage T3 and T7 Genomes. *American Society for Microbiology*, 185(17), 5248–5262. doi:10.1128/JB.185.17.5248-5262.2003

Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129-136. doi:10.3855/jidc.3573

Gonzales, A., Nieves, B., Solórzano, M., Cruz, J., Puig, J., & Moreno, M. (2013). Caracterización de cepas de Klebsiella pneumoniae productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. *Revista chilena de infectología*, 30(4), 374-380. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000400004>

Górski, A., Weber-Dąbrowska, B., & Międzybrodzki, R. (2006). *Bacteriophage therapy for the treatment of infections in humans.* *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 27-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02795.x>

- Guerin, J., Niskanen, E. A., & Dalziel, R. G. (2015). *Thermal stability of bacteriophages and the effects of temperature on their infectivity*. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 421-429. <https://doi.org/10.1111/jam.12818>
- Haq, I., Chaudhry, W., Andleeb, S., & Qadri, I. (2011). Isolation and Partial Characterization of a Virulent Bacteriophage IHQ1 Specific for *Aeromonas punctata* from Stream Water. *Microbial Ecology*, 63(4), 954-963.
- Harper, D. R., Parracho, H. M., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., & Morales, S. (2014). Bacteriophages and biofilm infections: Fighting fire with fire? *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00009>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- Izquierdo, L. (2003). *Biosíntesis del lipopolisacárido de Klebsiella pneumoniae*. Barcelona: Universidad de Barcelona. Retrieved from <https://www.tdx.cat/handle/10803/2383>
- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides, and bacteriophages. *\*Poultry Science\**, 82(4), 640-647. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.640>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—Review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>.

- Jorquera, D., Galarce, N., & Borie, C. (2015). El desafío de controlar enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. *Revista Chilena de Infectología*, 32(6), 678-688. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000700010>
- Karumidze, N., Kusradze, I., Rigvava, S., Goderdzishvili, M., Rjakumar, K., & Alavidze, Z. (2012). Isolation and Characterisation of Lytic Bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Springer Science+Business Media*, 66(3), 251-258. doi:10.1007/s00284-012-0264-7
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host & Microbe*, 25(2), 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>
- Kropinski, A., Mazzocco, A., Waddell, T., Lingohr, E., & Johnson, R. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Methods in Molecular Biology*, 501, 69-76. doi:10.1007/978-1-60327-164-6\_7
- Latorre-Barragan, M., Zurita-Leal, A., & Gudiño, M. (2019). Resistencia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en países latinoamericanos. *Medwave*, 19(10), 1-9. doi:10.5867/medwave.2019.10.7729
- Letellier, L., Boulanger, P., Plançon, L., Jacquot, P., & Santamaria, M. (2004). Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1228-1239. doi:10.2741/1333
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal*

*Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162–173.

<https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>

Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2012). *Bacteriophage therapy: Roles of phage ecology in anti-bacterial therapy*. *Bacteriophage*, 2(4), 208-214.  
<https://doi.org/10.4161/bact.22122>

López, J., & Echevarri, L. (2010). K. pneumoniae: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Latreia*, 23(2), 157-165. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180519015007>

Mahalingam, S., Kumar, A., & Chandra, P. (2017). *Effect of pH on the structural integrity and infectivity of bacteriophages*. *Virology Journal*, 14(1), 88.  
<https://doi.org/10.1186/s12985-017-0772-9>

Maier, R., Pepper, I., & Gerba, C. (2008). *Environmental Microbiology*. Elsevier.

Matsuoka, A., Vargas, M., Ymaña, B., Soza, G., & Pons, M. (2020). Resistencia a la colistina en cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogoresistente del periodo 2015-2018 en un instituto materno perinatal de Lima, Perú. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 37(4), 716-720. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2020.374.5422>

Mayer, G. (2015). *Bacteriófagos*. Retrieved from <https://www.microbiologybook.org/Spanish-Virology/spanish-chapter24.htm>

Meneses, A., Dormond, E., Durocher, Y., Gilbert, R., & Kamen, A. (2007). OPTIMIZACION DE LA PRODUCCION DE VECTORES ADENOVIRALES “HELPER DEPENDENT” POR MEDIO DE LA MULTIPLICIDAD DE

INFECCION. *XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Morelos: Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Retrieved from chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area\_IX/Orales/OIX-12.pdf

Meza, A. (2016). *Aislamiento y caracterización de bacteriófagos para cepas nosocomiales de Acinetobacter Baumannii de Lima e Iquitos, Perú 2014-2015*. Tesis pregrado, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú, Yanahuara. Retrieved from chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.ucsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12920/5513/42.0141.IB.pdf?sequence=1&isAllowed=

Middelboe, M., Møller, H. B., & Nielsen, K. (2001). *Effect of temperature on bacteriophage activity*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 586-592. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.586-592.2001>

O'Flaherty, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 801–819. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00176.x>

Paterson, D. (2004). International Prospective Study of Klebsiella pneumoniae Bacteremia: Implications of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production in Nosocomial Infections. *Anal of Internla Medicine*, 140(1), 26-32. doi:10.7326/0003-4819-140-1-200401060-00008

Prada, C., Holguín, A., González, A., & Vives, M. (2015). Fagoterapia, alternativa para el control de las infecciones bacterianas. *Perspectivas en Colombia. Universitas Scientiarum*, 20(1), 43-60. doi: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.faci>

- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.* \*Clinical Microbiology Reviews
- Punil, R. (2017). *Caracterización de un bacteriófago específico de Escherichia Coli aislado de aguas residuales de "La Taboada".* Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from [https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7363/Punil\\_Ir.pdf?sequence=3](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/7363/Punil_Ir.pdf?sequence=3)
- Ramallo, G., Villalobo, C., Etcheverría, A., & Padola, N. (2017). *Diferentes métodos para detección y aislamiento de Salmonella spp en reses porcinas.* Tandil, Argentina: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Retrieved from <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/items/9993a829-80ab-45e0-82e0-1b0483f853ec>
- Reina, J., & Reina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? *Revista española de Quimioterapia*, 31(2), 101-104.
- Reese, A. T., Kim, S. H., & Choi, J. (2013). *Temperature sensitivity of bacteriophage infectivity and structural integrity.* *Virology Journal*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-23>
- Rocha, C., Reynolds, N. D., & Simons, M. P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1), 139-145. Obtenido de

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342015000100020&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000100020&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Rohde, C., Wittmann, J., & Kutter, E. (2018). Bacteriophages: A therapy concept against multidrug-resistant bacteria. *\*Surgical Infections\**, *\*19\**(2), 234-238. <https://doi.org/10.1089/sur.2017.027>

Rodriguez, P., & Arenas, R. (2018). *Hans Christian Gram y su tinción*. Mexico. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=80715>

Segundo, N., Hernandez, E., López, O., & Torres, O. (2010). Los Bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, *41*(3), 17-26. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57916078003>

Shi, Y., Chen, Y., Yang, Z., Zhang, Yulong, You, B., . . . Peng, Y. (2019). *Characterization and genome sequencing of a novel T7-like lytic phage, kpssk3, infecting carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Virology*.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, G. (2001). Bacteriophages Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(3), 649-659. doi:10.1128/AAC.45.3.649-659.2001

Tamariz, J., Lezameta, L., & Guerra, H. (2014). Fagoterapia frente a infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente en ratones. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*, *31*(1), 69 - 77. Retrieved from

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342014000100010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000100010&lng=es&tlng=es)

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2010). *Microbiology : an introduction* (Décima ed.). San Francisco, California.: Pearson Benjamin Cummings.

Wang, Z., Zhang, L., & Li, X. (2018). *Effect of pH on bacteriophage stability and infectivity*. *Journal of Virology*, 92(5), e01724-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01724-17>

Weitz, J. S., Wilhelm, S. W., & Pincus, P. (2013). *Viruses, ecology, and the dynamics of bacterial populations*. *Environmental Microbiology*, 15(4), 1009-1017. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12139>

Wong, A. (1994, Diciembre). *Purificación y caracterización biológica del bacteriófago uB-19 específico de Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Retrieved from <https://cd.dgb.uanl.mx/handle/201504211/2987>

World Health Organization. (2017). \*Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics\*. <https://www.who.int>

Yoon, H. S., Lee, J. H., & Kim, J. W. (2016). *Impact of acidic environments on the stability and infectivity of bacteriophages*. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 1044-1052. <https://doi.org/10.1111/jam.13264>

Zhang, X. (2014). *Phage therapy: A potential therapeutic strategy for the treatment of bacterial infections*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), 1237-1244. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt475>

## VII. ANEXOS

### ANEXO I: ANTIBIOGRAMA DE BACTERIA *K. pneumoniae*

Para determinar si la bacteria *K. pneumoniae* ATCC 27853 es resistente; se procedió a realizar un antibiograma en Microbiología del Hospital Regional Docente de Trujillo, donde se obtuvo como resultado la cepa  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido- $\beta$ lee; y a su vez, enzimas capaces de hidrolizar las cefalosporinas (grupo de  $\beta$ -lactámicos), brindado resistencia (Tabla 4), a Cefazolina y Ceftriaxona cefalosporinas de primera y tercera generación.

Tabla 6.

Resultados de antibiograma de *K. pneumoniae* ATCC 27853

	Antibióticos	Resultados
<b><math>\beta</math>Lactámicos</b>	Ampicilina	R
	Ampicilina/Sulbactam	R
	Piperacilina/Tazobactam	S
	Ceftazidima	I
	Cefazolina	R
	Ceftriaxona	R
<b>Aminoglucósidos</b>	Amicacina	I
	Gentamicina	S
	Tobramicina	I
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacino	S
	Levofloxacino	S
	Sulfametoazol	R

Nota: Donde R: resistente, S: sensible, I: intermedio.

## ANEXO II: COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR HIERRO TRIPLE AZÚCAR

Tabla 7.

Composición del medio TSI

Componentes	g/L
Extracto de carne	3
Pluripeptona	20
Cloruro de sodio	5
Lactosa	10
Sacarosa	10
Glucosa	1
Sulfato de Hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
R rojo fenol	0.025
Agar	13

*Nota:* Se ajusta a un pH 7.3. Elaboración propia.

## ANEXO III: COMPOSICIÓN DEL CALDO LURIA BERTANI (CALDO LB)

Tabla 8.

Composición del Caldo Luria Bertani (Caldo LB)

Componentes	g/L
Extracto de levadura	5
Peptona de caseína	10
Cloruro de sodio	5

*Nota:* Se ajusta a un pH 7.2. Elaboración propia.

## ANEXO IV: COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR NUTRITIVO

Tabla 9.

Composición del medio Agar nutritivo

Componentes	g/L
Pluripeptona	5
Extracto de Carne	3
Cloruro de sodio	8
Agar	15

*Nota:* Se ajusta a un pH 7.3. Elaboración propia.

## ANEXO V: COMPOSICIÓN DE BUFFER SM

*Tabla 10.*

Composición de Buffer SM

<b>Componentes</b>	<b>g/100 mL</b>
NaCl	0.59
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.197
Tris Base	0.61
Gelatina	2

*Nota:* Se ajusta a un pH 7.3. Elaboración propia.

## ANEXO VI: COMPOSICIÓN DEL TOP AGAR

*Tabla 11.*

Composición del Top Agar

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Triptona	10
Extracto de Levadura	5
Cloruro de sodio	0.5
Agar	7

*Nota:* Se ajusta a un pH 7.3. Elaboración propia.

## ANEXO VII: EQUIPOS Y MATERIALES

**Figura 9.**

Cabina de bioseguridad nivel II marca Logic



*Nota:* Fuente propia

**Figura 10.**

Espectrofotómetro de luz visible marca Thermo Scientific



*Nota:* Fuente propia

**Figura 11.**

Agua destilada



*Nota: Fuente propia*

**Figura 12.**

Micropipetas



*Nota: Fuente propia*

**Figura 13.**

Incubadora marca Memmert



*Nota:* Fuente propia

**Figura 14.**

Autoclave marca Lab Tech



*Nota:* Fuente propia

**Figura 15.**

Medidor portátil de pH marca Hanna

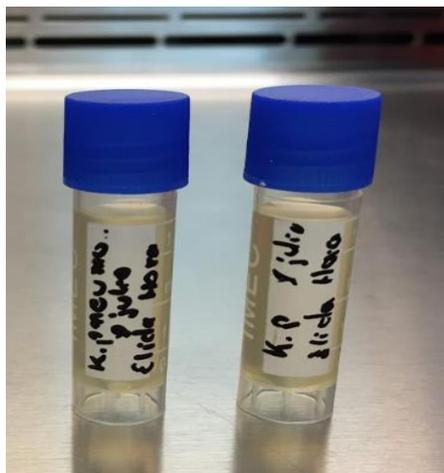


Nota: Fuente propia

## ANEXO VIII: IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO

**Figura 16.**

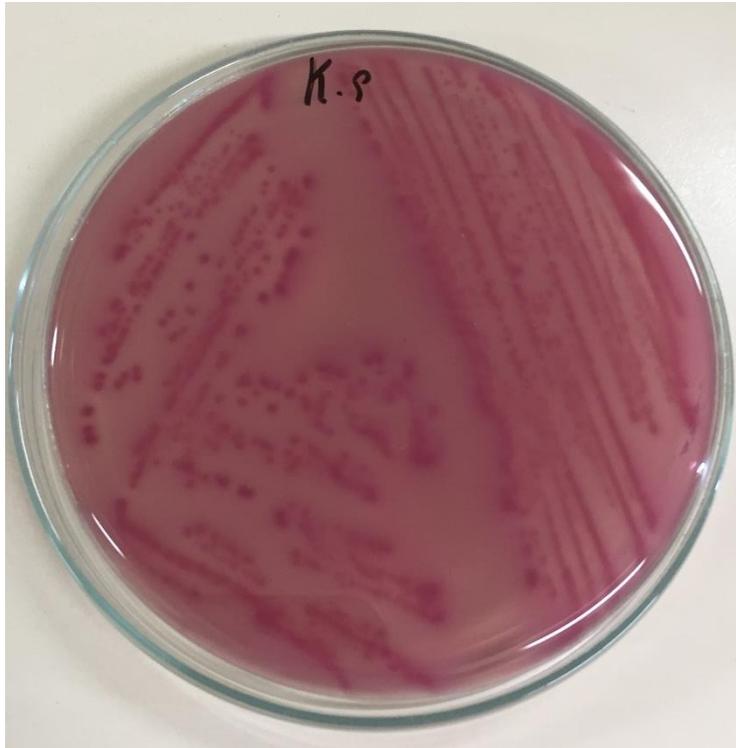
Vial con cultivo de *Klebsiella pneumoniae*



Nota: Fuente propia

**Figura 17.**

*Klebsiella pneumoniae* en agar MacConkey



Nota: Fuente propia

**Figura 18.**

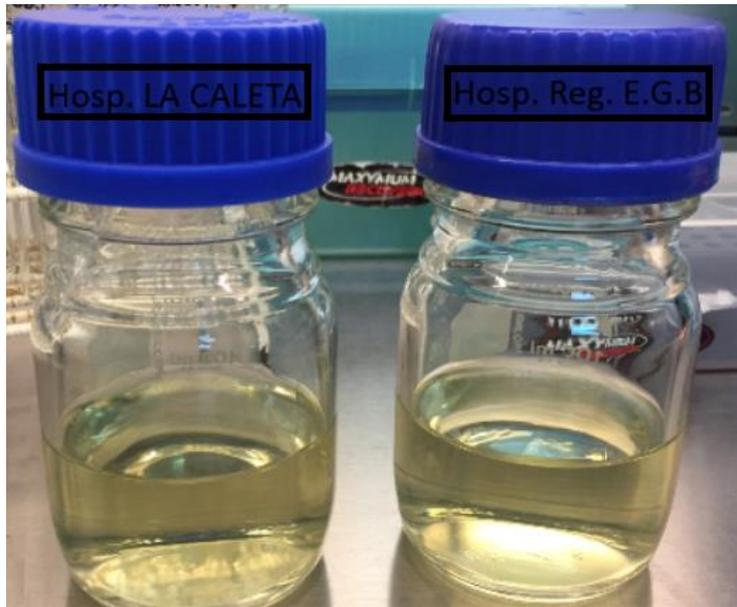
*Klebsiella pneumoniae* en agar TSI



Nota: Fuente propia

**Figura 19.**

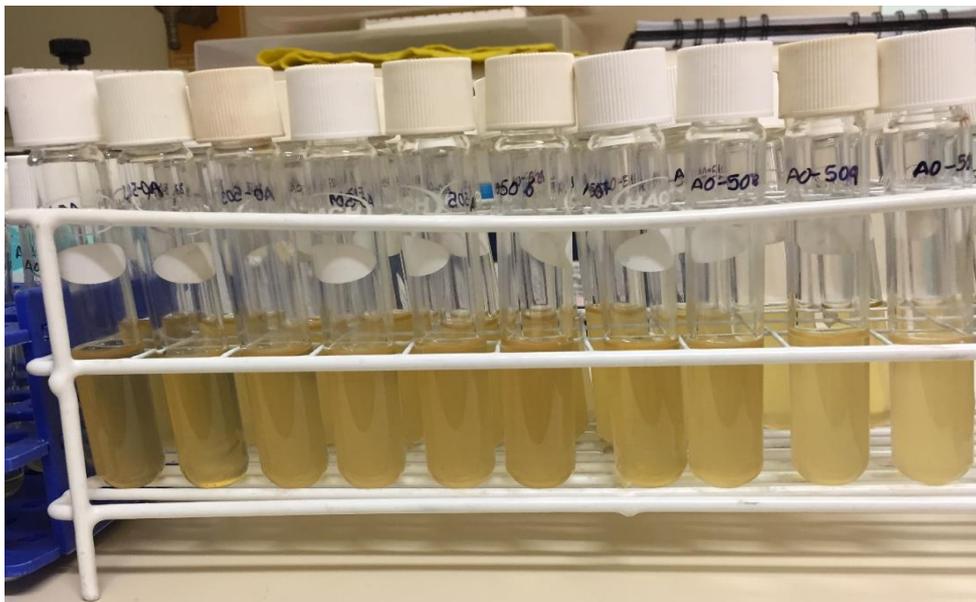
Agua residual de dos puntos diferentes



*Nota:* Fuente propia

**Figura 20.**

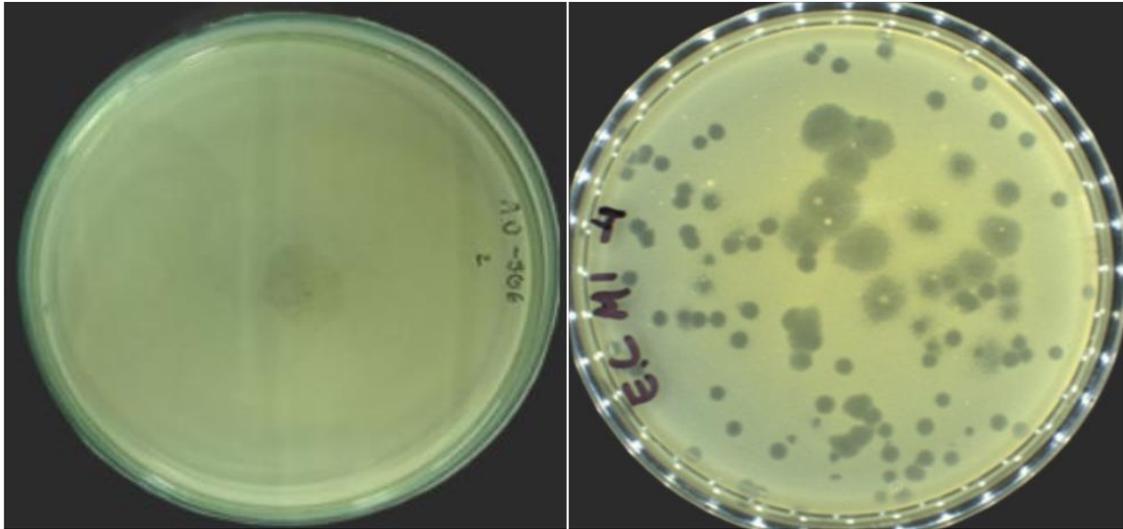
Diluciones seriadas



*Nota:* Fuente propia

**Figura 21.**

Unidades formadoras de placas (UFP)



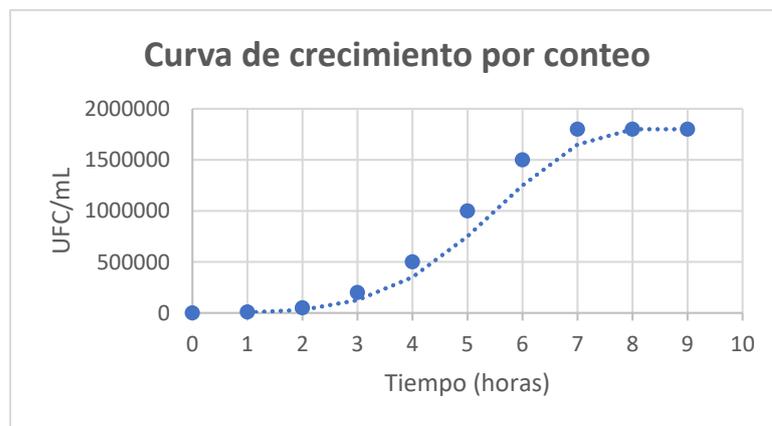
*Nota:* La imagen 21.1 (izquierda), donde se observa la lisis del cultivo bacteriano lo que indica presencia del bacteriófago, mientras que en la imagen 21.2 (derecha). Fuente propia.

## ANEXO IX: FASES 01, 02, 03 Y 04

La investigación se basó en 7 fases donde en primera instancia, se evaluó a la bacteria huésped en relación con su curva de crecimiento mediante las técnicas de conteo en placa y densidad óptica, mostrándonos así los resultados del comportamiento típico de la bacteria *K. pneumoniae* en un entorno controlado.

**Figura 22.**

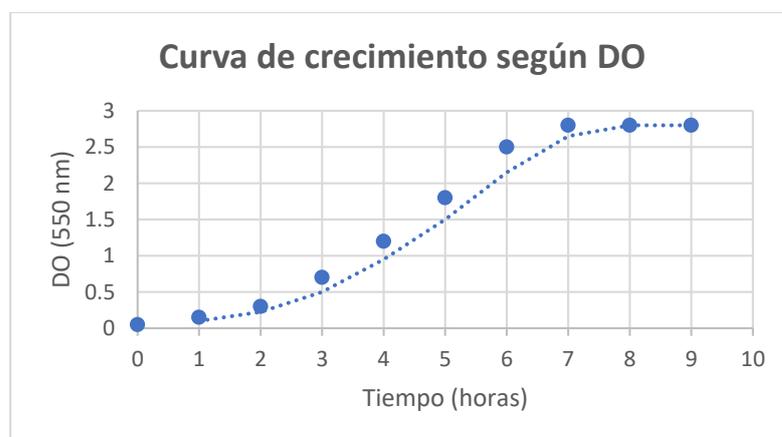
Curva de crecimiento por conteo



Nota: Elaboración propia.

**Figura 23.**

Curva de crecimiento por densidad óptica



Nota: Elaboración propia.

**Tabla 12.**

Curva de crecimiento por conteo y según DO

	Tiempo (horas)	Densidad Óptica (DO)	UFC/mL (Conteo en Placa)
Fase lag	0	0.05	10 <sup>3</sup>
	1	0.15	10 <sup>4</sup>
Fase logarítmica	2	0.3	5x10 <sup>4</sup>
	3	0.7	2x10 <sup>5</sup>
	4	1.2	5x10 <sup>5</sup>
	5	1.8	1x10 <sup>6</sup>
	6	2.5	1.5x10 <sup>6</sup>
	7	2.8	1.8x10 <sup>6</sup>
Fase estacionaria	8	2.8	1.8x10 <sup>6</sup>
Fase de muerte	9	2.8	1.8x10 <sup>6</sup>

Nota: Elaboración propia.

La curva de crecimiento de *K. pneumoniae* muestra un patrón típico que se puede dividir en cuatro fases durante el lapso de 9 horas.

En las primeras horas (0 a 1), ocurrió la Fase Lag, donde se observó un incremento lento en la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) y en la Densidad Óptica (DO), indicando que las bacterias se estaban adaptando a las condiciones del medio de cultivo.

Mientras que, entre las horas 1 y 7, se evidenció la Fase Logarítmica, es decir, un aumento exponencial en la población bacteriana, alcanzando un máximo de 1.8 x 10<sup>6</sup> UFC/mL al final de la hora 7. Durante este mismo periodo, la DO aumentó significativamente, alcanzando un valor de 2.80, lo que indica un crecimiento celular activo y una mayor turbidez en el medio.

A partir de la hora 8, ocurrió la Fase Estacionaria, ya que tanto la concentración de UFC/mL como la DO se estabilizaron en 1.8 x 10<sup>6</sup> y 2.80, respectivamente, indicando el inicio de la fase estacionaria. Durante esta fase, la tasa de crecimiento

se iguala a la tasa de muerte celular, lo que sugiere que los nutrientes disponibles comienzan a agotarse, y la acumulación de desechos afecta el crecimiento.

Finalmente, en la Fase de Muerte, aunque no se registraron datos más allá de la hora 9, es previsible que, si se extendiera el tiempo de observación, se observara una disminución en la concentración de UFC/mL y en la DO, marcando el inicio de la fase de muerte, donde la población bacteriana comienza a declinar.

En segunda instancia, se evaluó al bacteriófago durante la fase del Aislamiento, Purificación y Amplificación de Bacteriófagos, y se llevó a cabo a partir de muestras de aguas residuales y suelos contaminados. Para ello, se recolectaron 100 mL de aguas residuales (50 mL de cada hospital).

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio y se utilizó un método de enriquecimiento, con el objetivo de aislar los bacteriófagos y confirmar su presencia mediante el método de la Gota, por lo que se inocularon estas muestras en medios de cultivo que contenían *K. pneumoniae* como hospedador y después de un periodo de incubación de 24 horas a 37°C, se observaron lisis en los cultivos bacterianos, lo que indicaba efectivamente la existencia de bacteriófagos líticos. (Ver Figura 17.1)

Posteriormente, se procedió a la purificación de los bacteriófagos aislados, esto se realizó mediante diluciones en serie y ensayos de placas utilizando el método de doble agar, lo que permitió obtener placas de lisis facilitando la identificación de colonias de bacteriófagos. Como resultado, se purificaron los aislados iniciales, los cuales mostraron un perfil lítico consistente. (Ver Figura 21.2)

Después de la amplificación, se registró la concentración final de bacteriófagos, donde, después de 24 horas de incubación se obtuvo una concentración final de fagos de  $5.0 \times 10^8$  UFP/mL.

Asimismo, también se determinó la actividad lítica del bacteriófago en relación a la Multiplicidad de infección (MOI), porcentaje y concentración de fagos libres, y Tasa de adsorción donde se obtuvo la constante (K).

En cuanto a la “Determinación de multiplicidad de infección (MOI)”, se realizó con el objetivo de determinar las diversas concentraciones de bacteriófagos en base a tres proporciones: 1, 0.1 y 0.01. (Ver tabla 2).

**Tabla 13.**

Multiplicidad de infección (MOI) en proporciones

MOI	Título fágico inicial (UFP/mL)	Título bacteriano inicial (UFC/mL)	Título final (UFP/mL)
1	$1.8 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$2.5 \times 10^9$
0.1	$1.8 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$	$3.2 \times 10^9$
0.01	$1.8 \times 10^4$	$1.8 \times 10^6$	$2.0 \times 10^9$

*Nota:* En la tabla se visualiza los MOIs evaluados donde; MOI 1: Relación 1 por bacteria; MOI 0.1: Relación 1 fago por cada 10 bacterias; MOI 0.01: Relación 1 fago por cada 100 bacterias. Para ello se obtuvo la concentración inicial de bacterias de  $1.8 \times 10^6$  UFC/mL y concentración inicial de fagos de  $1.8 \times 10^6$  UFC/mL . Elaboración propia.

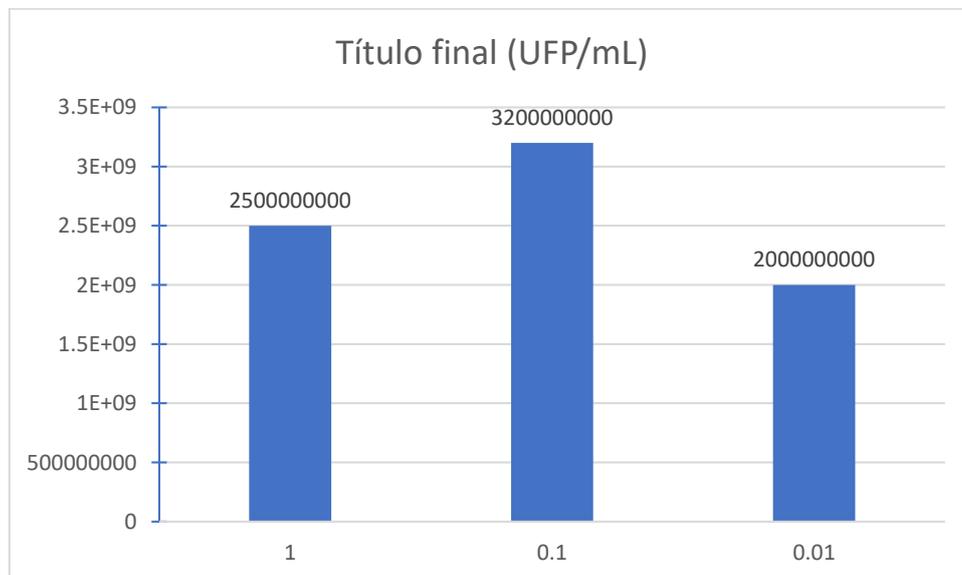
Según la MOI 1, es decir, la relación 1:1 asegura que la mayoría de las bacterias sean infectadas en el primer ciclo. Esto provoca una lisis rápida, pero dado que todas las bacterias son eliminadas temprano, la amplificación fágica es limitada. Según Adams (1959) menciona que los MOIs altos tienden a agotar rápidamente la

población bacteriana, lo cual es ideal para control bacteriano rápido, mientras que MOIs bajos permiten que la población bacteriana persista y se produzcan múltiples ciclos de replicación de fagos.

En el caso de la MOI 0.1, no todas las bacterias son infectadas inicialmente, lo que permite que los fagos se amplifiquen en múltiples ciclos de infección. Esto resulta en el título fágico final más alto. Según (Clokie y Kropinski, 2009), describe a este MOI como óptimo para producción de fagos, ya que permiten una mayor amplificación manteniendo un equilibrio, dado que no todas las bacterias son infectadas inicialmente, promoviendo ciclos de replicación adicionales.

**Figura 24.**

Título final (UFP/mL) por cada MOI



*Nota:* En la gráfica se visualiza que el MOI 0.1 tiene un título fágico final más alto  $3.2 \times 10^9$  UFP/mL, esto se debe a que no todas las bacterias son infectadas inicialmente, lo que permite que los fagos se amplifiquen en múltiples ciclos de infección. Elaboración propia.

Mientras que la MOI 0.01, considerándose un MOI tan bajo, las bacterias no infectadas permiten una propagación lenta del fago. Aunque el título final de fagos es menor que el de MOI=0.1, Zhang (2014) menciona que son útiles para estudios de propagación controlada o en experimentos donde no se quiere agotar rápidamente la población bacteriana., ya que los ciclos de replicación iniciales son limitados, permitiendo monitorear mejor la dinámica entre bacterias y fagos.

En cuanto a Determinación de la tasa de adsorción, se procedió a comprender la eficiencia con la que los bacteriófagos se adhieren a las bacterias en un proceso de infección, para ello se tuvo en cuenta calcular el porcentaje de bacteriófagos libres a diferentes tiempos (*Ver tabla 12*) y la constante de adsorción (*Ver tabla 13*).

**Tabla 14.**

Porcentajes (%) y concentración de fagos libres (UFP/mL)

Tiempo (min)	Concentración de fagos libres (n) [UFP/mL]	Porcentaje de fagos libres (%)
0	$5.0 \times 10^8$	100%
10	$4.0 \times 10^8$	80%
20	$3.0 \times 10^8$	60%
30	$1.5 \times 10^8$	30%
40	$3.0 \times 10^8$	15%
50	$7 \times 10^7$	5%
60	$1 \times 10^7$	2%

*Nota:* El cálculo de estos datos se basaron en la fórmula de  $\frac{n}{n_0} \times 100$ , donde  $n_0$  es la concentración inicial de fagos ( $5 \times 10^8$  UFP/mL, al tiempo 0); y  $n$  es la concentración de fagos no adsorbidos (obtenidos a diferentes tiempos: 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos). Elaboración propia.

## ANEXO X: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**Tabla 15.**

Análisis de datos de temperatura

	35	40	50
Media	4.13E+08	3.13E+08	2.13E+08
Error típico	4.27E+07	8.20E+07	1.01E+08
Mediana	4.25E+08	3.15E+08	1.50E+08
Desviación estándar	8.54E+07	1.64E+08	2.02E+08
Varianza de la muestra	7.29E+15	2.69E+16	4.06E+16
Curtosis	0.34	-1.31	2.03
Rango	2.00E+08	3.80E+08	4.50E+08
Mínimo	3.00E+08	1.20E+08	5.00E+07
Máximo	5.00E+08	5.00E+08	5.00E+08
Suma	1.65E+09	1.25E+09	8.50E+08

Nota: Elaboración propia.

El análisis de los datos estadísticos demuestra que la actividad lítica de los bacteriófagos sobre *K. pneumoniae*, disminuye a medida que aumenta la temperatura; evidenciando un comportamiento sensible al calor. A 35°C, los bacteriófagos presentan la mayor actividad, con una media de  $4.13 \times 10^8$  UFP/mL y una mediana de  $4.25 \times 10^8$  UFP/mL. Sin embargo, al aumentar a 40°C, su actividad se reduce a  $3.13 \times 10^8$  UFP/mL, y a 50°C desciende a  $2.13 \times 10^8$  UFP/mL. Este patrón sugiere que las temperaturas más altas afectan negativamente la capacidad lítica de los bacteriófagos.

Además, la variabilidad de los datos también aumenta con la temperatura, la desviación estándar, que indica la dispersión de los valores, incrementa de  $8.54 \times 10^7$  a 35°C a  $2.02 \times 10^8$  a 50°C. Este comportamiento se refleja también en el error típico, que pasa de  $4.27 \times 10^7$  a 35°C a  $1.01 \times 10^8$  a 50°C, lo cual evidencia que

las temperaturas más altas generan un comportamiento menos predecible en los bacteriófagos.

Por otro lado, la medida estadística, el rango, aumenta con la temperatura, es decir,  $2.00 \times 10^8$  a  $4.80 \times 10^8$  de  $35^\circ\text{C}$  a  $50^\circ\text{C}$ , respectivamente; debido a una disminución significativa en los valores mínimos, mientras que los valores máximos se mantienen constantes en  $5.00 \times 10^8$  UFP/mL en las tres temperaturas. Este comportamiento sugiere que, algunos bacteriófagos mantienen su actividad, y una proporción significativa pierde eficacia en condiciones térmicas más elevadas.

La curtosis también muestra un cambio notable. A  $35^\circ\text{C}$ , la distribución de los datos es ligeramente apuntada, a 0.34, pero a temperaturas más altas ( $40^\circ\text{C}$  y  $50^\circ\text{C}$ ), los valores se obtienen negativos (-1.31 y -2.03) respectivamente, indicando distribuciones más planas y una mayor dispersión de los datos.

Asimismo, la suma total de los valores disminuye progresivamente con la temperatura, pasando de  $1.65 \times 10^9$  UFP/mL ( $35^\circ\text{C}$ ) a  $1.25 \times 10^9$  UFP/mL ( $40^\circ\text{C}$ ), y a  $8.50 \times 10^8$  UFP/mL ( $50^\circ\text{C}$ ). Esto confirma que la actividad total de los bacteriófagos es significativamente menor a temperaturas más altas.

Finalmente, los resultados muestran que la actividad lítica de los bacteriófagos es óptima a  $35^\circ\text{C}$ , y disminuye considerablemente a temperaturas de  $40^\circ\text{C}$  y  $50^\circ\text{C}$ . Este comportamiento podría estar relacionado con una menor estabilidad estructural o funcional de los bacteriófagos en condiciones térmicas elevadas, lo que resalta la importancia de considerar la temperatura como un factor crítico en su eficacia lítica.

**Tabla 16.**

Análisis de datos de pH

	6	7	8
Media	3.51E+08	4.71E+08	3.70E+08
Error típico	5.77E+07	1.20E+07	5.31E+07
Mediana	3.38E+08	4.70E+08	3.65E+08
Desviación estándar	1.15E+08	2.39E+07	1.06E+08
Varianza de la muestra	1.33E+16	5.73E+14	1.13E+16
Curtosis	-0.14	-1.52	-0.47
Rango	2.70E+08	5.50E+07	2.50E+08
Mínimo	2.30E+08	4.45E+08	2.50E+08
Máximo	5.00E+08	5.00E+08	5.00E+08
Suma	1.41E+09	1.89E+09	1.48E+09

Nota: Elaboración propia.

El análisis estadístico de la actividad lítica de los bacteriófagos sobre *K. pneumoniae* en diferentes valores de pH (6, 7 y 8) revela variaciones significativas en su comportamiento, lo que indica que el pH es un factor determinante en su eficacia.

A un pH de 7, los bacteriófagos muestran la mayor actividad lítica, con  $4.71 \times 10^8$  UFP/mL de media y con  $4.85 \times 10^8$  UFP/mL de mediana, demostrando ser óptimo para su funcionamiento. Además, su desviación estándar y error típico son  $2.39 \times 10^7$  y  $1.20 \times 10^7$ , respectivamente, demostrando así, ser menor a comparación de los otros valores de pH. Por lo tanto, se obtiene menor variabilidad y con actividad más estable.

En contraste, a un pH de 6, la su actividad lítica se reduce a  $3.51 \times 10^8$  UFP/mL, con una mediana de  $3.38 \times 10^8$  UFP/mL. La desviación estándar y el error típico ( $1.15 \times 10^8$  y  $5.77 \times 10^7$ , respectivamente) son relativamente altos, lo que refleja una mayor dispersión en los valores. Este comportamiento puede deberse a

una reducción en la estabilidad estructural o funcional de los bacteriófagos en condiciones más ácidas.

A un pH de 8, la actividad media es de  $3.70 \times 10^8$  UFP/mL, con una mediana de  $3.65 \times 10^8$  UFP/mL. Aunque el rendimiento es ligeramente mayor que en pH 6, sigue siendo menor que en pH 7. La desviación estándar y el error típico ( $1.06 \times 10^8$  y  $5.31 \times 10^7$ , respectivamente) son los más bajos después del pH 7, lo que indica una estabilidad moderada en este entorno alcalino.

El rango de los valores es mayor a pH 7 ( $5.50 \times 10^8$ ), en comparación con los pH 6 y 8 ( $2.70 \times 10^8$  y  $2.50 \times 10^8$ , respectivamente). Esto sugiere que, aunque el pH 7 es óptimo para la mayoría de los bacteriófagos, algunos presentan actividades bajas o más altas, dependiendo de su tolerancia específica al entorno.

En términos de curtosis, los valores son negativos para todos los pH analizados, indicando distribuciones planas con menor concentración de valores en torno a la media. La curtosis es más pronunciada en pH 7 (-1.52), lo que refuerza la idea de una mayor dispersión relativa a este pH. Finalmente, la suma total de actividad lítica alcanza su valor más alto a pH 7 ( $1.89 \times 10^9$  UFP/mL), seguido de pH 8 ( $1.48 \times 10^9$  UFP/mL) y pH 6 ( $1.41 \times 10^9$  UFP/mL). Esto confirma que el entorno neutro es el más favorable para la eficacia global de los bacteriófagos.

En resumen, los datos sugieren que el pH neutro (7) proporciona las condiciones óptimas para la actividad lítica de los bacteriófagos, mientras que los entornos más ácidos o alcalinos (pH 6 y 8) reducen su eficacia y generan una mayor variabilidad en el comportamiento. Esto resalta la importancia de mantener condiciones de pH adecuadas para optimizar la funcionalidad de los bacteriófagos en aplicaciones terapéuticas o ambientales.