

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**TESIS**

**ESTABILIDAD DE LOS BACTERIOFAGOS HEc4I DE *Escherichia*,  
*H33IIK de Klebsiella* Y *H93S DE Salmonella*, BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES DE PRESERVACIÓN**

**PRESENTADO POR:**

**Br. NILDA SHAMIRA GUTIERREZ CARDENAS**

**PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO**

**ASESORA:**

**Mgt. ELSA GLADYS AGUILAR ANCORI**

**FINANCIADO POR EL PROGRAMA  
YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ- UNSAAC.**

**CUSCO - PERU**

**2026**



# Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

## INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-321-2025-UNSAAC)

La que suscribe, la Asesora **Mgt. Elsa Gladys Aguilar Ancori** quien aplica el software de detección de similitud al trabajo de investigación/tesis titulada: **ESTABILIDAD DE LOS BACTERIOFAGOS HEc4I DE Escherichia, H33IIK DE Klebsiella Y H93S DE Salmonella, BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PRESERVACIÓN.**

Presentada por: **NILDA SHAMIRA GUTIERREZ CARDENAS** DNI N° **76059304.**

Para optar el título Profesional de **BIOLOGO**

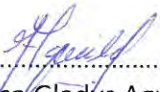
Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por segunda vez, mediante el Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de Similitud en la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de **3 %**.

### Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

| Porcentaje     | Evaluación y Acciones                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Marque con una (X) |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Del 1 al 10%   | No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.                                                                                                                                                                                                                                                               | X                  |
| Del 11 al 30 % | Devolver al usuario para las subsanaciones.                                                                                                                                                                                                                                                                     |                    |
| Mayor a 31%    | El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley. |                    |

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 22 de agosto de 2026

  
Mgt. Elsa Gladys Aguilar Ancori  
Nro. de DNI 23859957  
ORCID del Asesor <https://orcid.org/0000-0002-8942-8868>

#### Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: **oid: 27259:616270522.**

# **NILDA SHAMIRA GUTIERREZ CARDENAS**

## **ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS HEc4I DE Escherichia, H33IIK DE Klebsiella Y H93S DE Salmonella, BAJ...**



Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

### **Detalles del documento**

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:616270522

140 páginas

Fecha de entrega

22 ago 2026, 11:45 a.m. GMT-5

30.958 palabras

Fecha de descarga

22 ago 2026, 12:05 p.m. GMT-5

155.883 caracteres

Nombre del archivo

ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS HEc4I DE Escherichia, H33IIK DE Klebsiella Y H93S DE Sal....pdf

Tamaño del archivo

3.2 MB

## 3% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

### Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

### Fuentes principales

- 3%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 1%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

#### **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La presente tesis intitulada “ESTABILIDAD DE BACTERIÓFAGOS DE *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* Y *Salmonella spp.*, BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PRESERVACIÓN” fue subvencionada mediante el PROGRAMA YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ, bajo RESOLUCIÓN N-R-694-2025-UNSAAC.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, hermanos y Carol.*

*Gracias por enseñarme que por los  
sueños se trabajan, por mantener  
mis pies en la tierra y ser el refugio  
donde siempre puedo volver. Su  
presencia es el regalo más grande  
que la vida me ha dado.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, a la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, por haberme acogido durante todos los años de formación académica y haberme brindado múltiples aprendizajes para mi vida profesional.

A mi asesora la Mgt. Elsa Gladys Aguilar Ancori, por toda la enseñanza impartida a lo largo de mi formación académica, por el apoyo incondicional, la paciencia, la confianza y los consejos dados para el desenvolvimiento personal y profesional.

A la Mgt. Marishani Marín Carrasco y la Blga. Duly Nuñez Carazas por el acompañamiento, apoyo y consejos brindados durante el transcurso de la ejecución de la presente tesis.

Me agradezco a mí misma por la fortaleza y la perseverancia demostradas a pesar de las dificultades. Al leer este trabajo años después, quiero recordar que fui capaz de darlo todo por mis sueños y que, ante cualquier adversidad, elegí no darme por vencida. Lo hice a mi manera.

## INDICE

|                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMEN .....                                                                               | I   |
| ABSTRACT.....                                                                               | II  |
| INTRODUCCION .....                                                                          | III |
| PROBLEMA.....                                                                               | VI  |
| OBJETIVOS .....                                                                             | X   |
| HIPÓTESIS.....                                                                              | XI  |
| VARIABLES .....                                                                             | XII |
| CAPITULO I .....                                                                            | 1   |
| MARCO TEORICO.....                                                                          | 1   |
| 1.1 <i>Antecedentes Internacionales</i> .....                                               | 1   |
| 1.2 <i>Bacteriófagos</i> .....                                                              | 7   |
| 1.2.1     Clasificación taxonómica de los bacteriófagos.....                                | 8   |
| 1.2.2     Estructura de los bacteriófagos .....                                             | 10  |
| 1.2.3     Ciclo de replicación de los bacteriófagos .....                                   | 12  |
| 1.3 <i>Estabilidad térmica de los bacteriófagos</i> .....                                   | 19  |
| 1.4 <i>Concentración fágica o título fágico</i> .....                                       | 19  |
| 1.5 <i>Criopreservación</i> .....                                                           | 19  |
| 1.5.1     Función de los crioprotectores .....                                              | 20  |
| 1.6 <i>Aspectos generales de Escherichia coli</i> .....                                     | 23  |
| 1.6.1     Taxonomía.....                                                                    | 24  |
| 1.6.2 <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476.....                                               | 24  |
| 1.7 <i>Aspectos generales del bacteriófago HEc4I de Escherichia</i> .....                   | 24  |
| 1.7.1     Características fisicoquímicas del fago <i>HEc4I de Escherichia</i> .....         | 25  |
| 1.8 <i>Aspectos generales de Klebsiella pneumoniae</i> .....                                | 26  |
| 1.8.1     Taxonomía.....                                                                    | 27  |
| 1.8.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814.....                                       | 27  |
| 1.9 <i>Aspectos generales del bacteriófago H33IIK de Klebsiella</i> .....                   | 27  |
| 1.9.1     Características fisicoquímicas del bacteriófago <i>H33IIK de Klebsiella</i> ..... | 28  |
| 1.10 <i>Aspectos generales de Salmonella enterica</i> .....                                 | 29  |
| 1.10.1    Taxonomía.....                                                                    | 30  |
| 1.11 <i>Aspectos generales del bacteriófago H93S de Salmonella</i> .....                    | 30  |
| 1.11.1    Características fisicoquímicas del bacteriófago <i>H93S de Salmonella</i> .....   | 31  |
| CAPITULO II .....                                                                           | 32  |

|       |                                                                                                                                                        |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2     | MATERIALES Y METODOLOGIA .....                                                                                                                         | 32 |
| 2.1   | Área de procedencia de las muestras.....                                                                                                               | 32 |
| 2.2   | Área de procesamiento.....                                                                                                                             | 32 |
| 2.3   | Materiales.....                                                                                                                                        | 32 |
| 2.3.1 | Materiales biológicos .....                                                                                                                            | 32 |
| 2.3.2 | Equipos .....                                                                                                                                          | 33 |
| 2.3.3 | Materiales de vidrio.....                                                                                                                              | 33 |
| 2.3.4 | Medios y reactivos.....                                                                                                                                | 34 |
| 2.3.5 | Otros materiales .....                                                                                                                                 | 34 |
| 2.4   | Metodología .....                                                                                                                                      | 35 |
| 2.4.1 | Tipo de investigación .....                                                                                                                            | 35 |
| 2.4.2 | Diseño experimental.....                                                                                                                               | 35 |
| 2.4.3 | Esquema del diseño experimental .....                                                                                                                  | 37 |
| 2.5   | Métodos .....                                                                                                                                          | 38 |
| 2.5.1 | Reactivación de cepas hospederas de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814 y <i>Salmonella enterica</i> . .... | 38 |
| 2.5.2 | Amplificación de fagos .....                                                                                                                           | 38 |
| 2.5.3 | Determinación de la concentración fágica por el ensayo de bicapa .....                                                                                 | 40 |
| 2.5.4 | Preparación de las muestras en soluciones de preservación en ausencia y presencia del crioprotector térmico.....                                       | 41 |
| 2.5.5 | Condiciones de preservación y evaluación de la viabilidad .....                                                                                        | 42 |
| 2.5.6 | Controles de estabilidad de las muestras almacenadas en las diferentes condiciones de preservación .....                                               | 43 |
| 2.5.7 | Análisis estadístico .....                                                                                                                             | 43 |
|       | CAPITULO III.....                                                                                                                                      | 44 |
| 3     | RESULTADOS Y DISCUSION .....                                                                                                                           | 44 |
| 3.1   | Estabilidad del bacteriófago HEc4I de <i>Escherichia</i> en <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476<br>44                                                   |    |
| 3.2   | Análisis de la evaluación de estabilidad del bacteriófago HEc4I de <i>Escherichia</i> de <i>Escherichia</i> .....                                      | 53 |
| 3.3   | Estabilidad del bacteriófago H33IIK de <i>Klebsiella</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814 .....                                           | 55 |
| 3.4   | Análisis de la evaluación de estabilidad del bacteriófago H33IIK de <i>Klebsiella</i> ....                                                             | 64 |
| 3.5   | Estabilidad del bacteriófago H93S de <i>Salmonella</i> en <i>Salmonella enterica</i> .....                                                             | 66 |
| 3.6   | Análisis de la evaluación de estabilidad del bacteriófago H93S de <i>Salmonella</i> .....                                                              | 74 |
|       | CONCLUSION.....                                                                                                                                        | 77 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| RECOMENDACIONES.....            | 79 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 80 |
| ANEXOS .....                    | 94 |

## INDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 01:</b> Clasificación de la clase Caudoviricetes.....                                                                                                                                        | 10 |
| <b>Tabla 02:</b> Estabilidad del bacteriófago <i>HE4cI</i> de <i>Escherichia</i> , hospedero de <i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, evaluado bajo diferentes condiciones de preservación.....         | 45 |
| <b>Tabla 03:</b> Promedio porcentual de la tasa de recuperación del bacteriófago <i>HE4cI</i> de <i>Escherichia</i> bajo diferentes condiciones de preservación.....                                  | 54 |
| <b>Tabla 04:</b> Estabilidad del bacteriófago <i>H33IIK</i> de <i>Klebsiella</i> , hospedero de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814, evaluado bajo diferentes condiciones de preservación..... | 56 |
| <b>Tabla 05:</b> Promedio porcentual de la tasa de recuperación del bacteriófago <i>H33IIK</i> de <i>Klebsiella</i> bajo diferentes condiciones de preservación.....                                  | 65 |
| <b>Tabla 06:</b> Estabilidad del bacteriófago <i>H93S</i> de <i>Salmonella</i> , hospedero de <i>Salmonella enterica</i> , evaluado bajo diferentes condiciones de preservación.....                  | 67 |
| <b>Tabla 07:</b> Promedio porcentual de la tasa de recuperación del bacteriófago <i>H93S</i> de <i>Salmonella</i> bajo diferentes condiciones de preservación.....                                    | 75 |

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 01:</b> Morfotipos de virus según el tipo de cola.....                                                                                                                                                     | 11 |
| <b>Figura 02:</b> Ciclo de replicación del bacteriófago .....                                                                                                                                                        | 13 |
| <b>Figura 03:</b> Proceso de adsorción de fagos mediante la interacción de RBP, y eventos<br>que conducen a la inyección del genoma .....                                                                            | 14 |
| <b>Figura 04:</b> Receptores de la célula Gran- negativa a los que se adhiere un fago con cola.....                                                                                                                  | 15 |
| <b>Figura 05:</b> Mecanismo de acción de las holinas y endolisinas de bacteriófagos.....                                                                                                                             | 18 |
| <b>Figura 06:</b> Esquema de reactivación de cepas criopreservadas.....                                                                                                                                              | 38 |
| <b>Figura 07:</b> Esquema de amplificación de bacteriófagos.....                                                                                                                                                     | 40 |
| <b>Figura 08:</b> Esquema del ensayo de bicapa para la determinación de la concentración fágica                                                                                                                      | 41 |
| <b>Figura 09:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>HEc4I de Escherichia</i> , hospedero de<br><i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, en temperatura ambiente bajo diferentes<br>soluciones de preservación..... | 47 |
| <b>Figura 10:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>HEc4I de Escherichia</i> , hospedero de<br><i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, en 4°C bajo diferentes soluciones de<br>preservación.....                  | 49 |
| <b>Figura 11:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>HEc4I de Escherichia</i> , hospedero de<br><i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, en -20°C bajo diferentes soluciones de<br>preservación.....                | 51 |
| <b>Figura 12:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>HEc4I de Escherichia</i> , hospedero de<br><i>Escherichia coli</i> NCTC 13476, en -80°C bajo diferentes soluciones de<br>preservación.....                | 53 |
| <b>Figura 13:</b> Análisis del bacteriófago <i>HEc4I de Escherichia</i> bajo diferentes condiciones de<br>preservación .....                                                                                         | 55 |

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 14:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H33IIK de Klebsiella</i> , hospedero de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814, en temperatura ambiente bajo diferentes soluciones de preservación..... | 58 |
| <b>Figura 15:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H33IIK de Klebsiella</i> , hospedero de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814, en 4°C bajo diferentes soluciones de preservación.....                  | 60 |
| <b>Figura 16:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H33IIK de Klebsiella</i> , hospedero de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814, en -20°C bajo diferentes soluciones de preservación.....                | 62 |
| <b>Figura 17:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H33IIK de Klebsiella</i> , hospedero de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC BAA 2814, en -80°C bajo diferentes soluciones de preservación.....                | 63 |
| <b>Figura 18:</b> Análisis del bacteriófago <i>H33IIK de Klebsiella</i> bajo diferentes condiciones de preservación.....                                                                                               | 66 |
| <b>Figura 19:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H93S de Salmonella</i> , hospedero de <i>Salmonella enterica</i> , en temperatura ambiente bajo diferentes soluciones.....                                  | 70 |
| <b>Figura 20:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H93S de Salmonella</i> , hospedero de <i>Salmonella enterica</i> , en 4°C bajo diferentes soluciones de preservación.....                                   | 71 |
| <b>Figura 21:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H93S de Salmonella</i> , hospedero de <i>Salmonella enterica</i> , en -20°C bajo diferentes soluciones de preservación.....                                 | 73 |
| <b>Figura 22:</b> Curva de estabilidad del bacteriófago <i>H93S de Salmonella</i> , hospedero de <i>Salmonella enterica</i> , en -80°C bajo diferentes soluciones de preservación.....                                 | 74 |
| <b>Figura 23:</b> Análisis del bacteriófago <i>H93S de Salmonella</i> bajo diferentes condiciones de preservación.....                                                                                                 | 76 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

RBP: Proteínas receptoras de unión.

OmpA: Proteína A de la membrana externa.

OmpC: Proteína C de la membrana externa.

TSB: Caldo Trypticase de Soja.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido.

## RESUMEN

El incremento global de la resistencia bacteriana ha despertado un creciente interés en la fagoterapia. Debido a su alta especificidad y su naturaleza no patógena, los bacteriófagos se posicionan como herramientas prometedoras en diversos ámbitos (medicina clínica, agricultura y seguridad alimentaria). Sin embargo, la ausencia de un protocolo para la preservación de los bacteriófagos limita su aplicación. En la presente investigación se evaluó la estabilidad de los bacteriófagos *HEc4I* de *Escherichia*, *H33IIK* de *Klebsiella* y *H93S* de *Salmonella*, bajo diferentes condiciones de preservación, incluyendo diferentes temperaturas, soluciones de suspensión y crioprotectores durante 135 días. Los resultados determinaron que la estabilidad fágica estuvo influenciada por la interacción entre las condiciones evaluadas, siendo la temperatura el factor más crítico. La ultracongelación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  favoreció la preservación de *HEc4I* y *H33IIK*, mientras que *H93S* mostró mayor estabilidad a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las mayores reducciones de viabilidad se observaron a temperatura ambiente y durante la congelación lenta a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , relacionados a la desnaturalización proteica y al daño mecánico causado por la formación de hielo. Respecto a las soluciones de suspensión, el buffer SM mostró mejor desempeño en la mayoría de las condiciones evaluadas. Asimismo, el DMSO al 10% presentó mejor desempeño a temperatura ambiente y refrigeración, mientras que el glicerol fue más efectivo bajo condiciones de congelación. Sin embargo, la eficacia de las soluciones de suspensión y los crioprotectores dependió de las características particulares de cada bacteriófago. Nuestros resultados permiten optimizar los protocolos de preservación para futuras aplicaciones en biomedicina y biotecnología.

**Palabras clave:** Viabilidad, Criopreservación, Crioprotectores, Estabilidad fágica, Dimetilsulfóxido.

## ABSTRACT

The global increase in bacterial resistance has generated growing interest in phage therapy. Due to their high specificity and non-pathogenic nature, bacteriophages are considered promising tools in clinical medicine, agriculture, and food safety. However, the lack of standardized preservation protocols limits their application. This study evaluated the stability of the bacteriophages *HEc4I* of *Escherichia*, *H33IIK* of *Klebsiella*, and *H93S* of *Salmonella* under different preservation conditions, including temperatures, suspension solutions, and cryoprotectants, over 135 days. The results showed that phage stability was influenced by the interaction among the evaluated conditions, with temperature being the most critical factor. Ultra-freezing at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  favored the preservation of *HEc4I* and *H33IIK*, whereas *H93S* showed greater stability at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The greatest reductions in viability were observed at room temperature and during slow freezing at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , associated with protein denaturation and mechanical damage caused by ice formation. Regarding suspension solutions, SM buffer showed better performance under most of the evaluated conditions. Likewise, 10% DMSO performed better at room temperature and under refrigeration, whereas glycerol was more effective under freezing conditions. Nevertheless, the effectiveness of suspension solutions and cryoprotectants depended on the specific characteristics of each bacteriophage. These findings contribute to optimizing bacteriophage preservation protocols for future biomedical and biotechnological applications.

**Keywords:** Viability, Cryopreservation, Cryoprotectants, Phage stability, Dimethylsulfoxide.

## INTRODUCCION

Los bacteriófagos son virus de estructura sencilla y tamaño pequeño que varían entre 20 a 200 nanómetros. Su mecanismo de acción es altamente específico: emplean bacterias como huéspedes para su replicación y al finalizar su ciclo, provocan la destrucción de la bacteria mediante lisis bacteriana (Cui et al., 2024; Kaur et al., 2023; Serrano, 2020).

Debido a su abundancia en la naturaleza, los bacteriófagos tienen múltiples aplicaciones en la medicina clínica, veterinaria, agricultura, seguridad alimentaria, entre otros campos; ya que su aplicación ha demostrado ser efectiva, sin reporte de efectos adversos (Cui et al., 2024; Faltus, 2024; Jonczyk et al., 2019; Kortright et al., 2019; Palma & Qi, 2024; Pires et al., 2020; Yuan et al., 2019). En el sector agrícola, se emplean cocteles de fagos incorporados en el riego por goteo y en productos biopesticidas, como alternativa para controlar enfermedades bacterianas en cultivos, reduciendo el uso de antibióticos y la propagación de resistencia antimicrobiana (Farooq et al., 2022; Fathima & Archer, 2021). En la acuicultura, los fagos se emplean para el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas en peces y mariscos mediante su aplicación en los tanques de criaderos, reduciendo la dependencia de antibióticos y mejorando la seguridad del consumo humano (Ramos et al., 2021). En la industria alimentaria, los fagos se utilizan como recubrimiento bioactivo de los envases para la bioconservación de productos cárnicos, lácteos y vegetales frescos, previniendo el crecimiento de patógenos y conservando los alimentos (Barzegar et al., 2026; Fathima & Archer, 2021; Luque et al., 2024; Zia & Alkheraije, 2023). En el sector minorista, se ha desarrollado aerosoles (spray) a base de bacteriófagos aplicados directamente sobre los alimentos frescos, con el fin de prevenir las contaminaciones bacterianas antes de que lleguen al consumidor final (Rivera et al., 2025). Además, en el ámbito biomédico, se estudian para la terapia fágica en infecciones resistentes a los antibióticos (Cui et al., 2024) y en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos (Fathima & Archer, 2021). En este contexto, los organismos regulatorios como la Agencia

Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) clasificaron a los bacteriofagos como nuevos productos biomédicos de investigación emergente (eIND) (Fauconnier, 2019; Xu et al., 2023). Asimismo, la Comisión Europea de Farmacopea ha priorizado el desarrollo y estandarización de Productos Medicinales para Terapia con Fagos, conocidos como Phage Therapy Medicinal Products (PTMP). Estos productos son preparados de fagos naturales o genéticamente modificados, formulados de forma individual o cócteles de fagos, destinados al tratamiento y prevención de infecciones bacterianas (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare., 2024).

No obstante, la eficacia de los bacteriófagos depende en gran medida de la estabilidad y del mantenimiento de la concentración adecuada durante el almacenamiento y procesamiento (Malik et al., 2017). La pérdida de la viabilidad no solo implica una reducción cuantitativa de la concentración, también una disminución cualitativa de su capacidad infectiva, comprometiendo la absorción al hospedero, la inyección del genoma y, en consecuencia, su actividad lítica (Malik et al., 2017; Pires et al., 2020). Esta disminución en la concentración fagica reduce su efectividad antimicrobiana y limita su aplicación en los diferentes ámbitos.

La actividad lítica depende de alcanzar una multiplicidad optima de infección (MOI) efectiva que permita iniciar ciclos replicativos eficientes y lograr una reducción significativa de la población bacteriana (Kortright et al., 2019; Malik et al., 2017; Zhang et al., 2022b), una disminución del título fágico durante el almacenamiento puede impedir alcanzar la dosis mínima efectiva, reduciendo la capacidad de infección y comprometiendo los resultados (Blasco et al., 2025; Fathima & Archer, 2021; Malik et al., 2017). Además de ello, concentraciones subóptimas pueden facilitar el desarrollo de resistencia bacteriana frente al fago (Palma & Qi, 2024).

Diversos estudios demostraron que la estabilidad de los bacteriófagos está relacionada a factores ambientales como la temperatura, el pH y la composición de las soluciones de preservación, los cuales pueden provocar desnaturalización proteica, agregación de partículas o daño estructural irreversible (Wdowiak et al., 2022), los cuales afectan la estabilidad del ADN y la actividad biológica del fago (Jonczyk et al., 2019; Phuong et al., 2022; Xiao et al., 2022). Estudios recientes demostraron que la interacción entre la temperatura, soluciones de almacenamiento y el uso de crioprotectores influyen significativamente en la estabilidad de los fagos líticos durante su almacenamiento (Bagińska et al., 2024; Cieślik et al., 2022; Huang et al., 2025; Selcuk et al., 2024; Xiao et al., 2022; Xu et al., 2023; Zhai et al., 2023). Es por ello que, identificar las soluciones de preservación efectivas y la temperatura óptima de almacenamiento son esencial para garantizar la estabilidad de los bacteriófagos a largo plazo.

En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo evaluar la estabilidad de bacteriófagos de *HEc4I* de *Escherichia*, *H33IIK* de *Klebsiella* y *H93S* de *Salmonella* bajo diferentes condiciones de preservación. Se analizaron diferentes variables como la solución de almacenamiento (Caldo TSB vs. buffer SM), la eficacia de crioprotectores (glicerol al 30% vs. DMSO al 10%), la influencia de la temperatura (-80°C, -20°C, 4°C y temperatura ambiente) y la viabilidad de los bacteriófagos a lo largo de 135 días. Estos resultados contribuirán al desarrollo de estrategias de conservación óptimas, facilitando su aplicación en biotecnología y terapia fágica.

## PROBLEMA

El uso indiscriminado de antibióticos en los diferentes ámbitos (clínico, seguridad alimentaria, agricultura, entre otros) y el estancamiento en el desarrollo de nuevos fármacos ha dado lugar al aumento de la resistencia bacteriana (Fathima & Archer, 2021; Organización Mundial de la Salud, 2025). Este fenómeno compromete la eficacia de los tratamientos convencionales y representa una amenaza crítica para la salud pública mundial frente a patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp*, asociados a infecciones multirresistentes (Mansouri et al., 2021; Ochońska & Brzywczy, 2024; OMS, 2025).

En este contexto, los bacteriófagos, virus que infectan bacterias, han resurgido como alternativas o complementos a los antibióticos, especialmente contra cepas bacterianas resistentes (Blasco et al., 2025; Bolsan et al., 2024; Cui et al., 2024; Selcuk et al., 2024). Su alta especificidad (capacidad de autoamplificación en presencia del hospedero) y bajo impacto sobre la microbiota normal, los posiciona como herramientas prometedoras en fagoterapia, seguridad alimentaria, acuicultura y aplicaciones biotecnológicas (Kaur et al., 2023; Palma & Qi, 2024; Zia & Alkheraije, 2023). Además, avances recientes en la formulación de agentes antimicrobianos y la formulación de posibles vacunas están permitiendo ampliar su potencial uso clínico e industrial (Kaur et al., 2023; Wdowiak et al., 2022; Zhai et al., 2023).

Sin embargo, a pesar de las ventajas evidenciadas, estas aplicaciones se ven limitadas debido a la pérdida de la actividad lítica del bacteriófago contra bacterias patógenos durante el almacenamiento y procesamiento (Blas, 2023; Lobočka et al., 2018; Pires et al., 2020; Vázquez et al., 2022). La estabilidad de los fagos depende en gran medida de factores fisicoquímicos externos como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la composición de los buffers, la presencia o ausencia de crioprotectores y el estrés mecánico durante manipulación o transporte (Hernández et al., 2025; Jonczyk et al., 2019; Phuong et al., 2022; Wdowiak et al., 2022). La exposición a condiciones inadecuadas puede provocar la degradación del ADN fágico,

desnaturalización de proteínas, daño en la cápside y alteraciones en las fibras de adhesión, reduciendo la viabilidad de los viriones, ocasionando la disminución del título fágico (González et al., 2018; Xiao et al., 2022; Xu et al., 2023; Zhai et al., 2023). Esta reducción compromete la multiplicidad de infección (MOI) efectiva, disminuyendo la eficiencia de adsorción y replicación, y por ende la eficacia antimicrobiana o de biocontrol (Kortright et al., 2019; Pires et al., 2020).

Asimismo, cada bacteriófago presenta características estructurales y genéticas específicas, que determinan respuestas variables frente a las condiciones de preservación (Huang et al., 2025; Marton et al., 2024). Estas diferencias explican por qué un método de almacenamiento puede ser adecuado para un fago y no para otro, lo que dificulta la estandarización de protocolos universales (Huang et al., 2025; Lobočka et al., 2018; Wdowiak et al., 2022; Xiao et al., 2022).

Ante esta situación surge la siguiente interrogante:

¿Cuál es la estabilidad de los bacteriófagos *HEc4I* de *Escherichia*, *H33IIK* de *Klebsiella* y *H93S* de *Salmonella* bajo diferentes condiciones de preservación?

### **Interrogantes específicas**

1. ¿Cuál es la estabilidad del bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* a diferentes temperaturas, soluciones de suspensión, crioprotectores y periodos de almacenamiento?
2. ¿Cuál es la estabilidad del bacteriófago *H33IIK* de *Klebsiella* a diferentes temperaturas, soluciones de suspensión, crioprotectores y periodos de almacenamiento?
3. ¿Cuál es la estabilidad del bacteriófago *H93S* de *Salmonella* a diferentes temperaturas, soluciones de suspensión, crioprotectores y periodos de almacenamiento?

## JUSTIFICACION

La resistencia a los antibióticos se ha incrementado a nivel mundial hasta alcanzar niveles alarmantes (O.M.S., 2025). Este fenómeno tiene el potencial de convertirse en una de las principales causas de muerte a escala mundial, especialmente ante la escasez de nuevos antibióticos (Calancha, 2023; Cui et al., 2024).

Ante esta situación, se viene impulsado la investigación e implementación de terapias basadas en bacteriófagos (Faltus, 2024), pues el uso de bacteriófagos podría ser una estrategia prometedora para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multidrogoresistentes (MDR), ya que estos se dirigen a cepas bacterianas específicas, reduciendo los efectos no deseados en organismos no objetivos (Hernández et al., 2025).

La alta especificidad de los fagos asegura que no dañan la microbiota normal y beneficiosa del hospedador, el alimento o el medio ambiente (Kim et al., 2024). Esta inocuidad ha sido confirmada en estudios clínicos con 15 voluntarios adultos donde administraron el fago T4 específico de *E. coli*; los resultados no evidenciaron cambios significativos en la microbiota intestinal ni efectos adversos en la salud intestinal (Bruttin & Brüssow, 2005). Estos hallazgos apoyan la idea de que los fagos líticos tienen un perfil seguro. De acuerdo con Kortright (2019) *“utilizar virus líticos como "medicamentos" amplificadores que atacan y matan a las células susceptibles puede ser más eficiente que aplicar antibióticos que no pueden auto amplificarse”*. Su aplicación se extiende a diversos campos, como medicina clínica, seguridad alimentaria, agricultura, acuicultura, entre otros, sin presentar problemas de seguridad adversos (Faltus, 2024; González et al., 2018; Kortright et al., 2019; Palma & Qi, 2024; Pires et al., 2020; Yuan et al., 2019). Estudios recientes vienen demostrando que los bacteriófagos pueden actuar como portadores en la transmisión de genes, contribuyendo en la posible formulación de vacunas (Selcuk et al., 2024). Debido al potencial terapéutico, los bacteriófagos están clasificados como productos biomédicos por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y

como nuevos medicamentos de investigación emergente (eIND) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Fauconnier, 2019; Xu et al., 2023). La Comisión Europea de Farmacopea ha priorizado el desarrollo de productos medicinales para terapia con fagos (PTMP), resaltando la necesidad de garantizar su calidad, seguridad y eficacia (E.D.Q.M.H., 2024).

Sin embargo, la estabilidad de los bacteriófagos es un factor clave en su desarrollo y comercialización de productos fágicos (Wdowiak et al., 2022), ya que su concentración tiende a disminuir gradualmente durante su preservación y procesamiento, condicionando su eficacia (Blas, 2023; Cao et al., 2023; Pires et al., 2020). Este decaimiento del título fágico se ve influenciada por diversos factores, como cambios de temperatura, componentes de las soluciones de preservación, variaciones de pH y la presencia de crioprotectores (Jonczyk et al., 2019; Xiao et al., 2022). Por ello, garantizar la estabilidad de los bacteriófagos a largo plazo son aspectos fundamentales (Selcuk et al., 2024).

Debido a que cada fago presenta un perfil de estabilidad único según las condiciones ambientales, es indispensable establecer mecanismos de transporte y almacenamiento, ya sea en mezclas puras o heterogéneas (Marton et al., 2024). Asimismo, las agencias reguladoras de diferentes países exigen estudios de estabilidad para garantizar la eficacia y seguridad de los productos basados en fagos antes de su aprobación en uso terapéutico (Blasco et al., 2025; Xu et al., 2023).

En este contexto, esta investigación buscó identificar las condiciones óptimas de preservación para maximizar la estabilidad y la vida útil de los bacteriófagos, minimizando los riesgos de inactivación y contaminación (Xiao et al., 2022; Xu et al., 2023).

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar la estabilidad de los bacteriófagos HEc4I de *Escherichia*, H33IIK de *Klebsiella* y H93S de *Salmonella*, bajo diferentes condiciones de preservación.

### Objetivos específicos

1. Determinar la estabilidad del bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* en diferentes temperaturas, soluciones de suspensión, crioprotectores y periodos de almacenamiento.
2. Determinar la estabilidad del bacteriófago *H33IIK* de *Klebsiella* en diferentes temperaturas, soluciones de suspensión, crioprotectores y periodos de almacenamiento.
3. Determinar la estabilidad del bacteriófago *H93S* de *Salmonella* en diferentes temperaturas, soluciones de suspensión, crioprotectores y periodos de almacenamiento.

## **HIPÓTESIS**

La estabilidad de los bacteriófagos *HEc4I* de *Escherichia*, *H33IIK* de *Klebsiella* y *H93S* de *Salmonella* varía significativamente según las condiciones de preservación, determinadas por la temperatura, la solución de suspensión, el crioprotector y el periodo de almacenamiento.

## VARIABLES

### Variables Independientes

- Soluciones de suspensión (Buffer SM y Caldo TSB)
- Crioprotectores térmicos (glicerol al 30% y DMSO 10%)
- Temperaturas (temperatura ambiente, 4°C, -20°C y -80°C)
- Periodos de almacenamiento (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 y 135 días)

### Variables dependientes

- Concentración de los bacteriófagos de *HEc4I* de *Escherichia*, *H33IIK* de *Klebsiella* y *H93S* de *Salmonella*.

### Operacionalización de variables

| Variable                           | Definición Conceptual                                                | Indicadores                                                                   | Instrumento de medida                     |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Soluciones de suspensión           | Sustancias para preservar la viabilidad de los fagos                 | Buffer SM y Caldo TSB                                                         | Registro de soluciones utilizadas         |
| Crioprotectores térmicos           | Agentes utilizados para proteger los fagos de daños por congelación. | glicerol al 30% y DMSO 10%                                                    | Registro de crioprotectores utilizados    |
| Temperaturas                       | Niveles de temperaturas a las cuales serán sometidos los fagos.      | Temperatura ambiente, 4°C, -20°C y -80°C                                      | Termohigrómetros calibrados.              |
| Periodo de almacenamiento          | Duración del almacenamiento de los fagos.                            | 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 y 135 días                                | Registro de tiempos de almacenamiento.    |
| Concentración de los bacteriófagos | Población de bacteriófagos presentes en una muestra.                 | Recuento de unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro (ml) de muestra. | Pruebas de dilución y recuento de placas. |

# CAPITULO I

## MARCO TEORICO

### 1.1 Antecedentes Internacionales

**Huang et al. (2025)** realizaron un estudio en Alemania sobre la estabilidad de 4 fagos de *Escherichia coli*: T7, T4, PhiX174 y MS2, donde evaluaron diferentes soluciones de almacenamiento (Caldo LB, buffer SM, buffer SM sin gelatina), temperaturas (4°C, -20°C y -80°C), presencia o ausencia de glicerol al 20% y 2 concentraciones iniciales de almacenamiento ( $10^8$  y  $10^9$  UFP/mL) durante 24 meses. Se observó que los fagos T4 y T7 sufrieron reducciones severas de 5,9 y 4,7 log, respectivamente, en tampón SM a 4 °C, cuando se almacenaron a una concentración inicial de  $10^8$  UFP/ml; mientras que, al almacenarse a la concentración de  $10^9$  UFP/ml, la disminución fue menor a 0,5 log. El fago MS2 se inactivó a los 6 meses al ser almacenado en buffer SM a 4 °C, aunque su estabilidad mejoró notablemente cuando se almacenó en Caldo LB a 4 °C. El fago PhiX174 mostró mayor estabilidad en las soluciones probadas con reducciones mínimas (<0,5 log de reducción). A -20 °C se observó mayor susceptibilidad al daño por congelación lenta. En contraste, la congelación rápida y el almacenamiento a -80 °C favorecieron la estabilidad fágica. El efecto del glicerol fue variable y dependiente del fago y del medio de almacenamiento. Asimismo, T4 mostró mayor vulnerabilidad a la congelación, atribuida al daño mecánico asociado a su estructura de cola larga. Los autores concluyeron que la estabilidad depende de la interacción entre las características del bacteriófago y las condiciones de preservación.

**Bagińska et al. (2024)** llevaron a cabo una investigación en Polonia para evaluar la estabilidad de bacteriófagos específicos de *Acinetobacter baumannii* durante 1 año de almacenamiento a diferentes temperaturas (20-25°C, 4°C y -70°C) en buffer SM, con y sin glicerol al 25% en -70°C. Los resultados mostraron que los bacteriófagos

permanecieron estables a 4° y -70°C, independientemente de la presencia del agente crioprotector; así mismo, se evidenció que 20 a 25°C es la temperatura menos eficaz para la preservación, ya que el fago Aclw\_9 disminuyó de  $7,4 \times 10^7$  UFP/mL a  $1,75 \times 10^1$  UFP/mL en 2 meses, y a los 3 meses no se detectaron partículas de fagos activas; los fagos Acba\_6 y Acba\_11 fueron indetectables tras 4 meses. Después de 12 meses, Acba\_6 presentó reducciones de 4,1 log UFP/mL a 4 °C; de 3,8 log UFP/mL a -70 °C; y de 4,7 log UFP/mL a -70 °C con glicerol. Para Aclw\_9, la disminución fue de 3,6 log UFP/mL a 4 °C y -70 °C con glicerol, y de 3,2 log UFP/mL a -70 °C sin glicerol. En el caso de Acba\_11, la reducción fue de 3,9 log UFP/mL a 4 °C y de 2,4 log UFP/mL a -70 °C, con y sin glicerol.

**Selcuk et al. (2024)** realizaron estudios en Turquía en los que analizaron la estabilidad del bacteriófago lítico de *Pseudomonas syringae* y del lisogénico MRSA, empleando crioprotectores como glicerol al 20%, DMSO al 10% + cloroformo al 5% y azida sódica al 0.05%, a temperaturas variadas (temperatura ambiente, 4°C, -20°C, -80°C) durante 8 meses. El estudio reveló que los fagos lisogénicos presentan una disminución significativa más rápida en comparación de los fagos líticos en todas las condiciones de almacenamiento. El fago lítico de *Pseudomonas syringae* evidenció que el almacenamiento a temperaturas ultra bajas (-80°C), especialmente en presencia de DMSO, es muy efectivo para conservar la integridad del virión, registrando pérdidas  $\leq 2$  log UFP/mL. En contraste, a 4 °C y a temperatura ambiente, se registraron disminuciones de  $\geq 5$  log UFP/mL, siendo el glicerol al 20% el protector menos eficaz, debido a que su viscosidad induce la agregación proteica. Por el contrario, la combinación de DMSO con cloroformo mostró una eficacia óptima para mantener la viabilidad tanto a 4 °C como a -20 °C. Resaltando que, la elección del crioprotector debe alinearse estrictamente con la

temperatura a emplear durante el almacenamiento, para evitar la desnaturalización proteica.

**Baqer et al., (2023)** realizaron estudios en Pakistán para evaluar la concentración fagica de 8 bacteriófagos aislados para *Klebsiella pneumoniae* almacenados durante un periodo de 4 meses a 4°C en buffer SM. Se evidenció una ligera caída en la concentración de bacteriófagos, que oscila entre 0.18 y 1,2 log. Este resultado planteó que 4°C fue la temperatura óptima para almacenamientos prolongados.

**Blas (2023)** realizó un estudio en Chile para analizar de la estabilidad de 2 bacteriófagos de *Vibrio alginolyticus* en solución buffer SM bajo diferentes temperaturas (4°C, -20°C y -80°C) en un periodo de 30 días. Los resultados obtenidos evidencian que a -80° C los fagos presentan una mayor estabilidad durante la preservación; sin embargo, a -20°C en los primeros 15 días se manifestó una caída del título bastante evidente, este fenómeno lo relaciono a la formación de cristales de hielo durante la congelación lenta. A 4°C los fagos mantuvieron su estabilidad durante los primeros días; sin embargo, al día 26 se evidenció una reducción de 1 log, recalcando que a -80° C es la temperatura óptima para almacenamientos a largo plazo.

**Xu et al. (2023)** ejecutaron investigaciones en China respecto a la preservación de la estabilidad del bacteriófago *Aeromonas salmonicida* durante 12 meses en buffer SM bajo diferentes temperaturas de almacenamiento (28°C, 4°C, -20°C y -80°C) junto a 2 crioprotectores (dimetilsulfóxido al 10% y glicerol al 30%) para -20°C y -80°C, independientemente. El almacenamiento a 4°C en buffer SM evidenció una concentración estable que oscila entre  $1 \times 10^{10}$  y  $5 \times 10^{10}$  UFP/mL, lo que evidenció que esta temperatura es óptima para la preservación a mediano plazo. En contraste, a 28°C se evidenció una disminución de 8 log durante los 12 meses de almacenamiento. De manera similar, los fagos almacenados a -20 °C en buffer SM disminuyeron en más de 4 log

durante los 12 meses. No obstante, la incorporación de crioprotectores mejoró la estabilidad, manteniendo los títulos en  $5 \times 10^8$  UFP/mL con 10 % DMSO y  $1 \times 10^6$  UFP/mL con 30 % de glicerol. Los fagos almacenados en buffer SM a  $-80^\circ\text{C}$  presentaron una disminución inicial de 3 log durante los primeros 30 días, seguida de 3 log en los siguientes 11 meses. Sin embargo, la adición de DMSO al 10% permitió mantener una concentración de  $4 \times 10^8$  UFP/mL, mostrando mayor eficacia en comparación del glicerol al 30%, el cual presentó una reducción aproximada de 4 log.

**Cieřlik et al. (2022)** efectuaron investigaciones en Polonia respecto a la estabilidad de bacteriófagos de *Enterobacter spp.* (Entb\_45 y Entb\_43) almacenados a  $37^\circ\text{C}$ ,  $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ$  y  $-70^\circ\text{C}$  durante 6 meses en agua tamponada, con o sin la adición de glicerol al 20% en  $-70^\circ\text{C}$ . El almacenamiento tanto a  $4^\circ\text{C}$  como a  $-70^\circ\text{C}$ , con o sin crioprotector, fue efectivo, ya que no se evidenció daños significativos del título (la disminución fue  $\leq 1$  log). Por otro lado, a  $37^\circ\text{C}$  no se evidenciaron partículas activas del fago Entb\_45 luego de las 18 semanas de almacenamiento, mientras que Entb\_43 disminuyó 9 log después de 24 semanas (1 log UFP/mL concentración final). El almacenamiento a  $20\text{-}25^\circ\text{C}$  evidenció una reducción de 5 log y 3 log para Entb\_45 y Entb\_43 respectivamente. Los resultados indican que la congelación profunda preserva eficientemente la viabilidad fágica, mientras que las temperaturas elevadas aceleran la inactivación viral.

**Phuong et al., (2022)** realizaron investigaciones en Vietnam con el fin de evaluar la viabilidad de los fagos de *Salmonella spp.* Almacenados en buffer SM, suplementados con 50% de glicerol y 5% de DMSO, y buffer SM al 10%; bajo 4 temperaturas (temperatura ambiente,  $4^\circ\text{C}$ ,  $-20^\circ\text{C}$  y  $-80^\circ\text{C}$ ) durante 12 meses. Se evidenció que el buffer SM con glicerol al 50% no mostró diferencias significativas bajo las 4 temperaturas evaluadas, ya que se recuperó 89.4-89.8% de la población fágica almacenada. En el buffer SM al 10% se observó una estabilidad adecuada a temperatura ambiente y a  $4^\circ\text{C}$ ,

ya que el porcentaje de recuperación fue de 88.9 y 90.2%, respectivamente. Sin embargo, a -20°C se registraron descensos marcados en las concentraciones fágicas, lo que sugiere que el buffer SM al 10% requiere un crioprotector para contrarrestar la reducción de la concentración fágica debido a la formación de cristales de hielo. El buffer SM suplementado con DMSO al 5% evidenció valores similares en las 4 temperaturas, pero su estabilidad durante los 12 meses fue menor en comparación con las otras soluciones empleadas, ya que el porcentaje de recuperación osciló entre 88.3-88.5%. Así mismo, se determinó que la condición óptima para la preservación a largo plazo de los bacteriófagos es a 4°C en buffer SM suplementado con glicerol al 50%.

**Xiao et al. (2022)** realizaron su investigación en China, donde evaluaron la estabilidad del bacteriófago VP3 de *Vibrio cholerae*, analizando la influencia de diferentes temperaturas (4°C, -20°C y -80°C), medios de conservación (Caldo Luria Bertani (LB) y buffer SM), y el efecto de dos crioprotectores (glicerol al 30% y DMSO al 10%) durante un período de 20 semanas. Los resultados evidenciaron que la supervivencia del fago depende fuertemente de la interacción entre la temperatura y el medio. A 4°C, el fago mostró una estabilidad moderada sin aditivos (41% en Caldo LB y 35% en SM). La adición del glicerol al 30% mejoró estas tasas de supervivencia (53% en Caldo LB y 45% en buffer SM), mientras que DMSO al 10% mostró un efecto negativo en las tasas de recuperación (32% en Caldo LB y 18% en buffer SM). No obstante, a -20°C, las muestras sin crioprotectores sufrieron una inactivación casi total (1-4% de supervivencia). Sin embargo, la adición de crioprotectores mejoró significativamente la viabilidad del fago, el glicerol al 30% fue más efectivo (57% en Caldo LB y 48% en buffer SM), mientras que el DMSO al 10% mostró un efecto protector moderado (39% tanto en Caldo LB como en buffer SM). Los resultados a -80°C evidenciaron que el fago presenta una inactivación casi total. Mientras que la adición de DMSO al 10% resultó ser el

crioprotector más efectivo, manteniendo altas tasas de supervivencia (61% en Caldo LB y 36% en buffer SM). Por otro lado, la adición de glicerol al 30% fue perjudicial a esta temperatura, con tasas de supervivencia más bajas (34% en Caldo LB y 13% en buffer SM)

**Alvi et al., (2018)** llevaron a cabo una investigación en Polonia para evaluar la estabilidad de 5 bacteriófagos durante la preservación en Caldo LB, con y sin la adición de glicerol al 15%, bajo diferentes temperaturas (37°C, 25°C, 4°C, -20°C y -80°C) en 12 meses. Determinaron que la preservación más efectiva es a 4°C, ya que no se evidenciaron reducciones sustanciales en el título. Por otro lado, en condiciones de congelación de -20°C y -80°C, incluso con la adición de glicerol al 15%, se evidenció una reducción de la concentración fágica, con pérdida del 25-70% y 45-100%, respectivamente. Asimismo, se determinó que a temperaturas elevadas el impacto es más drástico ya que la recuperación de viriones activos fue baja, pues a 37°C se evidenció una reducción del 84-100% y a 25°C se evidenció una reducción del 69-100% de la concentración fágica.

**González et al. (2018)** realizaron investigaciones en España, donde evaluaron la estabilidad de 4 fagos bajo diferentes condiciones: a temperatura ambiente (20 a 25°C) y refrigeración (4°C) se utilizó Caldo TSB; mientras que, a temperaturas de congelación (-20°C, -80° y -196°C) se utilizó buffer SM con varios crioprotectores independientemente (glicerol al 15%, trehalosa 0.8M, sacarosa al 0.8M y leche desnatada al 11%). A temperatura ambiente (20-25°C) durante 6 meses, se evidenció una reducción de 4.4 logaritmos; mientras que la disminución del título fágico a 4°C fue significativa, pues osciló a 1-3 logaritmos durante los 12 meses evaluados. Por otro lado, se evidenció que la estabilidad a -20°C fue variable y dependiente tanto del tipo de fago como del estabilizante utilizado. En el caso de los fagos Siphovirus, las pérdidas fueron menores a

0.2 logaritmos cuando se emplearon crioprotectores como glicerol, trehalosa, sacarosa o leche descremada. Por el contrario, los Myovirus mostraron menor sensibilidad, ya que se inactivaron totalmente al emplear trehalosa o sacarosa, asociado a la formación de hielo. Aunque el glicerol ofreció cierta protección, se evidenciaron reducciones de  $< 0.9$ -3.6 logaritmos. Asimismo, se evidenció que  $-80^{\circ}\text{C}$  no presentó reducciones significativas en el título fágico luego de los 24 meses.

## **1.2 Bacteriófagos**

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, se caracterizan por ser virus, de estructura sencilla y pequeña, formados por un ácido nucleico que consiste en ADN (u ocasionalmente ARN) el cual se encuentra protegido por la cápside. Estos virus son capaces de introducirse en el interior de células vivas específicas, reproducirse y destruirlas como parte de su ciclo de replicación (Ge et al., 2022).

El estudio de bacteriófagos inicia de forma paralela a principios del siglo XX, por Frederick Twort (1915) y Felix d'Herelle (1917), aunque su actividad lítica ya había sido observada por Ernst Hankin (1896). Twort demostró que la formación de calvas en las placas de cultivos de bacterias se debía a la presencia de agentes infecciosos no filtrables, capaces de infectar bacterias y matarlas (Domínguez, 2020; Fuentes et al., 2021; Garcia, 2013). Por otro lado, Felix d'Herelle (1917) observó que había un agente al que llamó “microbio invisible”, que se encontraba en el intestino de personas recuperadas de una infección, pero no en el de personas enfermas o sanas. Este agente era capaz de matar bacterias, mantenía su actividad luego de ser filtrado y se podía transmitir, por lo que dedujo que se trataba de un germen vivo que no crecería en un medio artificial, siendo un parásito obligatorio, al que llamó “bacteriófago” (Domínguez, 2020; Fuentes et al., 2021).

Los bacteriófagos se encuentran en los hábitats más hostiles existentes, desde fuentes termales hasta dentro de microorganismos; por ende, son reconocidos como los microorganismos más abundantes y diversificados de la tierra (Ayala et al., 2023; Padrón, 2023; Zhang et al., 2022a). Se estima que en el ecosistema se alberga una población total de  $10^{31}$  y  $10^{33}$  fagos (Zhang et al., 2022a).

Esta abundancia surge debido a los mecanismos de resistencia de los fagos durante el proceso de infección, pues adquirieron una adaptación dinámica cuando se enfrentan a los huéspedes bacterianos, ya que pueden reducir la virulencia de las bacterias (Padrón, 2023). La mayor parte de bacteriófagos descritos pertenecen al orden Caudovirales, siendo fagos con cola y DNA bicatenario lineal, de DNA o ARN, superenrollados o segmentados, o fagos con envoltura lipídica (Garcia, 2013; Giri, 2021; Padrón, 2023).

### **1.2.1 Clasificación taxonómica de los bacteriófagos**

La clasificación de los bacteriófagos ha experimentado una transformación radical, evolucionando desde un enfoque puramente visual hacia una taxonomía genómica (Giri, 2021).

Sin embargo, estos parámetros morfológicos no reflejaban con precisión las relaciones evolutivas y funciones particulares, lo que llevó al Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) a implementar un enfoque de clasificación genómico basado en la similitud de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, análisis filogenético de genes conservados implicados en funciones esenciales del ciclo viral y el estudio de pliegues proteicos (Zerbini et al., 2023).

Para el 2025 se realizaron importantes reformas taxonómicas propuestas por el ICTV. Estas reformas incluyen la abolición del orden Caudovirales y las familias Myoviridae, Siphoviridae y Podoviridae, reemplazándolas por un sistema más

preciso basado en análisis de secuencias genómicas completas. La clase Caudoviricetes, que agrupa virus con ADN bicatenario y cola, alberga 11 órdenes con 105 familias, 132 subfamilias, 1679 géneros y 5798 especies asignadas (Turner et al., 2025). En la Tabla 01 se muestra la clasificación de la clase Caudoviricetes, que comprende 11 órdenes asignados con sus familias respectivas, la cantidad de subfamilias y los géneros de estos.

**Tabla 01***Clasificación de la clase Caudoviricetes*

| Clase          | Orden                    | Familia                                                                                                                                        |
|----------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Caudoviricetes | <i>Thumleimavirales</i>  | <i>Soleiviridae</i><br><i>Halomagnusviridae</i><br><i>Hafunaviridae</i><br><i>Druskaviridae</i>                                                |
|                | <i>Pantevenviraes</i>    | <i>Ackermannviridae</i><br><i>Kyanoviridae</i><br><i>Estrabovirus</i>                                                                          |
|                | <i>Nakonviraes</i>       | <i>Ahpuchviridae</i><br><i>Ekchuahviridae</i>                                                                                                  |
|                | <i>Metanobavirus</i>     | <i>Anaerodiviridae</i><br><i>Armatusviridae</i><br><i>Kairosviridae</i><br><i>Leisingerviridae</i><br><i>Pigerviridae</i><br><i>Usuviridae</i> |
|                | <i>Magrovirales</i>      | <i>Aoguangviridae</i><br><i>Apasviridae</i><br><i>Krittikaviridae</i>                                                                          |
|                | <i>Kirjokansivirales</i> | <i>Graaviviridae</i><br><i>Haloferuviridae</i><br><i>Pyrstoviridae</i><br><i>Shortaselviridae</i>                                              |
|                | <i>Juravirales</i>       | <i>Yangangviridae</i><br><i>Yanlukaviridae</i>                                                                                                 |
|                | <i>Crassvirales</i>      | <i>Crevaviridae</i><br><i>Intestiviridae</i><br><i>Steigviridae</i><br><i>Suoliviridae</i>                                                     |
|                | <i>Grandevirales</i>     | <i>Epsomviridae</i><br><i>Lakviridae</i>                                                                                                       |
|                | <i>Autographivirales</i> | <i>Autonotataviridae</i><br><i>Autoscriptoviridae</i><br><i>Autosignataviridae</i><br><i>Autotranscriptaviridae</i>                            |
|                | <i>Adrikavirales</i>     | <i>Satyavativiridae</i>                                                                                                                        |

*Nota:* Tomado de Turner et al. (2025).

### 1.2.2 Estructura de los bacteriófagos

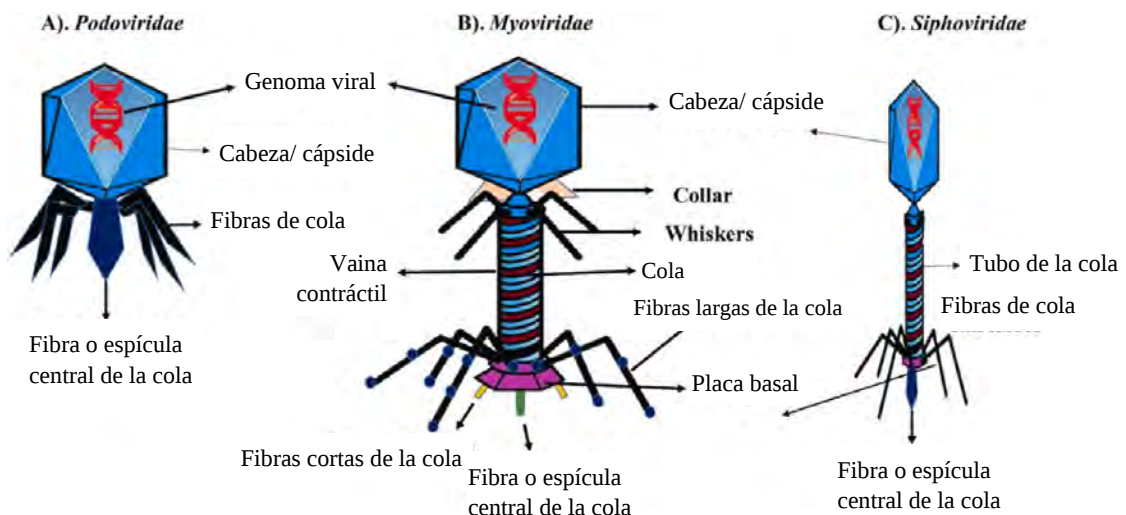
Los bacteriófagos son virus que se caracterizan por tener una vida intracelular obligada y presentar una variedad de formas, tamaños, simetría de cápside y

organización genómica (Kasman & Porter, 2022). Poseen un tamaño que oscila entre 20 a 200 nanómetros de longitud (Padrón, 2023; Rodriguez, 2023) dependiendo de la especie.

El primer clasificador morfológico se dio de acuerdo con el tipo de cola y se dividió en 3 morfotipos como son "podovirus", "myovirus" y "siphovirus" que corresponden a virus con cola corta no contráctil, cola larga contráctil y cola larga no contráctil, respectivamente (Figura 01).

### Figura 01

#### Morfotipos de virus según el tipo de cola



*Nota:* Estructura de los fagos. (A) Podoviridae: presentan una cola corta, carecen de placa base y sus RBP están directamente unidas a la cola. (B) Myoviridae: presentan cola largas y contráctiles, y una placa base. (C) Siphoviridae: presentan cola larga, no contráctil. Tomado y modificado de Hussain et al. (2021).

La estructura de los fagos está definida por una estructura tridimensional: la cabeza de cápside proteica icosaédrica, la cual contiene el genoma de ácido nucleico confinado en su interior; la cola, que actúa como dispositivo de inyección de material genético; y un dispositivo de adsorción distintivo en el extremo de la cola que reconoce el receptor de la célula huésped (Fathima & Archer, 2021; Giri, 2021; Kasman & Porter, 2022).

- A. Podovirus: los viriones tienen la cola corta, no contráctil y sin flexibilidad, la cual mide 20 x 8 nm aproximadamente, con 6 fibras subterminales cortas. Es grueso, tiene forma de varilla y está construido con discos apilados. La cabeza se ensambla primero y secuencialmente las partes de la cola, y se unen al portador mediante la proteína adaptadora (King et al., 2012b), no presentan placa base (Nobrega et al., 2018).
- B. Myovirus: la característica distintiva de esta familia es la cola larga, contráctil y relativamente gruesa (80-455 nm). La cola tubular presenta simetría helicoidal, con un diámetro de 16–20 nm, y está rodeada por una vaina contráctil helicoidal que facilita la perforación de la envoltura bacteriana y la inyección del ADN viral (King et al., 2012a; Nobrega et al., 2018). Esta unido a la cápside por un extremo, y por el otro extremo unido a la placa base; formando un complejo estructural con un collar, tubo central, placa base, 6 fibras largas y 6 pines de cola. Los géneros se diferencian por la organización del genoma, mecanismos de replicación del ADN y empaquetado, y la presencia o ausencia de bases inusuales entre sí (King et al., 2012a).
- C. Siphovirus: sus viriones tienen cápsides icosaédricas, el diámetro es de unos 57-65 x 7-10 nm y constan de 72 capsómeros. Así mismo, presentan colas largas, delgadas, no contráctiles, flexibles y filamentosas, usualmente con 1 fibras terminales corta y 4 subterminales largas. Su cabeza y cola se ensamblan por separado mediante un complejo proteico llamado collar, esto unión sucede cuando ambas partes están formadas correctamente (King et al., 2012c; Nobrega et al., 2018)

### **1.2.3 Ciclo de replicación de los bacteriófagos**

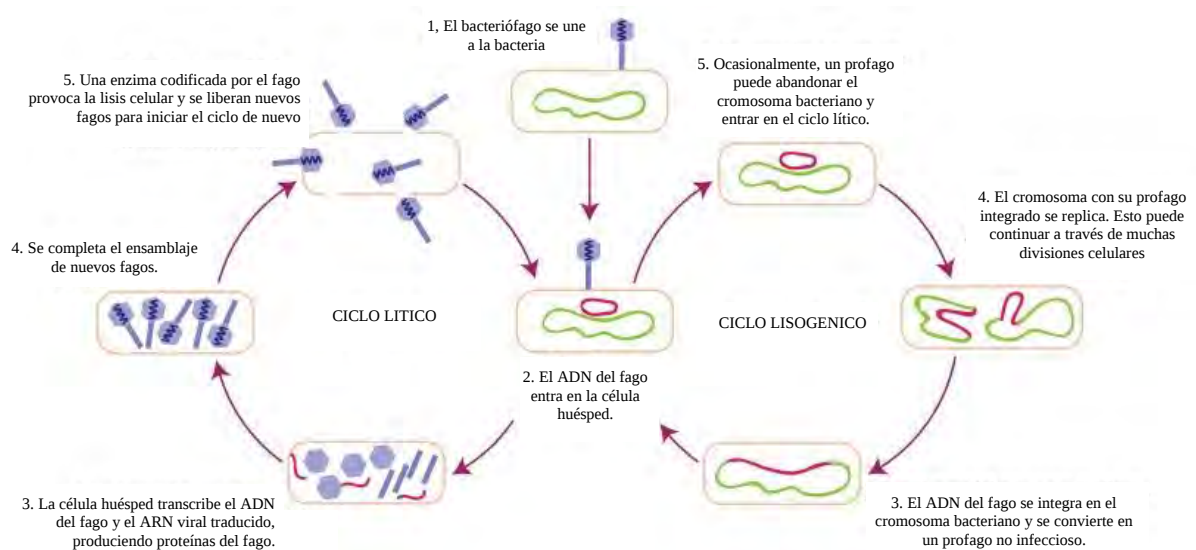
Los fagos, al tener una vida intracelular obligada, dependen por completo de la maquinaria biosintética de energía y las proteínas de las bacterias hospederas para completar su ciclo de replicación (Cuyutupa, 2022). Este ciclo comprende una serie de etapas secuenciales mediante las cuales los virus reconocen, infectan y utilizan

los sistemas metabólicos del hospedador para sintetizar sus componentes y generar nuevas partículas (Harper et al., 2021; Padrón, 2023).

Dependiendo del tipo de fago, el ciclo de replicación viral puede continuar por una de las dos vías principales: el ciclo lítico (virulento) o ciclo lisogénico (templado) (Harper et al., 2021; Padrón, 2023) (Figura 02).

## Figura 02

### *Ciclo de replicación del bacteriófago*



**Nota:** Ciclo lítico y lisogénico para la reproducción del bacteriófago dentro de la célula hospedera. Tomado de Cruz et al. (2013).

#### 1.2.3.1 Ciclo lítico

En el ciclo lítico, el fago sigue una estrategia virulenta, replicándose y ocasionando la lisis celular del hospedero para liberar nuevos viriones. Este proceso consiste en: absorción, penetración, replicación, ensamblaje, lisis y liberación (Padrón, 2023).

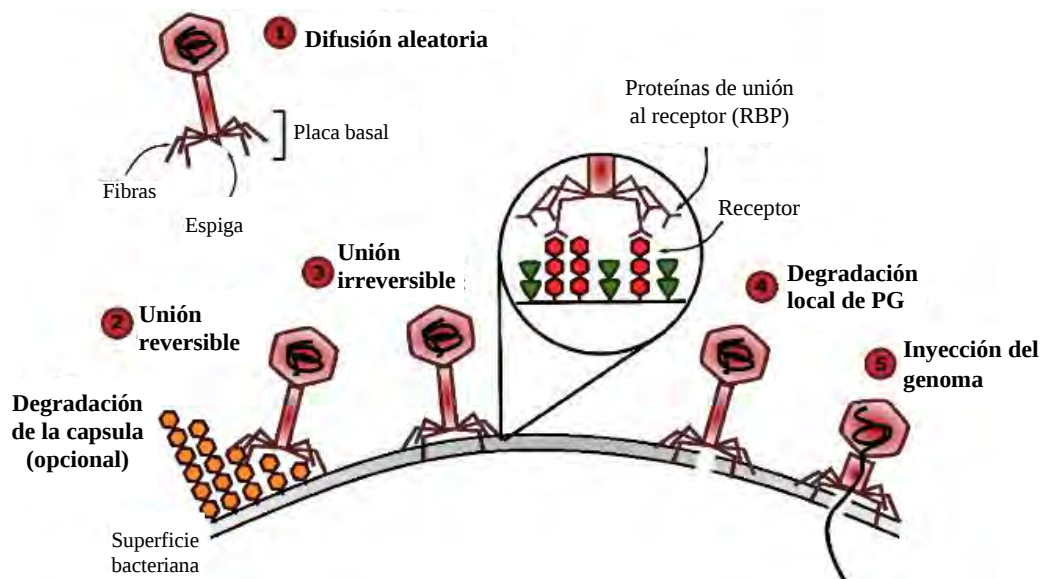
##### A. Adsorción

En este proceso, el fago reconoce y se une a receptores específicos localizados en la superficie de la célula bacteriana. La absorción suele describirse en 3 fases secuenciales.

La primera fase comienza cuando los viriones entran en contacto con la bacteria mediante colisiones aleatorias producto de la difusión y el movimiento browniano en el medio. En la segunda fase, se produce una interacción reversible entre proteínas receptoras de unión (RBP) y los componentes de la superficie celular (es decir, el receptor primario), lo cual permite que los fagos permanezcan cerca de la superficie del huésped para facilitar la búsqueda de un receptor secundario al que finalmente se unen irreversiblemente. Finalmente, se produce la unión irreversible al receptor secundario, consolidando el anclaje e iniciando los eventos que conducirán a la inyección del genoma viral (Harper et al., 2021; Leprince & Mahillon, 2023) (Figura 03).

### Figura 03

*Proceso de adsorción de fagos mediante la interacción de RBP, y eventos que conducen a la inyección del genoma*



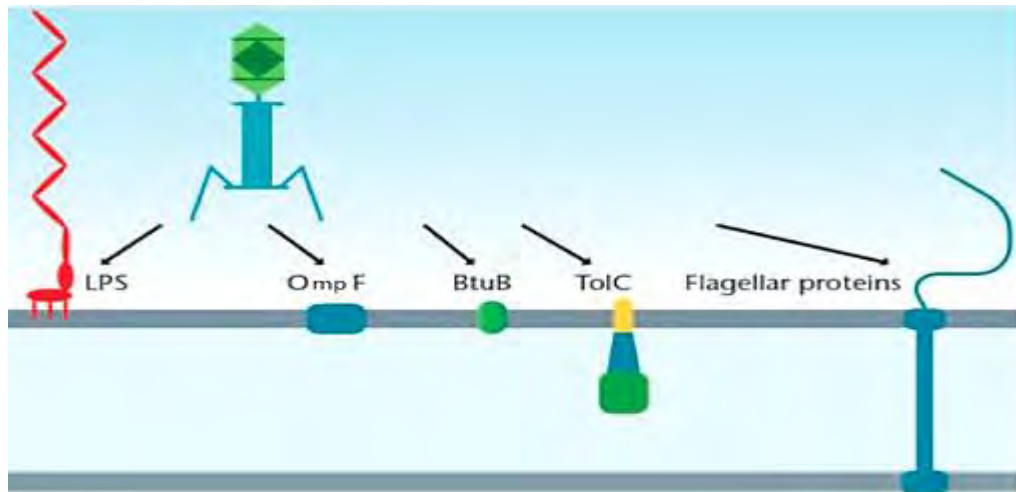
*Nota:* Tomado de Leprince & Mahillon (2023).

Las RBP (proteínas receptoras de unión) se localizan en la punta de la fibra de la cola en fagos con estructura caudal o en el extremo de la cápside en fagos filamentosos. Estas proteínas reconocen componentes específicos de la superficie bacteriana, cuya naturaleza varía según el tipo de bacteria hospedera. En bacterias

Gram-negativas, los receptores pueden incluir lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa como OmpA y OmpC, flagelos o pili; mientras que en bacterias Gram-positivas suelen involucrar ácidos lipoteicoicos u otros polímeros de la pared celular. Estos componentes son esenciales para el anclaje del fago y el inicio del proceso de infección (Giri, 2021; Harper et al., 2021; Leprince & Mahillon, 2023) (Figura 04).

#### Figura 04

*Receptores de la célula Gram- negativa a los que se adhiere un fago con cola*



*Nota:* Tomado de Stone et al. (2019).

#### B. Penetración

Luego de la fijación, el virus atraviesa la pared celular bacteriana e inyecta su material genético en el interior del citoplasma, mientras que las estructuras externas del virus se mantienen en el exterior (Leprince & Mahillon, 2023). Este proceso varía según la morfología del virus, ya que la cola funciona como canal para transferir el ADN hacia el citoplasma (Garcia, 2013).

Los fagos con colas contráctiles, como los Myovirus, realizan la acción mecánica de contracción que les permite hacer agujeros en la membrana externa de la célula y atravesar el periplasma y la membrana interna, para llevar a cabo la eyección del

ADN (Garcia, 2013). Para esto, el tubo externo de la cola se contrae, permitiendo que el tubo interno perfora la pared celular; en la punta del tubo interno se encuentra la proteína gp5, con actividad enzimática, la cual degrada el peptidoglicano de la pared celular y permite el paso del ADN (Garcia, 2013).

En el caso del fago con colas no contráctiles, el mecanismo es más complejo ya que depende de proteínas especializadas ubicadas en los extremos de la cola que funcionan como sensores y canales para la liberación del genoma. Los Siphovirus poseen la proteína pb2 en el interior del tubo caudal. Esta proteína actúa como un sensor molecular que controla la apertura del canal entre la cápside y la cola, lo que permite la eyección del ADN hacia la célula bacteriana (Garcia, 2013). Los Podovirus, debido a la corta longitud de su cola, emplean un mecanismo especializado basado en la expulsión de proteínas internas del virión. Este proceso involucra principalmente 3 proteínas del núcleo: gp14, que se ancla en la membrana externa de la bacteria; gp15 y gp16, asociadas a la membrana interna, estabilizando el canal de eyección. Estas proteínas se despliegan parcialmente para atravesar el canal formado por el conector y la cola, dando origen a una estructura denominada cola extensible. Esta cola actúa como un conducto que conecta la cápside viral con el citoplasma bacteriano y permite la transferencia del ADN (Deng et al., 2017; Garcia, 2013).

### C. Replicación

La replicación tiene por objeto la síntesis de las proteínas necesarias para las nuevas partículas virales y la replicación del nuevo genoma.

Una vez que el material genético del fago ha sido transferido al citoplasma de la célula bacteriana, comienza la fase de replicación y síntesis de componentes

virales. Este proceso ocurre en 3 etapas; temprana, intermedia y tardía (Cuyutupa, 2022; Harper et al., 2021).

Durante la fase temprana, el fago expresa sus genes que bloquean la transcripción y replicación bacteriana, degradan el ADN del hospedador y redirigen los recursos hacia la producción viral (Harper et al., 2021; Kasman & Porter, 2022).

En la fase intermedia, se realiza la replicación activa del ADN viral mediante enzimas codificadas por el fago, como ADN polimerasas, helicasas y primasas. Estas proteínas facilitan la replicación del genoma mediante mecanismos de desplazamiento de cadena o círculo rodante, según la especie viral (Harper et al., 2021; Kasman & Porter, 2022).

En la fase tardía, se sintetizan las proteínas estructurales del virus como: la cápside, cola, fibras caudales; y las enzimas líticas como: holinas y endolisinas, necesarias para la liberación de los nuevos viriones (Kasman & Porter, 2022).

#### D. Ensamblaje y liberación

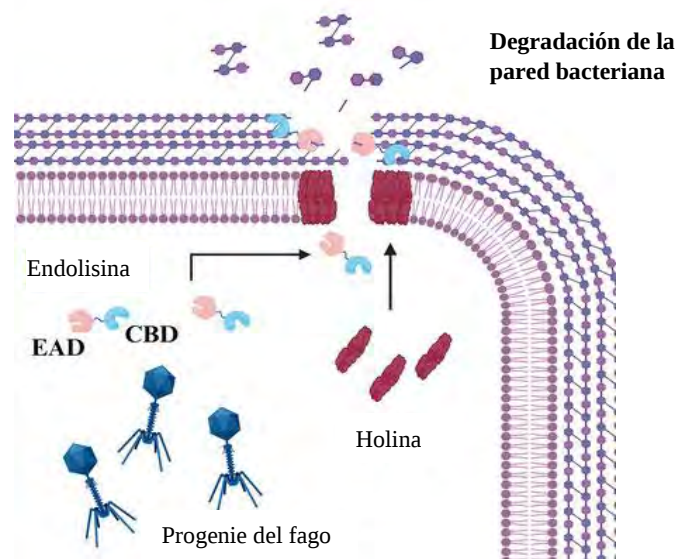
En la fase de ensamblaje, los componentes virales, sintetizados durante la replicación, se organizan para formar viriones completos y funcionales. Primero se forma la procápside, que sirve como contenedor del ADN viral, el cual es empaquetado mediante la acción del complejo terminasa. Luego se ensamblan la cola y las fibras caudales, acoplándose a la cápside llena de ADN (Harper et al., 2021; Kasman & Porter, 2022).

La fase de liberación corresponde al evento final del ciclo lítico y ocurre mediante lisis celular. En este proceso actúan las enzimas líticas, holinas y endolisinas. Las holinas se insertan en la membrana plasmática de la bacteria y forman poros, lo que desencadena la ruptura de la membrana plasmática. Las endolisinas

aprovechan estos canales para acceder al peptidoglicano de la pared celular, degradando esta estructura, lo que provoca la pérdida de integridad de la pared y, finalmente, la ruptura de la célula (Choi et al., 2025) (Figura 05). Como resultado, se liberan numerosos viriones al medio, capaces de infectar nuevas bacterias y continuar el ciclo infeccioso (Giri, 2021; Harper et al., 2021).

**Figura 05**

*Mecanismo de acción de las holinas y endolisinas de bacteriófagos.*



*Nota:* Las endolisinas están compuestas por EAD (dominio enzimático activo), responsable de la ruptura de enlaces en la pared bacteriana, y por CBD (dominio de unión a la pared celular), responsable del reconocimiento y anclaje específicos a la bacteria. Tomado de Choi et al. (2025).

### 1.2.3.2 Ciclo lisogénico

Este ciclo, también denominado infección templada o no virulenta, no mata a la célula hospedera, sino que la utiliza como refugio, donde permanece en latencia. Luego de la inyección del ADN del fago a la célula bacteriana, la secuencia de ácidos nucleicos se integra en el genoma del hospedero, formando el profago (Kasman & Porter, 2022). Durante este proceso, el fago crea una proteína codificada llamada represor, la cual se acopla a una región específica del ADN del fago, llamado operador, inhibiendo la transcripción de la mayoría de los genes del fago, a excepción del gen represor. De

esta manera, el fago se queda integrado en el ADN de la bacteria sin provocar lisis celular (Cruz et al., 2013).

Sin embargo, cuando una bacteria lisogénica se encuentra expuesta a condiciones desfavorables (radiación UV o agentes químicos), se activan las proteasas que degradan la proteína represora. Ocasionando la reactivación del ciclo lítico, permitiendo la expresión de los genes del fago, su multiplicación y la lisis de la célula huésped (Zhang et al., 2022b).

### **1.3 Estabilidad térmica de los bacteriófagos**

La temperatura es considerada un factor esencial para determinar la supervivencia y actividad de los bacteriófagos, ya que compromete la tasa de infección y replicación de estos. La tolerancia de los bacteriófagos a las variaciones de temperatura está relacionada con la morfología y composición estructural (Huang et al., 2025). Para garantizar la estabilidad de los bacteriófagos luego de ser almacenados, se recomienda que estos sean preservados a bajas temperaturas (-80°C); asimismo, que la velocidad de congelación sea rápida, sin etapas intermedias de enfriamiento gradual (Xiao et al., 2022).

### **1.4 Concentración fágica o título fágico**

La concentración fágica o título fágico se define como la cuantificación de bacteriófagos infectivos presentes en una muestra, es decir, aquellas partículas virales capaces de infectar y lisar bacterias hospederas. Este parámetro se expresa en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL). La determinación de la concentración fágica se realiza mediante el ensayo de bicapa (Xiao et al., 2022).

### **1.5 Criopreservación**

La criopreservación es un proceso para preservar células, bacterias, virus, entre otros, donde se detiene la actividad metabólica, evitando el deterioro biológico mediante la

congelación y el almacenamiento a bajas temperaturas (habitualmente de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Sin embargo, durante la congelación pueden producirse daños celulares asociados a cambios físicos y osmóticos que afectan la integridad de la membrana y otros componentes celulares. Durante la congelación, el agua extracelular se cristaliza, lo que incrementa la concentración de solutos en el medio circundante (Chang & Zhao, 2021). Si la velocidad de enfriamiento es lenta, esto genera una gradiente osmótica que provoca la salida de agua desde el interior de la célula hacia el exterior, causando deshidratación celular y daños estructurales. Por otro lado, si la velocidad de enfriamiento es rápida, el agua intracelular no tiene tiempo suficiente para salir de la célula, provocando la formación de cristales de hielo en el interior de la célula que dañan las estructuras internas (Chang & Zhao, 2021). En el caso de los bacteriófagos, la criopreservación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) permite mantener su viabilidad durante periodos prolongados sin pérdida significativa de la concentración fágica (Xiao et al., 2022).

### **1.5.1 Función de los crioprotectores**

La adición de crioprotectores adecuados resulta fundamental, ya que reduce el daño causado por los procesos de congelación-descongelación, manteniendo la integridad funcional y estructural del virus (Chang & Zhao, 2021).

Los crioprotectores se clasifican como penetrantes (osmóticos) y no penetrantes (no osmóticos) según su capacidad para atravesar la membrana celular (Guo et al., 2020).

- a. *Crioprotectores penetrantes u osmóticos*: tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y ejercer su efecto protector desde el interior de la célula. Entre los más utilizados se encuentran el glicerol, Dimetilsulfóxido, metanol, etilenglicol y propilenglicol. Estos compuestos ingresan al interior de la célula,

reemplazan parcialmente el contenido de agua intracelular y aumentan la concentración de solutos en el medio extracelular, lo que genera una gradiente osmótica que provoca la salida controlada del agua intracelular y disminuye la cantidad de agua disponible para congelarse en el interior. Además, a temperaturas bajas, estos crioprotectores aumentan la viscosidad del medio tanto en el interior como en el exterior de la célula, haciendo que las moléculas se muevan lentamente. Debido a esta reducción del movimiento, el agua no puede organizarse en la estructura cristalina hexagonal característica, necesaria para la formación de cristales de hielo. En lugar de ello, el agua queda inmovilizada en un estado desorganizado, formando una estructura amorfa similar al vidrio. Este proceso, llamado vitrificación, evita el daño mecánico ya que no se forman cristales de hielo que dañan la integridad estructural (Chang & Zhao, 2021; Guo et al., 2020; Mohamed et al., 2024).

- Dimetilsulfóxido (DMSO): es una molécula orgánica hidrosoluble y de bajo peso molecular. Debido a su alta capacidad de penetración, actúa directamente sobre la bicapa fosfolipídica, insertándose entre los fosfolípidos, disminuyendo el espesor de la membrana y aumentando la fluidez de la región hidrofóbica. Esta mayor fluidez hace que la membrana sea más flexible y permeable, lo cual facilita el equilibrio osmótico. A concentraciones intermedias, el DMSO induce la formación de poros transitorios, facilitando el paso del agua y del propio DMSO hacia el interior, favoreciendo la deshidratación controlada. A concentraciones elevadas, las moléculas lipídicas de la membrana se desprenden provocando una desintegración de la estructura lipídica (Sahu et al., 2024). Es por ello que, se recomienda que se manipule a concentraciones de 5% y 10%.

- Glicerol: es una molécula compuesta por tres grupos hidroxilo ( $-OH$ ), lo que le permite formar múltiples enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Presenta una capacidad de penetración lenta y no produce modificaciones en la bicapa fosfolipídica. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con el agua, ya que al unirse a ella disminuye la cantidad de agua libre disponible para formar cristales de hielo. Además, aumenta la viscosidad del medio intracelular y extracelular, lo que reduce el movimiento molecular durante el enfriamiento. Como consecuencia, las moléculas no pueden formar la estructura cristalina del hielo, favoreciendo la vitrificación. A bajas concentraciones, existe suficiente agua en estado sólido, y a temperatura baja, estas soluciones se cristalizan. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración de glicerol, el agua disponible disminuye favoreciendo el proceso de vitrificación (Dashnau et al., 2006; Liu et al., 2021). Es por ello que se recomienda emplear glicerol en concentraciones de 20 al 50%.
- b. *Crioprotectores no penetrantes o no osmóticos*: son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación. Entre ellos se encuentran la glucosa, sacarosa, trehalosa polietilenglicol (PEG) e hidroxietilamidón (HES). Estas sustancias no atraviesan la membrana celular, pero se disuelven en el medio acuoso circundante y actúan exclusivamente en el medio extracelular. Su acción se basa en promover la deshidratación celular mediante el aumento de la concentración de solutos en el espacio extracelular. El incremento de solutos intensifica la gradiente osmótica que induce la salida controlada de agua desde el interior de la célula hacia el exterior. Como consecuencia, disminuye la cantidad de agua libre en el interior de la célula, lo

que reduce la formación de hielo intracelular. Esta acción protege la integridad de la membrana plasmática y de las estructuras internas frente a daños mecánicos causados por la formación de hielo (Guo et al., 2020; Mohamed et al., 2024).

## **1.6 Aspectos generales de *Escherichia coli***

*Escherichia* son bacilos Gram negativos, con un tamaño de  $1,1\text{--}1,5 \times 2,0\text{--}6,0 \mu\text{m}$  aproximadamente, son móviles gracias a los flagelos peritricos que presentan. Son anaerobios facultativos, teniendo un metabolismo tanto respiratorio como fermentativo, oxidasa negativa, usualmente no producen  $\text{H}_2\text{S}$ , indol positivo, rojo de metilo positivo, Voges-Proskauer negativo (Saini et al., 2024; Scheutz & Strockbine, 2015), la temperatura óptima de crecimiento oscila entre  $35^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$  (Yang et al., 2020). Asimismo, bajo condiciones óptimas, pueden duplicarse en 20 minutos (Yang et al., 2020).

La mayoría de las cepas de *Escherichia* tienen la capacidad de colonizar y persistir en diferentes nichos tanto en el ambiente como dentro de los huéspedes. En este último, habitan principalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y animales formando parte de la microbiota normal. Sin embargo, algunas cepas evolucionaron y se convirtieron en cepas patógenas, mediante la adquisición de factores de virulencia a través de plásmidos, transposones o islas de patogenicidad, causando diversas enfermedades que varían desde diarrea hasta disentería grave, infecciones del tracto urinario, meningitis y sepsis (Saini et al., 2024).

### 1.6.1 Taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo Pseudomonadati

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacterales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

Fuente: Tomado de Scheutz & Strockbine, 2015.

### 1.6.2 *Escherichia coli* NCTC 13476

Es una cepa de referencia conservada por la National Collection of Type Cultures (NCTC), caracterizada por la producción de la enzima NDM-1 (New Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa-1) (Anexo 14). Esta enzima confiere resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ya que son capaces de hidrolizar una amplia gama de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (Ding et al., 2025).

## 1.7 Aspectos generales del bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia*

El fago *HEc4I* de *Escherichia* es un virus lítico aislado a partir de muestras colectadas en la cuenca del río Huatanay (Cusco, Perú), utilizado como hospedero de *Escherichia coli* NCTC 13476 resistente a carbapenemasas (Acuña & Peceros, 2024).

Mediante la secuenciación genómica de alto rendimiento (Illumina NGS) se obtuvo un genoma de 137.691 nucleótidos. El análisis comparativo de su secuenciación reveló una similitud del 95.2% con la secuencia MZ501048 correspondiente a *Escherichia phage AlexBoehm* del género *Vequintavirus*, clasificada taxonómicamente como:

Dominio: *Duplodnavyria*

Reino: *Heunggongvirae*

Filo: *Uroviricota*

Clase: Caudoviricetes

Orden: No definido

Familia: No definida

Subfamilia: *Vequintavirinae*

Género: *Vequintavirus*

Fuente: Tomado de Acuña & Peceros (2024).

Los bacteriófagos de este género se caracterizan por infectar bacterias del orden Enterobacteriales, estos fagos muestran un amplio espectro lítico frente a cepas de *E. coli*, incluyendo aquellas resistentes a carbapenemasas, consideradas por la OMS como una amenaza crítica de resistencia antimicrobiana (Acuña & Peceros, 2024).

#### **1.7.1 Características fisicoquímicas del fago *HEc4I* de *Escherichia***

Desde el punto físico-químico, el fago *HEc4I* de *Escherichia* es un virus no envuelto que carece de membrana lipídica externa. La multiplicidad óptima de infección se encuentra en un rango de 0,01. En cuanto a la estabilidad térmica, muestra alta estabilidad térmica a 4°C, mientras que a temperaturas intermedias (25-37°C) evidencian disminuciones progresivas de la concentración fágica, determinando que el rango óptimo de estabilidad está por debajo de 60°C. En cuanto a la evaluación de la resistencia al cloroformo, se evidenció una resistencia al 10% de exposición, con una recuperación poblacional de 7.3%. Estos resultados confirman que, al tratarse de virus no envueltos, presentan mayor resistencia al cloroformo, debido a que la estructura de la cápside no presenta envoltura lipídica. Respecto a la

estabilidad frente a variaciones de pH, el fago presenta tolerancia moderada al pH en rangos de 3-11 (Acuña & Peceros, 2024).

### **1.8 Aspectos generales de *Klebsiella pneumoniae***

Las células de *Klebsiella* son bacilos Gram negativos, que presentan un tamaño aproximado de  $0,3\text{--}1,0 \times 0,6\text{--}6,0 \mu\text{m}$ , en su mayoría no son móviles (excepto *K. aerogenes*). Se caracteriza por presentar colonias brillantes, convexas y lisas, con diferentes grados de mucosidad, debido a su cápsula de polisacáridos. Son anaerobios facultativos y presentan un metabolismo caracterizado por la fermentación de glucosa, con producción de ácido y gas, reacción positiva a Voges-Proskauer, oxidasa negativa, catalasa positiva, indol negativo, no producen ornitina descarboxilasa, con crecimiento óptimo entre 35 °C y 37 °C (Ochońska & Brzychczy, 2024; Rahi et al., 2024).

Estos microorganismos se caracterizan por ser patógenos oportunistas, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el entorno natural; asimismo, forman parte de la microbiota normal en humanos y en varios animales (Ding et al., 2025). Actualmente, se ha convertido en una importante amenaza para la salud pública. La alta adaptabilidad de estas bacterias les permite colonizar entornos hospitalarios generando mayor riesgo de contraer neumonía, infecciones de tejidos blandos y heridas quirúrgicas, infecciones del tracto urinario, infecciones del torrente sanguíneo y sepsis (Dong et al., 2022; Ochońska & Brzychczy, 2024).

### 1.8.1 Taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo Pseudomonadati

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacterales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Klebsiella*

Especie: *Klebsiella pneumoniae*

Fuente: Tomado de Ochońska & Brzychczy (2024).

### 1.8.2 *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814

Presenta una alta capacidad de resistencia antimicrobiana debido a la producción de la enzima de carbapenemasa tipo KPC-3 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa-3). Esta enzima permite la hidrólisis de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluidos los carbapenémicos, confiriendo resistencia a múltiples antibióticos como amikacina, fluoroquinolonas, tobramicina y otros  $\beta$ -lactámicos (Anexo 15). Esta característica la clasifica como una cepa multirresistente y la convierte en un modelo importante para estudios de resistencia antimicrobiana y de control de calidad microbiológica (Ding et al., 2025).

## 1.9 Aspectos generales del bacteriófago H33IIK de *Klebsiella*

El bacteriófago H33IIK de *Klebsiella* es un virus aislado a partir de muestras colectadas en la cuenca del río Huatanay (Cusco, Perú), utilizado como hospedero de *Klebsiella pneumoniae*, código ATCC BAA 2814 (Aguilar et al., 2026).

Mediante el análisis filogenético, se clasificó al fago H33IIK dentro del género *Taipeivirus*, el cual evidenció una alta similitud con fagos que infectan especies de *Klebsiella*, lo que permitió su clasificación taxonómica como:

Dominio: *Duplodnavyria*

Reino: *Heunggongvirae*

Filo: *Uroviricota*

Clase: *Caudoviricetes*

Orden: *Pantevenvirales*

Familia: *Ackermannviridae*

Subfamilia: No definida

Género: *Taipeivirus*

Fuente: Tomado de Aguilar et al. (2026).

#### **1.9.1 Características fisicoquímicas del bacteriófago *H33IIK de Klebsiella***

Presento una multiplicidad óptima de infección (MOI) de 0.001, evidenciando una replicación eficiente de las partículas virales. En cuanto a la tolerancia al cloroformo, se evidenció una resistencia al 10% de concentración, con una reducción poblacional del 4%, lo que confirma su resistencia a solventes orgánicos y respalda su naturaleza de virus no envuelto. Respecto a la estabilidad térmica, *H33IIK de Klebsiella* mantuvo su viabilidad a 60°C, mientras que a 70°C se evidenció una inactivación total del fago. En relación con la sensibilidad al pH, el fago *H33IIK de Klebsiella* presenta tolerancia en el rango de 4-10 pH (Aguilar et al., 2026).

### 1.10 Aspectos generales de *Salmonella enterica*

*Salmonella enterica* comprende bacilos Gram- negativo de  $0,7-1,5 \times 2,0-5,0 \mu\text{m}$ , usualmente son móviles gracias a sus flagelos peritricos. Se caracterizan por presentar colonias de 2-4 mm de diámetro. Utilizan citrato como única fuente de carbono, gas producido a partir de la D-glucosa, indol negativo, reduce nitratos a nitritos, lisina y ornitina descarboxilasa positiva, la mayoría de las especies producen sulfuro de hidrógeno, pero algunos serovares no lo producen (Popoff & Le Minor, 2015). La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C (Gonzalez et al., 2025).

Este patógeno intracelular se caracteriza por ser anaerobio facultativo, se distribuye ampliamente en la naturaleza, siendo los humanos y los animales sus principales reservorios, afectando predominantemente el tracto intestinal. Esta bacteria constituye uno de los principales causantes de intoxicaciones alimentarias a nivel mundial. La forma más común de infección en los humanos es a través de agua o alimentos contaminados. La principal fuente de infección está relacionada con la ingestión de alimentos insuficientemente cocinados o sin procesar, incluyendo huevos, aves, productos cárnicos, productos lácteos crudos o sin pasteurizar, frutas y verduras (Gonzalez et al., 2025).

El patrón de susceptibilidad evidenciado para la cepa de *Salmonella enterica*, empleada en el aislamiento del fago H93S de *Salmonella*, sugiere la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas confieren resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y al monobactámico aztreonam.

### 1.10.1 Taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo Pseudomonadati

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Enterobacterales

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Salmonella*

Especie: *Salmonella enterica*

Fuente: Tomado de Ajmera & Shabbir (2025).

### 1.11 Aspectos generales del bacteriófago *H93S de Salmonella*

El bacteriófago *H93S de Salmonella* es un virus aislado a partir de muestras colectadas en la cuenca del río Huatanay (Cusco, Perú), utilizado como hospedero de *Salmonella enterica*.

La caracterización genómica y filogenética para determinar su clasificación se realizó mediante el servidor VIPtree y tBLASTx. El análisis filogenético clasificó al fago *H93S de Salmonella* dentro del género Chivirus, clasificada taxonómicamente como:

Dominio: *Duplodnaviria*

Reino: *Heunggongvirae*

Filo: *Uroviricota*

Clase: *Caudoviricetes*

Orden: No definido

Familia: *Casjensviridae*

Género: *Chivirus*

### **1.11.1 Características fisicoquímicas del bacteriófago H93S de *Salmonella***

Este virus demostró estabilidad fisicoquímica y potencial lítico frente a cepas de *Salmonella spp.* La multiplicidad de infección (MOI) determinada fue de 0.01. En el ensayo de tolerancia al cloroformo, el fago evidenció una alta resistencia ante exposición al 10% del solvente, lo que confirma la ausencia de envoltura lipídica. Respecto a la estabilidad térmica, el fago H93S presentó un rango óptimo de estabilidad por debajo de 60°C. En la prueba de sensibilidad al pH, el fago mostró resistencia en un rango de pH 4-10.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOLOGIA

#### 2.1 Área de procedencia de las muestras

Los bacteriófagos HEc4I de *Escherichia coli*, H33IIK de *Klebsiella pneumoniae* y H92S de *Salmonella enterica*, y las bacterias de *Escherichia coli* NCTC 13476, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814 y *Salmonella enterica*, se encuentran almacenadas en el banco de cepas del Laboratorio Institucional de Investigación en Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicado en el bloque 16.

#### 2.2 Área de procesamiento

La parte experimental del estudio se llevó a cabo en los laboratorios C-223, C-222 y C-225, ubicados en el bloque 16, pertenecientes al Laboratorio Institucional de Investigación en Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

#### 2.3 Materiales

##### 2.3.1 Materiales biológicos

- Bacterias MDR de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*.
  - *Escherichia coli*, NCTC 13476
  - *Klebsiella pneumoniae*, ATCC BAA 2814
  - *Salmonella enterica*

- Bacteriófagos aislados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella enterica*
  - Bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia*.
  - Bacteriófago *H33IIK* de *Klebsiella*.
  - Bacteriófago *H93S* de *Salmonella*.

### 2.3.2 Equipos

- Autoclave (Marca: Greetmed)
- Balanza analítica (Marca: Ohaus)
- Baño isotérmico con agitación (Modelo: BS-21)
- Cabina de bioseguridad (Marca: Telstar)
- Centrifugadora refrigerada (Marca: Heraeus)
- Congelador (Marca: Mabe)
- Destilador de agua (Marca: GLP)
- Espectrofotómetro (Marca: Eppendorf)
- Incubadora (Marca: Memmert Bock)
- Microcentrífuga (Modelo Minispin, Marca: Eppendorf)
- Micropipetas de 10-100µl y 100-1000µl (Marca: Sartorius)
- pHmetro (Marca: Hanna)
- Termohigrómetros (Marca: RadioShack, Modelo: 63-1032)
- Refrigeradora (Marca: Indurama)
- Ultracongeladora (Marca: Fiocchetti)

### 2.3.3 Materiales de vidrio

- Frascos de vidrio con tapa rosca 100ml, 250ml y 500ml
- Pipetas de 10ml

- Placas Petri 100mm x 20mm
- Placas Petri 60mm x 15mm
- Probetas graduadas 100ml y 500ml
- Tubos simples de 10ml

#### **2.3.4 Medios y reactivos**

- Agar bacteriologico (Marca: OXOID)
- Agar Tripticasa de Soja (TSA) (Marca: OXOID)
- Agar Mac Conkey (Marca: Merck)
- Buffer SM (NaCl, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, Tris-HCl [1 M, pH 7,5])
- Caldo Tripticasa de Soja (TSB) (Marca: OXOID)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Marca: Sigma)
- Glicerol (Marca: Sigma)

#### **2.3.5 Otros materiales**

- Alcohol
- Algodón
- Asas de siembra de 1ul
- Cajas de crio-preservación
- Crio viales 2ml
- Filtros de jeringa estériles # 0.22 µm
- Gradillas
- Jeringas de 10 ml
- Mechero Bunsen
- Puntas para micropipetas 10-100µl y 100-1000µl sin filtro
- Tubos de microcentrífuga de 1.5ml

- Tubos de centrífuga de 15 ml y 50 ml
- Guantes quirúrgicos
- Ligas
- Mascarilla
- Papel de aluminio
- Papel kraft

## **2.4 Metodología**

### **2.4.1 Tipo de investigación**

Experimental, con enfoque cuantitativo.

De acuerdo con la resolución N° D-2205-2022-FC-UNSAAC, la presente investigación pertenece al Área de conocimiento de Ciencia de la vida, y la línea de investigación en Virología.

### **2.4.2 Diseño experimental**

El presente estudio de investigación sigue un diseño multifactorial, en el cual se evaluaron diferentes condiciones de almacenamiento, soluciones de distinta composición y diversos bacteriófagos con el objetivo de evaluar su estabilidad durante 135 días de almacenamiento.

#### **I. Soluciones de preservación (Factor A)**

- **A1:** Solución de Caldo Tripticasa de Soja (TSB).
- **A2:** Solución buffer SM.

#### **II. Crioprotectores (Factor B)**

- **B1:** Crioprotector glicerol al 30%
- **B2:** Crioprotector dimetilsulfóxido al 10%

III. Temperatura de preservación (Factor C)

- **C1:** temperatura ambiente
- **C2:** temperatura de 4°C
- **C3:** temperatura de -20°C
- **C4:** temperatura de -80°C

IV. Tiempo de preservación (Factor D)

- **D1:** 0 días
- **D2:** 15 días
- **D3:** 30 días
- **D4:** 45 días
- **D5:** 60 días
- **D6:** 75 días
- **D7:** 90 días
- **D8:** 105 días
- **D9:** 120 días
- **D10:** 135 días

**Tratamientos:**

2 (soluciones) x 2 (crioprotectores) x 4 (temperaturas) x 10 (tiempos) = 160

combinaciones por bacteriófago

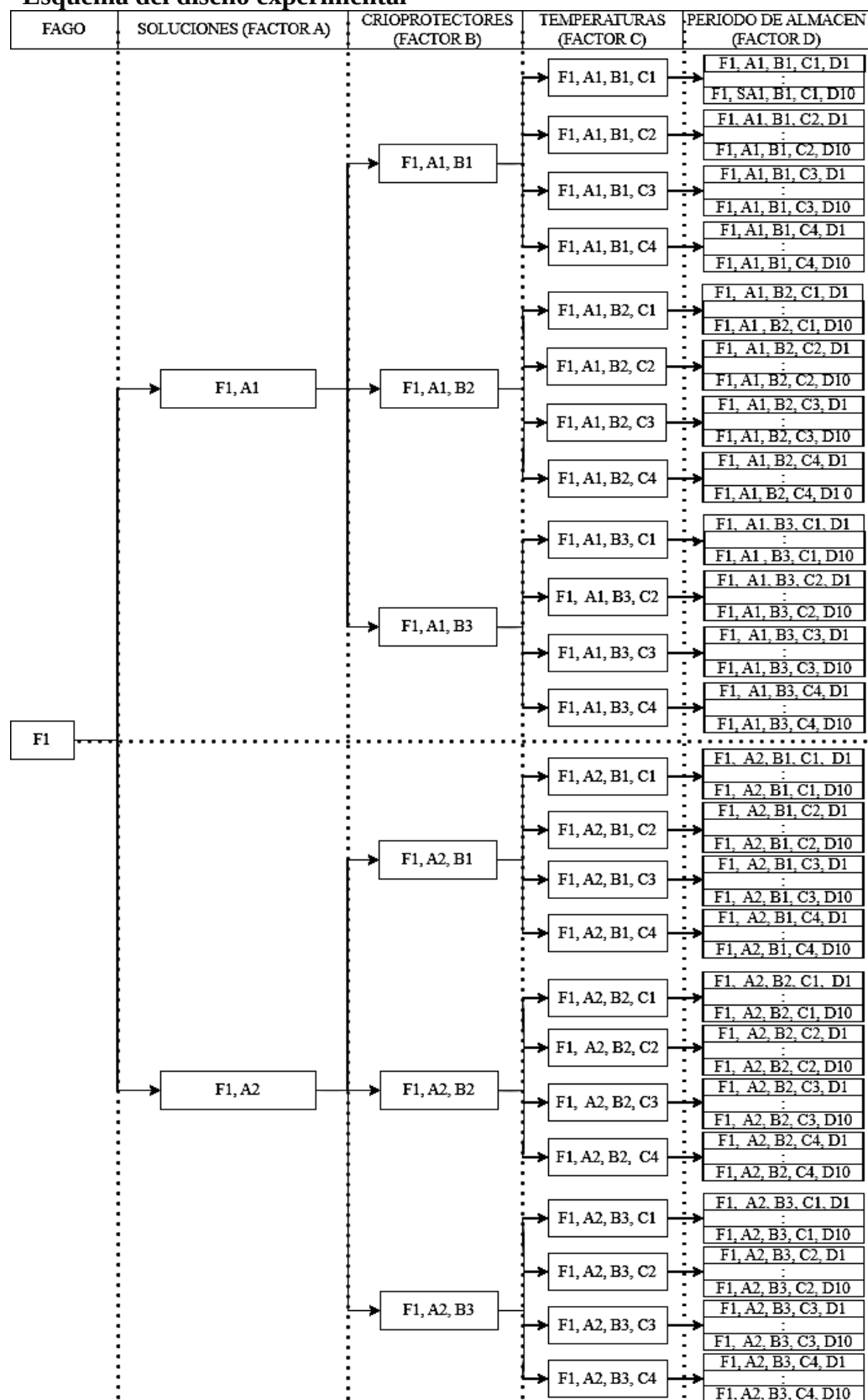
**Repeticiones:**

Para cada combinación se realizaron 3 repeticiones, por ende, se realizaron 480 unidades experimentales por dilución.

**Factor de respuesta:**

Concentración fágica de los bacteriófagos HEc4I, H33IIK y H93S.

### 2.4.3 Esquema del diseño experimental



Nota: A1: Solución de Caldo Tripticasa de Soja (TSB); A2: Solución buffer SM; B1: Crioprotector glicerol al 30%; B2: Crioprotector dimetilsulfóxido al 10%; C1: temperatura ambiente; C2: temperatura de 4°C; C3: temperatura de -20°C; C4: temperatura de -80°C; D1- D10: tiempo de preservación.

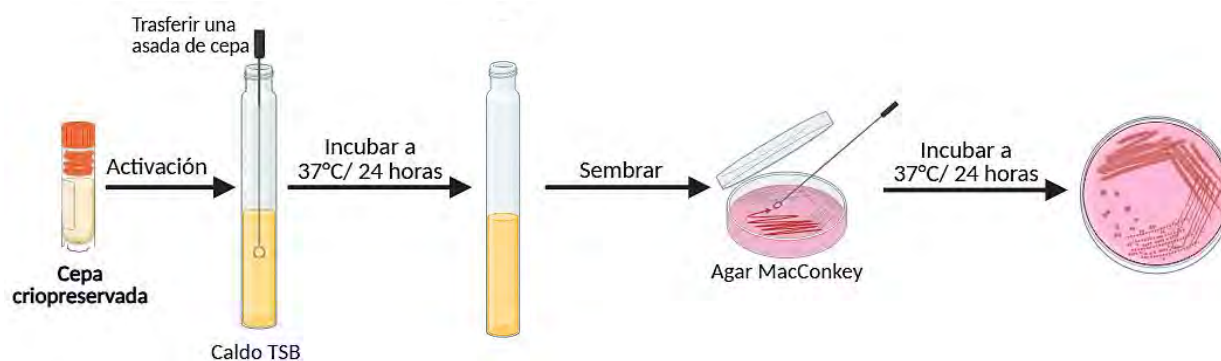
## 2.5 Métodos

### 2.5.1 Reactivación de cepas hospederas de *Escherichia coli* NCTC 13476, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814 y *Salmonella enterica*.

Las cepas de *Escherichia coli* NCTC 13476, de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814 y *Salmonella enterica* fueron obtenidas del banco de cepas del Laboratorio Institucional de investigación en Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Estas cepas fueron reactivadas en 10 ml de Caldo TSB e incubadas a 37° C durante 24 horas. Posteriormente, fueron sembradas individualmente por el método de agotamiento de superficie en el medio de cultivo MacConkey y se incubaron a 37°C durante 24 horas (Aguilar et al., 2026) (Figura 06).

**Figura 06**

*Esquema de reactivación de cepas criopreservadas*



### 2.5.2 Amplificación de fagos

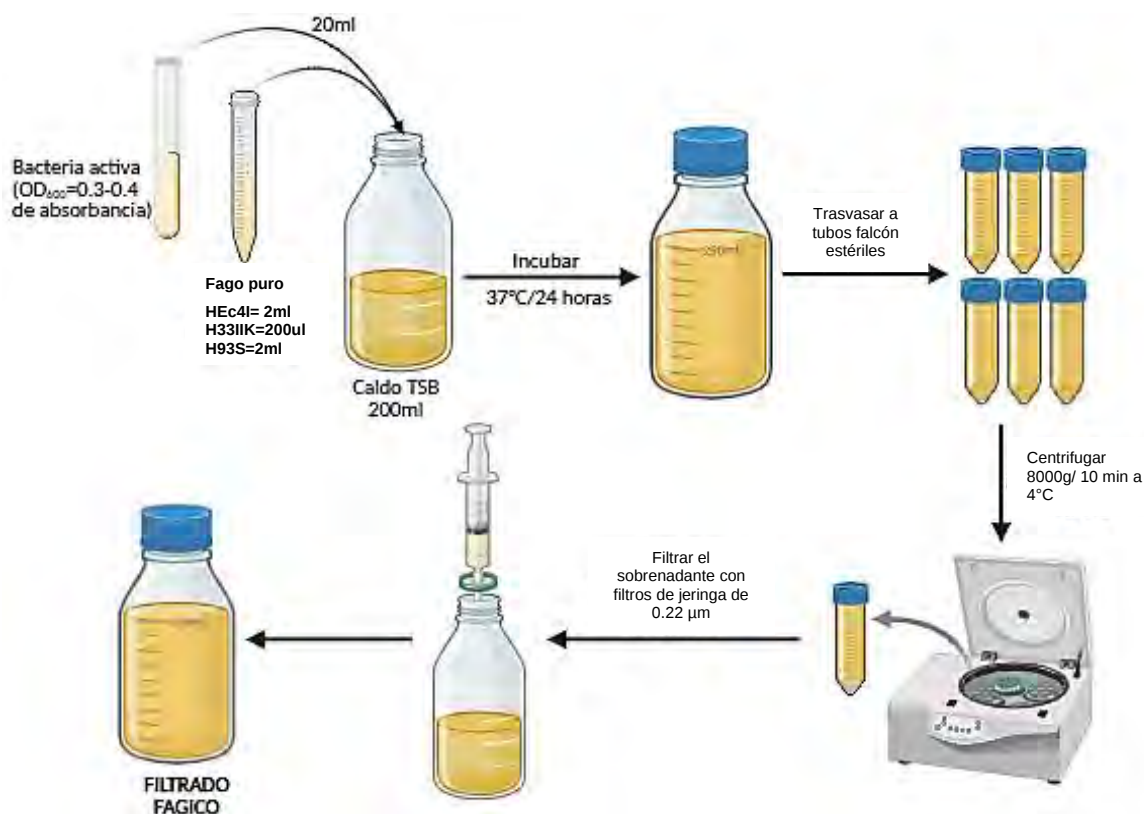
Para esta investigación, se emplearon los bacteriófagos HE4cI de *Escherichia*, H33IIK de *Klebsiella* y H93S de *Salmonella*, aislados y caracterizados en estudios anteriores (Acuña & Peceros, 2024; Aguilar et al., 2026); los cuales se encuentran almacenados en el banco de cepas del Laboratorio Institucional de investigación en Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* NCTC 13476, de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814 y *Salmonella enterica*, se activaron de forma rutinaria en Caldo Tripticasa de Soja (TSB) mediante la inoculación de 1 colonia, empleando asas de 1µl, del cultivo en placa correspondiente y se incubaron a 37°C hasta obtener un OD<sub>600</sub>= 0.3 a 0.4 de absorbancia (Xu et al., 2023).

Para la propagación y amplificación de los fagos, se empleó la metodología de Selcuk et al., (2024) y Xu et al. (2023). El objetivo de esto fue aumentar el número de bacteriófagos en el filtrado fágico de trabajo. En 200ml de Caldo TSB, se inoculó 20ml de la cepa bacteriana activa OD<sub>600</sub>= 0.3 a 0.4 de absorbancia, y su respectivo bacteriófago huésped a una multiplicidad óptima (MOI) de 0.01 para HEc4I, 0.001 para H33IIK y 0.01 para H93S, de forma independiente; estos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se trasvasó a tubos falcón estériles y se centrifugó por 8000 g a 4°C durante 10 minutos; usando filtros de jeringa con una porosidad de 0.22µm, se filtró el sobrenadante a un frasco estéril con el fin de eliminar restos bacterianos suspendidos (Figura 07).

**Figura 07**

*Esquema de amplificación de bacteriófagos*



### 2.5.3 Determinación de la concentración fágica por el ensayo de bicapa

Para determinar la concentración fágica se utilizó el ensayo de bicapa planteado por Gao et al. (2020) y Xiao et al. (2022). Se realizaron diluciones seriadas del filtrado fágico con una proporción de 1:10, para ello se mezcló 100µl del filtrado fágico en 900µl de buffer SM hasta la dilución  $10^{-7}$ . Luego, se transfirió 100µl a tubos estériles y se agregó 500µl de bacteria en fase logarítmica con  $OD_{600}= 0.3$  a  $0.4$  de absorbancia.

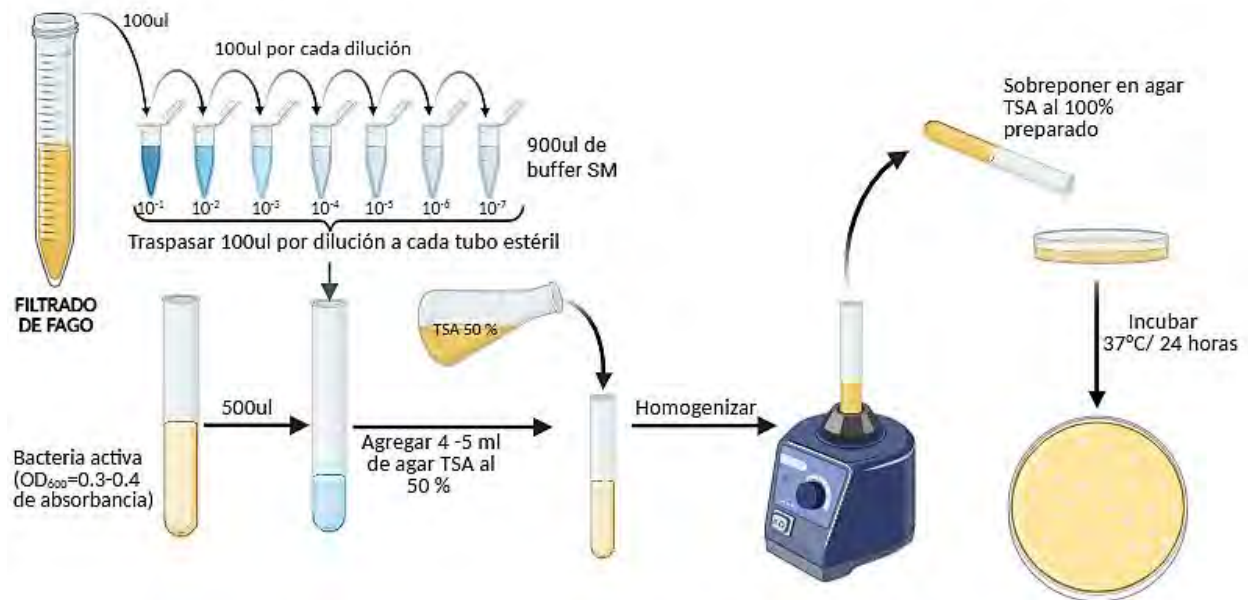
Finalmente, se añadió 4-5 ml de agar TSA (diluido al 50%) a temperatura de  $44^{\circ}$ - $46^{\circ}\text{C}$  al tubo estéril que contenía el fago y la bacteria, se homogenizó con ayuda del vortex y se sobrepuso en placas de agar TSA 100% previamente preparadas, estas placas se llevaron a incubación por  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas (Figura 08).

El título de fagos se calculó multiplicando el número de placas lisadas por la inversa del inóculo por la inversa de la dilución en la cual se contaron las placas de lisis, y se expresó en Unidades Formadoras de Placa por mililitro (UFP/mL) (Xu et al., 2023). Cada experimento se realizó por triplicado (Xu et al., 2023).

$$\frac{UFP}{ml} = N^{\circ} \text{ placas lisadas} \times \text{inversa del inóculo} \times \text{inversa de la dilución}$$

**Figura 08**

*Esquema del ensayo de bicapa para la determinación de la concentración fágica.*



#### 2.5.4 Preparación de las muestras en soluciones de preservación en ausencia y presencia del crioprotector térmico

Para la preservación de bacteriófagos se utilizó la metodología de Xiao et al. (2022) y Xu et al. (2023), donde se evaluaron 2 soluciones de almacenamiento (Caldo TSB y buffer SM) junto a dos crioprotectores (glicerol al 30% y DMSO al 10%) independientemente, los cuales permitieron evaluar su influencia en la estabilidad fágica durante la preservación.

Para la preparación de la muestra de almacenamiento, se mezcló el filtrado fágico con la solución de suspensión en una proporción de 1:1, teniendo como volumen final 1.5ml. Para las muestras almacenadas sin crioprotectores, se mezcló 750µl del filtrado fágico y 750µl de la solución de suspensión.

Para las muestras almacenadas con glicerol al 30%, se preparó la solución de almacenamiento con glicerol al 60%, este se llevó a esterilización por 15 minutos a 121°C. Posteriormente, se mezcló 750µl del filtrado fágico y 750µl de la solución de suspensión con glicerol, obteniendo un volumen final de 1.5ml, con glicerol a una concentración de 30%.

Para las muestras almacenadas con DMSO al 10%, se preparó la solución de almacenamiento con DMSO al 20%, este se llevó a esterilización por 15 minutos a 121°C. Luego, se mezclaron 750µl del filtrado fágico y 750µl de la solución de suspensión con DMSO, obteniendo un volumen final de 1.5ml con una concentración de 10%.

#### **2.5.5 Condiciones de preservación y evaluación de la viabilidad**

Las muestras preparadas en las diferentes soluciones y crioprotectores fueron almacenadas a diferentes temperaturas: temperatura ambiente, 4°C, -20°C y -80°C.

Las muestras almacenadas a temperatura ambiente y 4°C se mantuvieron en un lugar estable protegido de la exposición a luz directa, para ello se colocaron dentro de una caja térmica. Las muestras almacenadas a -20°C se colocaron directamente en un congelador, sin realizar cambios de temperatura que podrían afectar la viabilidad de los bacteriófagos. Las muestras almacenadas a -80°C se colocaron directamente en el ultra congelador de -80°C.

La estabilidad de los bacteriófagos almacenados en Caldo TSB y buffer SM combinados independientemente con glicerol al 30% y DMSO al 10% fue evaluada

cada 15 días durante un periodo de 135 días, mediante el ensayo de bicapa previamente descrito.

#### **2.5.6 Controles de estabilidad de las muestras almacenadas en las diferentes condiciones de preservación**

Para realizar los controles periódicos y cuantificar la infectividad de los fagos, las muestras se retiraron directamente de sus respectivas condiciones de almacenamiento. Las muestras almacenadas a temperatura ambiente y 4°C se procesaron inmediatamente, realizando diluciones seriadas, de las cuales se seleccionaron las cinco últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) para efectuar el ensayo de bicapa. Por otro lado, las muestras almacenadas a -20°C y -80°C fueron previamente atemperadas en un baño maría a 37°C durante 8 a 10 minutos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas, seleccionando las cuatro últimas diluciones ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) para efectuar el ensayo de bicapa (Xiao et al., 2022). Finalmente, la estabilidad del bacteriófago se evaluó mediante el recuento de calvas en UFP/mL, mediante el ensayo de bicapa previamente descrito.

#### **2.5.7 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron procesados inicialmente en el software Microsoft Excel. Además, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples con una significancia de 0.05.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Estabilidad del bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* en *Escherichia coli* NCTC 13476

La cepa de *Escherichia coli* NCTC 13476, permitió evaluar la estabilidad del bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia*, el cual fue almacenado a una concentración inicial de  $3.10 \times 10^9$  UFP/mL, analizando sus variaciones bajo las condiciones de preservación evaluadas (Tabla 02).

**Tabla 02**

*Estabilidad del bacteriófago HEc4I de Escherichia, en Escherichia coli NCTC 13476, evaluado bajo diferentes condiciones de preservación.*

| T°      | SOLUCIONES     | TIEMPO (DIAS)        |                      |                      |                      |                      |                      |                       |                       |                      |                      | TASA DE RECUPERACIÓN AL DÍA 135 (%) |
|---------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------|
|         |                | 0                    | 15                   | 30                   | 45                   | 60                   | 75                   | 90                    | 105                   | 120                  | 135                  |                                     |
| TA      | TSB            | 3.10×10 <sup>9</sup> | 3.06×10 <sup>8</sup> | 2.52×10 <sup>8</sup> | 1.64×10 <sup>8</sup> | 1.54×10 <sup>8</sup> | 1.45×10 <sup>8</sup> | 1.37×10 <sup>8</sup>  | 1.26 ×10 <sup>8</sup> | 7.57×10 <sup>7</sup> | 5.80×10 <sup>7</sup> | 81.79%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.33×10 <sup>6</sup> | 1.96×10 <sup>5</sup> | 2.26×10 <sup>4</sup> | 2.23×10 <sup>2</sup> | 1.00×10              | 0.00                  | 0.00                  | 0.00                 | 0.00                 | 0.00%                               |
|         | TSB Y DMSO     | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.75×10 <sup>8</sup> | 2.28×10 <sup>8</sup> | 2.13×10 <sup>8</sup> | 1.76×10 <sup>8</sup> | 1.39×10 <sup>8</sup> | 1.19×10 <sup>8</sup>  | 1.11×10 <sup>8</sup>  | 7.83×10 <sup>7</sup> | 6.70×10 <sup>7</sup> | 82.45%                              |
|         | SM             | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.61×10 <sup>9</sup> | 3.57×10 <sup>8</sup> | 3.53×10 <sup>8</sup> | 3.27×10 <sup>8</sup> | 3.17×10 <sup>8</sup> | 3.13×10 <sup>8</sup>  | 3.07×10 <sup>8</sup>  | 1.45×10 <sup>8</sup> | 1.33×10 <sup>7</sup> | 75.07%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.96×10 <sup>9</sup> | 8.43×10 <sup>8</sup> | 4.23×10 <sup>6</sup> | 6.03×10 <sup>5</sup> | 1.59×10 <sup>4</sup> | 1.64×10 <sup>3</sup>  | 4.20×10 <sup>2</sup>  | 3.33                 | 0.00                 | 0.00%                               |
|         | SM Y DMSO      | 3.10×10 <sup>9</sup> | 3.20×10 <sup>8</sup> | 2.68×10 <sup>8</sup> | 2.45×10 <sup>8</sup> | 2.40×10 <sup>8</sup> | 2.36×10 <sup>8</sup> | 2.23×10 <sup>8</sup>  | 2.09×10 <sup>8</sup>  | 1.34×10 <sup>8</sup> | 3.20×10 <sup>7</sup> | 79.07%                              |
| 4°C     | TSB            | 3.10×10 <sup>9</sup> | 3.77×10 <sup>8</sup> | 2.83×10 <sup>8</sup> | 2.73×10 <sup>8</sup> | 2.45×10 <sup>8</sup> | 2.43×10 <sup>8</sup> | 2.39×10 <sup>8</sup>  | 2.26×10 <sup>8</sup>  | 1.71×10 <sup>8</sup> | 1.65×10 <sup>8</sup> | 86.58%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 3.10×10 <sup>9</sup> | 3.55×10 <sup>5</sup> | 8.67×10 <sup>4</sup> | 1.07×10 <sup>4</sup> | 2.28×10 <sup>3</sup> | 1.47×10 <sup>3</sup> | 1.27×10 <sup>2</sup>  | 2.33×10               | 0.00                 | 0.00                 | 0.00%                               |
|         | TSB Y DMSO     | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.90×10 <sup>9</sup> | 1.91×10 <sup>9</sup> | 2.60×10 <sup>8</sup> | 1.58×10 <sup>8</sup> | 1.54×10 <sup>8</sup> | 2.14×10 <sup>8</sup>  | 2.50×10 <sup>8</sup>  | 1.29×10 <sup>8</sup> | 2.40×10 <sup>7</sup> | 77.76%                              |
|         | SM             | 3.10×10 <sup>9</sup> | 5.80×10 <sup>8</sup> | 4.73×10 <sup>8</sup> | 4.37×10 <sup>8</sup> | 3.57×10 <sup>8</sup> | 3.50×10 <sup>8</sup> | 3.40×10 <sup>8</sup>  | 3.33×10 <sup>8</sup>  | 3.30×10 <sup>8</sup> | 2.97×10 <sup>8</sup> | 89.26%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.73×10 <sup>8</sup> | 2.29×10 <sup>8</sup> | 1.93×10 <sup>8</sup> | 1.87×10 <sup>8</sup> | 1.84×10 <sup>8</sup> | 1.79×10 <sup>8</sup>  | 1.66×10 <sup>8</sup>  | 1.40×10 <sup>8</sup> | 1.29×10 <sup>8</sup> | 85.44%                              |
|         | SM Y DMSO      | 3.10×10 <sup>9</sup> | 3.43×10 <sup>8</sup> | 3.37×10 <sup>8</sup> | 3.23×10 <sup>8</sup> | 3.17×10 <sup>8</sup> | 2.97×10 <sup>8</sup> | 2.47×10 <sup>8</sup>  | 3.34×10 <sup>8</sup>  | 2.38×10 <sup>8</sup> | 2.34×10 <sup>8</sup> | 88.17%                              |
| - 20° C | TSB            | 3.10×10 <sup>9</sup> | 3.23×10 <sup>8</sup> | 2.93×10 <sup>8</sup> | 3.01×10 <sup>8</sup> | 2.60×10 <sup>8</sup> | 2.56×10 <sup>8</sup> | 2.41 ×10 <sup>8</sup> | 2.35×10 <sup>8</sup>  | 1.61×10 <sup>8</sup> | 1.57×10 <sup>8</sup> | 86.35%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.23×10 <sup>8</sup> | 1.93×10 <sup>8</sup> | 1.64×10 <sup>8</sup> | 9.50×10 <sup>7</sup> | 8.17×10 <sup>7</sup> | 7.97 ×10 <sup>7</sup> | 6.07×10 <sup>7</sup>  | 4.17×10 <sup>7</sup> | 3.80×10 <sup>7</sup> | 79.86%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.10×10 <sup>8</sup> | 1.39×10 <sup>8</sup> | 1.32×10 <sup>8</sup> | 1.03×10 <sup>8</sup> | 8.67×10 <sup>7</sup> | 7.90 ×10 <sup>7</sup> | 5.10×10 <sup>7</sup>  | 3.77×10 <sup>7</sup> | 2.70×10 <sup>7</sup> | 78.30%                              |
|         | SM             | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.83×10 <sup>8</sup> | 2.64×10 <sup>8</sup> | 2.38×10 <sup>8</sup> | 2.20×10 <sup>8</sup> | 2.15×10 <sup>8</sup> | 2.06 ×10 <sup>8</sup> | 1.93×10 <sup>8</sup>  | 1.31×10 <sup>8</sup> | 4.10×10 <sup>7</sup> | 80.21%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 3.10×10 <sup>9</sup> | 2.83×10 <sup>8</sup> | 1.90×10 <sup>8</sup> | 1.81×10 <sup>8</sup> | 1.71×10 <sup>8</sup> | 1.62×10 <sup>8</sup> | 1.51 ×10 <sup>8</sup> | 1.43×10 <sup>8</sup>  | 1.12×10 <sup>8</sup> | 1.11×10 <sup>8</sup> | 84.63%                              |
|         | SM Y DMSO      | 3.10×10 <sup>9</sup> | 3.97×10 <sup>8</sup> | 2.82×10 <sup>8</sup> | 1.65×10 <sup>8</sup> | 1.02×10 <sup>8</sup> | 9.50×10 <sup>7</sup> | 8.93 ×10 <sup>7</sup> | 5.40×10 <sup>7</sup>  | 3.97×10 <sup>7</sup> | 2.93×10 <sup>7</sup> | 78.68%                              |
| - 80° C | TSB            | 3.10×10 <sup>9</sup> | 5.37×10 <sup>8</sup> | 4.60×10 <sup>8</sup> | 3.57×10 <sup>8</sup> | 3.17×10 <sup>8</sup> | 2.94×10 <sup>8</sup> | 2.89 ×10 <sup>8</sup> | 2.80×10 <sup>8</sup>  | 2.22×10 <sup>8</sup> | 2.14×10 <sup>8</sup> | 87.77%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 3.10×10 <sup>9</sup> | 4.80×10 <sup>8</sup> | 3.93×10 <sup>8</sup> | 3.47×10 <sup>8</sup> | 3.27×10 <sup>8</sup> | 2.45×10 <sup>8</sup> | 2.27 ×10 <sup>8</sup> | 2.14×10 <sup>8</sup>  | 2.12×10 <sup>8</sup> | 1.71×10 <sup>8</sup> | 86.74%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 3.10×10 <sup>9</sup> | 6.23×10 <sup>8</sup> | 5.20×10 <sup>8</sup> | 4.70×10 <sup>8</sup> | 4.53×10 <sup>8</sup> | 4.37×10 <sup>8</sup> | 3.37 ×10 <sup>8</sup> | 2.60×10 <sup>8</sup>  | 2.32×10 <sup>8</sup> | 2.26×10 <sup>8</sup> | 88.01%                              |
|         | SM             | 3.10×10 <sup>9</sup> | 6.27×10 <sup>8</sup> | 5.60×10 <sup>8</sup> | 4.80×10 <sup>8</sup> | 4.20×10 <sup>8</sup> | 3.93×10 <sup>8</sup> | 3.57 ×10 <sup>8</sup> | 2.50×10 <sup>8</sup>  | 1.98×10 <sup>8</sup> | 1.73×10 <sup>8</sup> | 86.80%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 3.10×10 <sup>9</sup> | 4.73×10 <sup>8</sup> | 4.20×10 <sup>8</sup> | 3.27×10 <sup>8</sup> | 2.78×10 <sup>8</sup> | 2.58×10 <sup>8</sup> | 2.52×10 <sup>8</sup>  | 2.30×10 <sup>8</sup>  | 2.19×10 <sup>8</sup> | 2.12×10 <sup>8</sup> | 87.73%                              |
|         | SM Y DMSO      | 3.10×10 <sup>9</sup> | 4.67×10 <sup>8</sup> | 3.73×10 <sup>8</sup> | 2.86×10 <sup>8</sup> | 2.80×10 <sup>8</sup> | 2.77×10 <sup>8</sup> | 2.70×10 <sup>8</sup>  | 2.59×10 <sup>8</sup>  | 2.45×10 <sup>8</sup> | 2.41×10 <sup>8</sup> | 88.31%                              |

*Nota:* TA: temperatura ambiente; TSB: Caldo Tripticasa de Soja; SM: buffer SM; DMSO: dimetilsulfóxido.

\*Se realizó las evaluaciones por triplicado, el resultado se expresó en promedio.

\*Los valores obtenidos se expresan en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

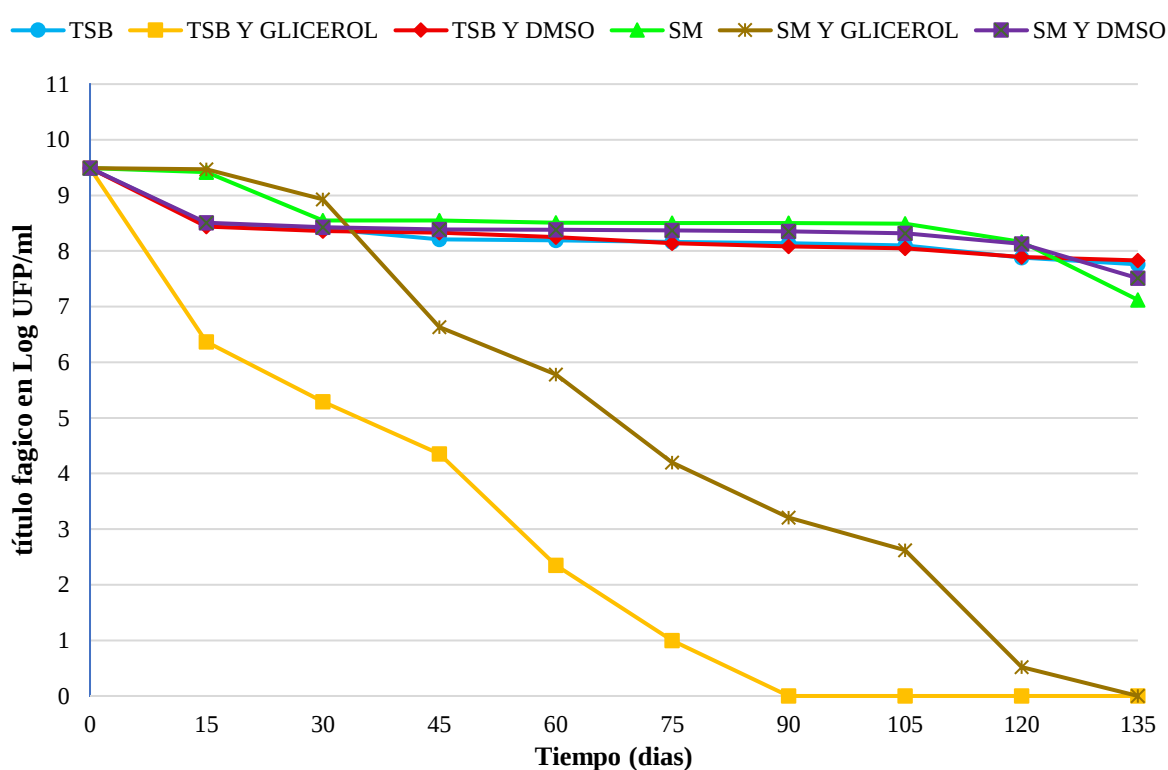
A temperatura ambiente, se observó una drástica reducción de la concentración fágica en la mayoría de las condiciones.

Este comportamiento coincide con lo reportado por Bagińska et al. (2024); Cieřlik et al. (2022) y Alvi et al. (2018), quienes evidenciaron que el aumento de la temperatura de almacenamiento ocasiona reducciones de la concentración fágica, asociadas a la desnaturalización irreversible de las proteínas de la cápside y la degradación del ADN viral. En Caldo TSB sin crioprotector, se evidenció una concentración final de  $5.80 \times 10^7$  UFP/mL en 135 días (tasa de recuperación de 81.8%), siendo aparentemente mejor que el buffer SM, el cual obtuvo una concentración final de  $1.33 \times 10^7$  UFP/mL a los 135 días (tasa de recuperación de 75%). Este comportamiento sugiere que el Caldo TSB ofrece una protección parcial mayor que el buffer SM. Esta protección se atribuye a la presencia de proteínas (peptonas) y otros compuestos orgánicos del medio, que ejercen una acción estabilizante sobre las proteínas virales, reduciendo la desnaturalización de la cápside. En cuanto a los crioprotectores, el DMSO al 10% demostró un efecto protector significativo en la estabilidad del bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia*, con concentraciones finales de  $6.70 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB (82.5% de recuperación) y  $3.20 \times 10^7$  UFP/mL en buffer SM (79.1% de recuperación). Por otro lado, en el glicerol al 30% se evidenció una drástica reducción de la concentración fágica durante los primeros 15 días de almacenamiento en el Caldo TSB ( $2.33 \times 10^6$  UFP/mL) e inactivación total a los 75 días, mientras que en buffer SM se evidenció una marcada reducción fágica a partir del día 45 ( $4.23 \times 10^6$  UFP/mL) e inactivación total a los 120 días. Esto sugiere que el glicerol, fuera del contexto de congelación, puede ofrecer un estrés osmótico que acelera la deshidratación estructural del virión. Según Huang et al. (2025) y González et al. (2018), la deshidratación estructural compromete la integridad de las colas complejas de los morfotipos Myovirus, lo que en el fago *HEc4I* de *Escherichia* reveló ser un factor

crítico de inactivación. Este fenómeno coincide con lo reportado por Selcuk et al. (2024), quienes asocian la reducción fágica a la alta viscosidad de la solución y la limitada capacidad de penetración del crioprotector en la partícula fágica, lo que reduce su eficacia frente a los procesos de desnaturalización térmica (Figura 09). Asimismo, Xiao et al. (2022) y Xu et al. (2023) coinciden en que la eficacia del glicerol depende en gran medida de la temperatura, resultando ineficaz o incluso perjudicial fuera de condiciones de congelación.

**Figura 09**

*Curva de estabilidad del bacteriófago HEc4I de Escherichia, en Escherichia coli NCTC 13476, a temperatura ambiente*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 04.

En condiciones de refrigeración (4°C), se evidenció una ligera mejora en la estabilidad del bacteriófago HEc4I de Escherichia a los 135 días de evaluación. La disminución fue

notablemente menor en comparación con la temperatura ambiente, evidenciando que la reducción de la temperatura limita los procesos de desnaturalización estructural.

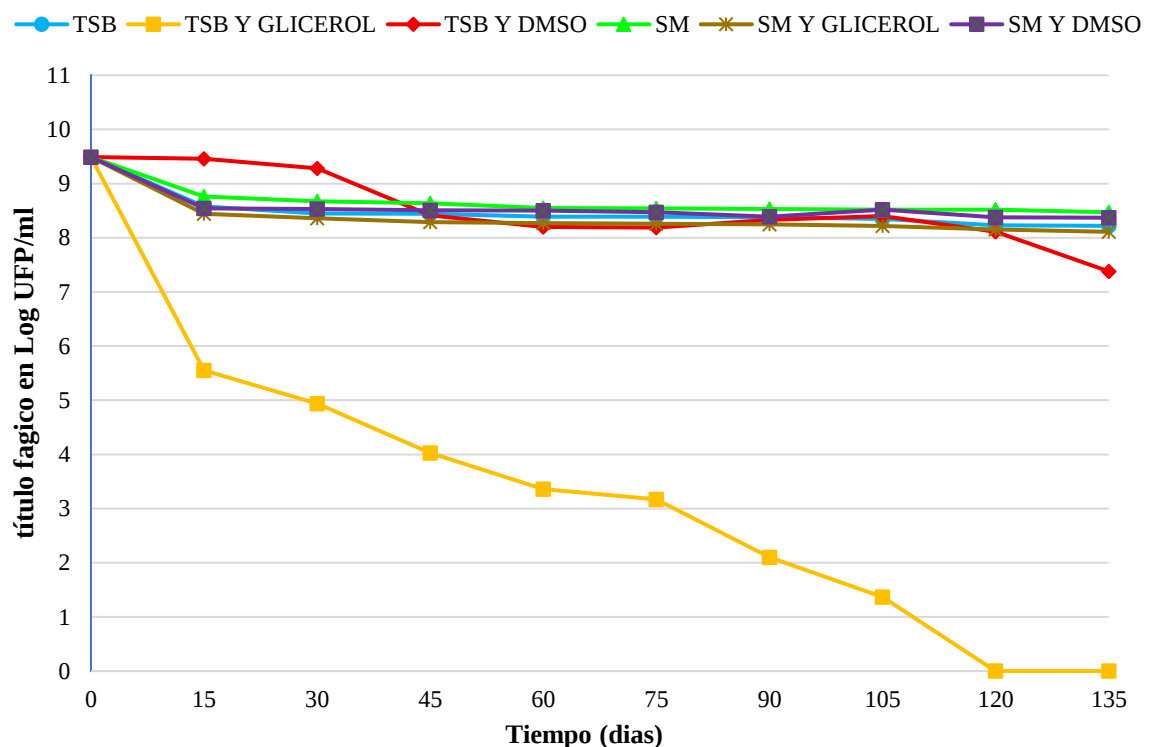
En cuanto a las soluciones de suspensión, el Caldo TSB evidenció una disminución gradual de  $1.65 \times 10^8$  UFP/mL (86.6% de recuperación); mientras que el buffer SM presentó mayor estabilidad fágica, con una concentración final de  $2.97 \times 10^8$  UFP/mL (89.3% de recuperación). Estos hallazgos concuerdan con Ciešlik et al. (2022), quienes evidenciaron que el almacenamiento a 4 °C en buffer SM es eficaz en fagos de *Enterobacter spp.*; y Xu et al. (2023) reportaron concentraciones estables durante 12 meses en buffer SM, reforzando que esta temperatura es adecuada para la preservación a mediano plazo. Este comportamiento se atribuye a la composición iónica del buffer SM, específicamente a la presencia de  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , esenciales para mantener la integridad estructural de las proteínas virales y prevenir la disociación de la cápside y la cola (Xu et al., 2023). Asimismo, Huang et al. (2025) demostraron que el buffer SM mejora significativamente la estabilidad de fagos de *Escherichia coli* en comparación con medios complejos (medios nutricionales). Esta respuesta de superioridad del buffer SM se atribuye a la composición iónica y menor interferencia molecular, ya que las proteínas y lípidos residuales de los medios complejos pueden provocar la agregación de viriones o el bloqueo de las fibras de la cola, reduciendo la capacidad de absorción del fago y afectando la estabilidad de las partículas virales a largo plazo.

En respuesta al efecto del crioprotector, se evidenció que la adición de glicerol al 30% fue perjudicial en Caldo TSB, ya que el fago *HEc4I* de *Escherichia* presentó una disminución marcada de la concentración fágica ( $3.55 \times 10^5$  UFP/mL) y se inactivó completamente en el día 120; mientras que el buffer SM mantuvo una concentración fágica de  $1.29 \times 10^8$  UFP/mL a los 135 días (85.5% de recuperación). Esto confirma que la eficacia del glicerol al 30% sigue siendo limitada fuera de las condiciones de

congelación. Por otro lado, la adición de DMSO al 10% ralentizó la pérdida de las concentraciones fágicas, pues al culminar los 135 días de evaluación, las concentraciones finales fueron de  $2.40 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB (77.8% de recuperación) y  $2.34 \times 10^8$  UFP/mL en buffer SM (88.2% de recuperación). Este efecto se atribuye a la capacidad de penetrar estructuras biológicas y equilibrar las concentraciones de solutos entre el interior y exterior del virión, evitando que la estructura viral colapse. Sin embargo, no fue mejor que el buffer SM sin crioprotector, este comportamiento está asociado al mecanismo de acción del DMSO, ya que su función protectora está orientada a la protección frente a temperaturas de congelación (Xu et al., 2023; Xiao et al., 2022) (Figura 10).

**Figura 10**

*Curva de estabilidad del bacteriófago HEc4I de Escherichia, en Escherichia coli NCTC 13476, a 4°C*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 04

A  $-20^{\circ}\text{C}$ , el bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* presentó una disminución notable pero no extrema de la concentración fágica, evidenciando un ligero efecto negativo de la congelación lenta. Este comportamiento indica que, si bien el bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* es susceptible al daño inducido por la formación de cristales de hielo, mantiene una tasa de recuperación considerable (78.3-86.4% de recuperación), lo que sugiere una resistencia estructural moderada al estrés mecánico. Esto concuerda con Blas (2023), quien atribuye las reducciones de la concentración fágica al daño ocasionado por la formación de cristales de hielo.

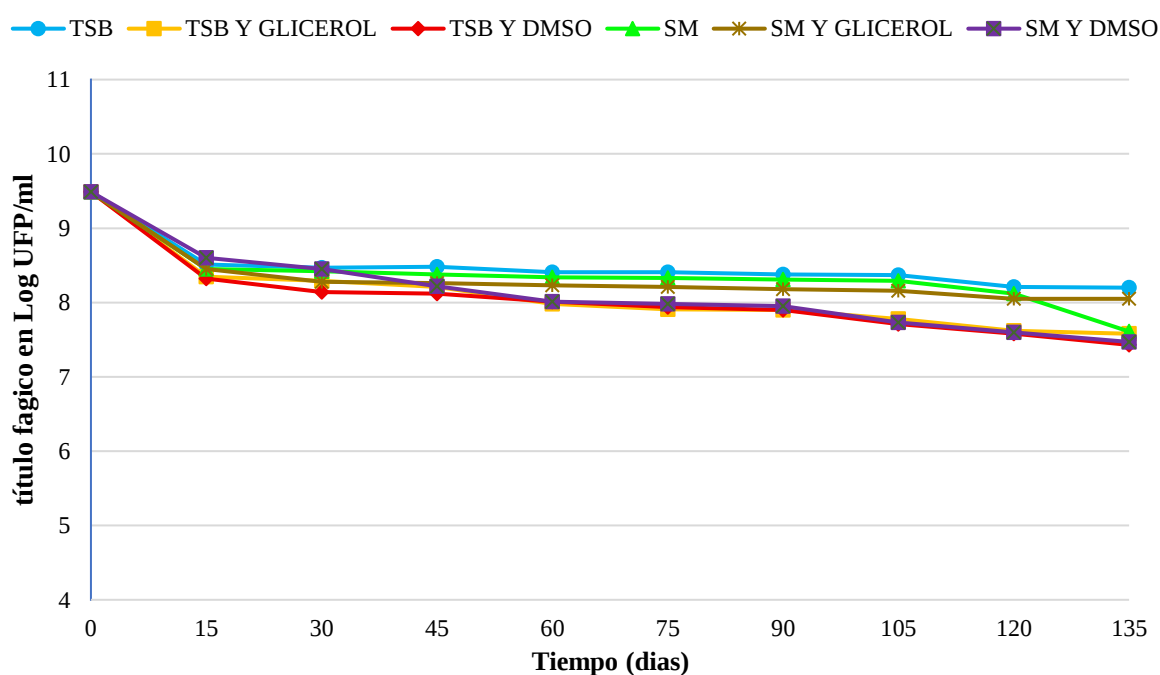
Respecto a las soluciones de suspensión, el Caldo TSB sin crioprotectores mantuvo mejor la concentración fágica ( $1.57 \times 10^8$  UFP/mL, 86.4% de recuperación) en comparación con el buffer SM ( $4.10 \times 10^7$  UFP/mL, 80.2% de recuperación). Esto se atribuye a la protección adicional de los componentes orgánicos del Caldo TSB. Sin embargo, al incorporar crioprotectores, el comportamiento se invirtió, siendo el buffer SM (78.7-84.8% de recuperación) más estable que el Caldo TSB (78.3-79.9% de recuperación). Este patrón indica que la eficacia de la solución de suspensión depende de su interacción con los crioprotectores, siendo el buffer SM más compatible para potenciar su efecto protector. Este hallazgo concuerda con Huang et al. (2025), quienes demostraron que la estabilidad a temperaturas de congelación es altamente dependiente de la combinación entre el medio y condiciones de almacenamiento, y que el buffer SM mejora significativamente la preservación fágica cuando se optimiza con crioprotectores.

Respecto a los crioprotectores, se evidenció que la adición de glicerol al 30% presentó un mejor desempeño en la tasa de recuperación, con una concentración fágica de  $3.80 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB a los 135 días (79.9% de recuperación) y  $1.11 \times 10^8$  UFP/mL en buffer SM a los 135 días (84.8% de recuperación); mientras el DMSO al 10% evidenció una ligera reducción en la tasa de recuperación, con una concentración

final de  $2.70 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB (78.3% de recuperación) y  $2.93 \times 10^7$  UFP/mL en buffer SM (78.7% de recuperación) a los 135 días, lo cual indica que el glicerol al 30% tiene mayor capacidad para reducir el daño ocasionado por la formación de cristales de hielo, estabilizando las estructuras del fago *HEc4I* de *Escherichia*. Estos resultados coinciden con Xu et al. (2023), quienes reportaron que la eficacia del crioprotector depende de la solución de almacenamiento y el tipo de fago. Asimismo, Xiao et al. (2022) reportaron que el glicerol al 30% puede ofrecer una mayor protección que el DMSO al 10% a temperaturas intermedias de congelación ( $-20^\circ\text{C}$ ) (Figura 11).

**Figura 11**

*Curva de estabilidad del bacteriófago HEc4I de Escherichia, en Escherichia coli NCTC 13476, a  $-20^\circ\text{C}$*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 04.

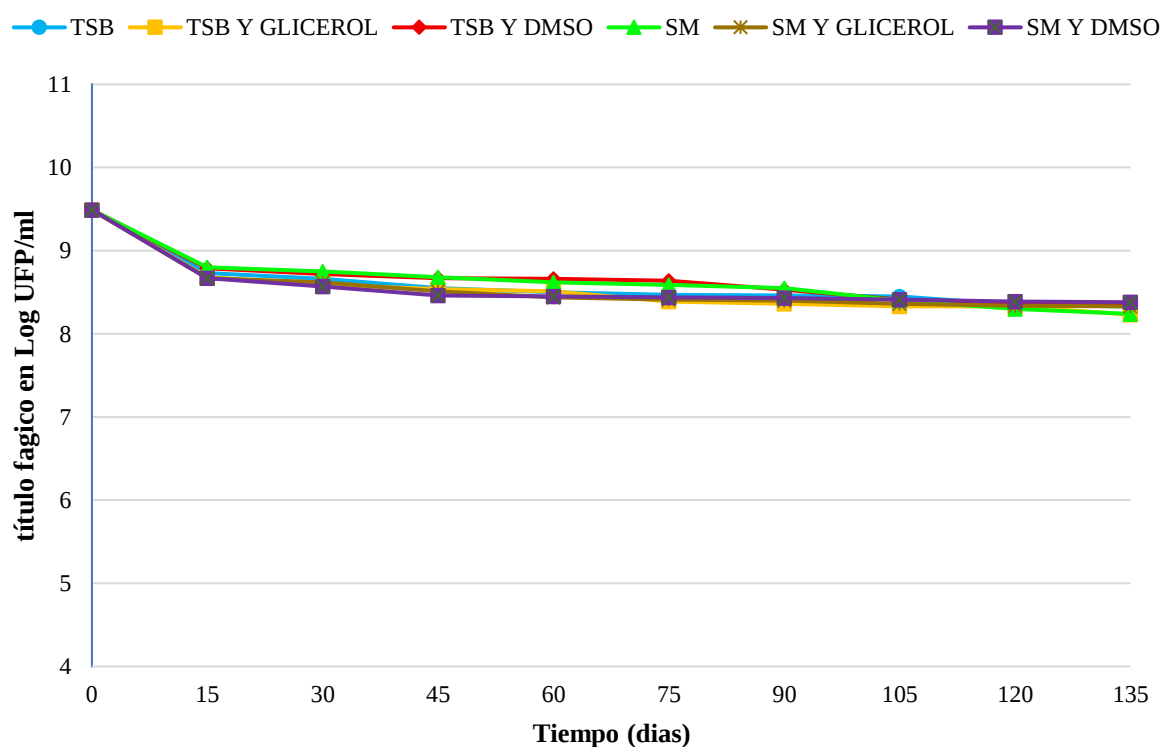
A  $-80^\circ\text{C}$ , el bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* evidenció una alta tasa de recuperación en todas las condiciones evaluadas (88% de recuperación), confirmando que la ultra congelación constituye la condición más eficaz para la preservación fágica a largo plazo.

Esto concuerda con Blas (2023) y Huang et al. (2025), quienes destacan que la velocidad de congelación rápida a  $-80^{\circ}\text{C}$  minimiza los daños estructurales en el virión.

Tanto el Caldo TSB como el buffer SM, sin crioprotectores, evidenciaron altas tasas de recuperación, con concentraciones finales de  $2.14 \times 10^8$  UFP/mL en Caldo TSB (87.8% de recuperación) y  $1.73 \times 10^8$  UFP/mL en buffer SM (86.8% de recuperación). Por otro lado, al incorporar crioprotectores, el buffer SM evidenció una ligera superioridad en las tasas de recuperación fágica (87.8% a 88.3% de recuperación). El DMSO al 10% evidenció tasas de recuperación de 88% en Caldo TSB y 88.3% en buffer SM, con concentraciones de  $2.26 \times 10^8$  UFP/mL en Caldo TSB a los 135 días y  $2.41 \times 10^8$  UFP/mL en buffer SM a los 135 días. El uso de glicerol al 30% mostró una ligera disminución de la tasa de recuperación fágica, en Caldo TSB la tasa de recuperación fue de 86.7%, con una concentración de  $1.71 \times 10^8$  UFP/mL a los 135 días, y en buffer SM la tasa de recuperación fágica fue de 87.8%, con una concentración de  $2.12 \times 10^8$  UFP/mL a los 135 días. Esto se debe a que la composición química del buffer SM, especialmente los cationes divalentes, favorece la acción protectora de los crioprotectores, minimizando la reducción de la concentración fágica (Huang et al., 2025). Asimismo, la respuesta del DMSO al 10% coincide con lo reportado por Xu et al. (2023), quienes indicaron que el DMSO mejora significativamente la estabilidad fágica a  $-80^{\circ}\text{C}$  en comparación con el glicerol; y Xiao et al. (2022), quienes señalaron que el DMSO al 10% es más eficaz en condiciones de ultra congelación, mientras que el glicerol al 30% puede incluso resultar menos eficaz (Figura 12).

**Figura 12**

*Curva de estabilidad del bacteriófago HEc4I de Escherichia, en Escherichia coli NCTC 13476, a -80°C*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 04.

### 3.2 Análisis de la evaluación de estabilidad del bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia de Escherichia*

El bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* demostró ser más sensible a las variaciones ambientales, especialmente a temperaturas elevadas. A temperatura ambiente, su tasa de recuperación promedio cayó drásticamente al 53.07%, mostrando una vulnerabilidad crítica ante el calor. Sin embargo, su viabilidad mejoró conforme descendió la

temperatura: alcanzó un 71.20% de recuperación a 4°C, un 81.34% de recuperación a -20°C y, finalmente, la ultra congelación a -80°C proporcionó las condiciones más estables con una tasa de recuperación del 87.56% (Tabla 03).

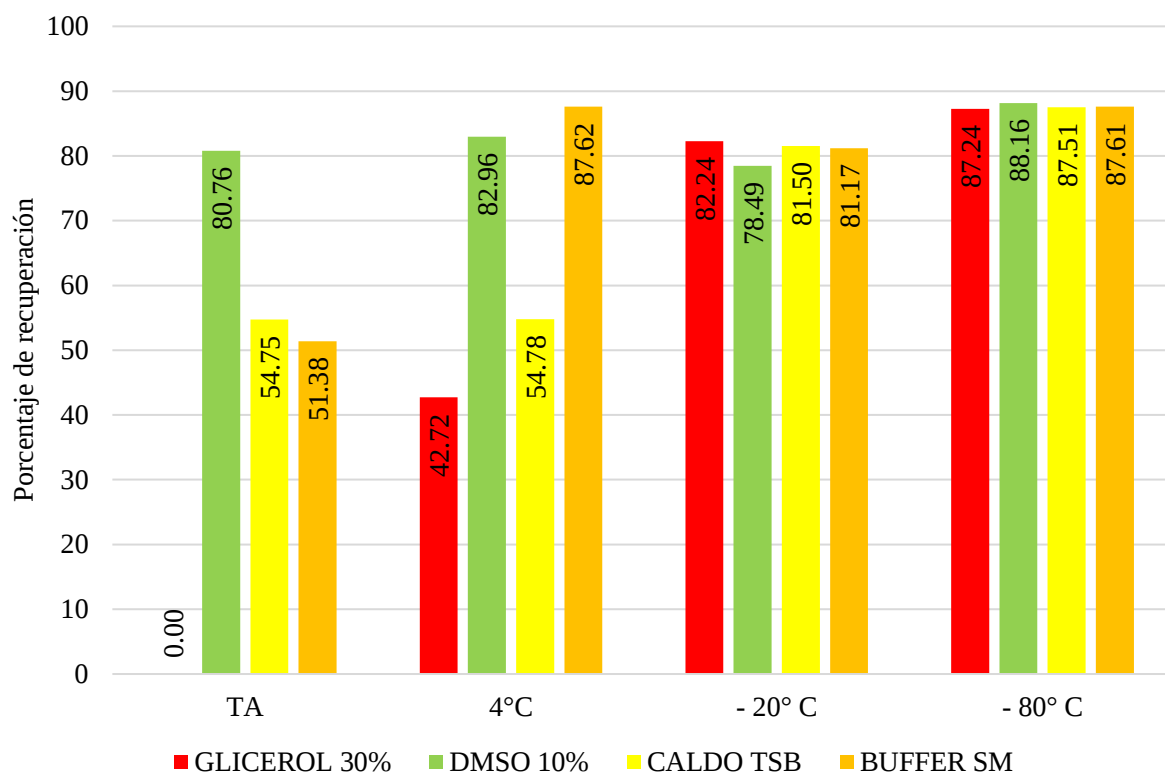
**Tabla 03**

*Promedio porcentual de la tasa de recuperación del bacteriófago HEc4I de Escherichia bajo diferentes condiciones de preservación*

| BACTERIOFAGO HE4cI             |                |                                 |                                     |                           |                                |          |  |
|--------------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------|--|
| T°                             | SOLUCION       | TASA DE RECUPERACION AL DIA 135 | PROMEDIO PORCENTUAL DE RECUPERACIÓN | PROMEDIO ENTRE SOLUCIONES | PROMEDIO ENTRE CRIOPROTECTORES |          |  |
|                                |                |                                 |                                     |                           | GLICEROL 30%                   | DMSO 10% |  |
| TA                             | TSB            | 81.79%                          | 53.07%                              | 54.75%                    | 0.00%                          | 80.76%   |  |
|                                | TSB + GLICEROI | 0.00%                           |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | TSB + DMSO     | 82.45%                          |                                     | 51.38%                    |                                |          |  |
|                                | SM             | 75.07%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + GLICEROI  | 0.00%                           |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + DMSO      | 79.07%                          |                                     |                           |                                |          |  |
| 4°C                            | TSB            | 86.58%                          | 71.20%                              | 54.80%                    | 42.72%                         | 82.96%   |  |
|                                | TSB + GLICEROI | 0.00%                           |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | TSB + DMSO     | 77.76%                          |                                     | 87.67%                    |                                |          |  |
|                                | SM             | 89.26%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + GLICEROI  | 85.44%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + DMSO      | 88.17%                          |                                     |                           |                                |          |  |
| - 20° C                        | TSB            | 86.35%                          | 81.34%                              | 81.53%                    | 82.24%                         | 78.49%   |  |
|                                | TSB + GLICEROI | 79.86%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | TSB + DMSO     | 78.30%                          |                                     | 81.23%                    |                                |          |  |
|                                | SM             | 80.21%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + GLICEROI  | 84.63%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + DMSO      | 78.68%                          |                                     |                           |                                |          |  |
| - 80° C                        | TSB            | 87.77%                          | 87.56%                              | 87.51%                    | 87.24%                         | 88.16%   |  |
|                                | TSB + GLICEROI | 86.74%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | TSB + DMSO     | 88.01%                          |                                     | 87.61%                    |                                |          |  |
|                                | SM             | 86.80%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + GLICEROI  | 87.73%                          |                                     |                           |                                |          |  |
|                                | SM + DMSO      | 88.31%                          |                                     |                           |                                |          |  |
| PROMEDIO DE RECUPERACIÓN TOTAL |                |                                 | 73.29%                              |                           |                                |          |  |

**Figura 13**

*Análisis del bacteriófago HEc4I de Escherichia bajo diferentes condiciones de preservación*



### 3.3 Estabilidad del bacteriófago H33IIK de *Klebsiella* en *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814

La cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814, se utilizó como hospedero del bacteriófago H33IIK de *Klebsiella*, el cual fue almacenado a una concentración inicial de  $9.50 \times 10^9$  UFP/mL, evidenciando pérdidas significativas bajo las condiciones evaluadas (Tabla 04).

**Tabla 04**

*Estabilidad del bacteriófago H33IIK de Klebsiella, en Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814, evaluado bajo diferentes condiciones de preservación*

| T°      | SOLUCIONES     | TIEMPO (DIAS)        |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      | TASA DE RECUPERACIÓN AL DÍA 135 (%) |
|---------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------|
|         |                | 0                    | 15                   | 30                   | 45                   | 60                   | 75                   | 90                   | 105                  | 120                  | 135                  |                                     |
| TA      | TSB            | 9.50×10 <sup>9</sup> | 2.87×10 <sup>8</sup> | 2.18×10 <sup>8</sup> | 1.98×10 <sup>8</sup> | 1.47×10 <sup>8</sup> | 1.38×10 <sup>8</sup> | 1.22×10 <sup>8</sup> | 8.27×10 <sup>7</sup> | 6.30×10 <sup>7</sup> | 3.50×10 <sup>7</sup> | 75.61%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 9.50×10 <sup>9</sup> | 1.70×10 <sup>8</sup> | 1.29×10 <sup>8</sup> | 6.50×10 <sup>7</sup> | 1.87×10 <sup>7</sup> | 1.75×10 <sup>7</sup> | 9.83×10 <sup>6</sup> | 3.00×10 <sup>5</sup> | 3.17×10 <sup>4</sup> | 3.87×10 <sup>3</sup> | 35.95%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 9.50×10 <sup>9</sup> | 3.20×10 <sup>8</sup> | 2.17×10 <sup>8</sup> | 1.95×10 <sup>8</sup> | 1.30×10 <sup>8</sup> | 1.13×10 <sup>8</sup> | 9.97×10 <sup>7</sup> | 8.40×10 <sup>7</sup> | 7.67×10 <sup>7</sup> | 6.87×10 <sup>7</sup> | 78.54%                              |
|         | SM             | 9.50×10 <sup>9</sup> | 9.17×10 <sup>8</sup> | 7.63×10 <sup>8</sup> | 5.17×10 <sup>8</sup> | 3.23×10 <sup>8</sup> | 1.95×10 <sup>8</sup> | 1.87×10 <sup>8</sup> | 1.75×10 <sup>8</sup> | 5.13×10 <sup>7</sup> | 2.57×10 <sup>7</sup> | 74.26%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 9.50×10 <sup>9</sup> | 1.56×10 <sup>8</sup> | 8.83×10 <sup>7</sup> | 4.50×10 <sup>7</sup> | 2.33×10 <sup>7</sup> | 2.19×10 <sup>7</sup> | 1.82×10 <sup>7</sup> | 1.31×10 <sup>7</sup> | 2.00×10 <sup>6</sup> | 1.15×10 <sup>6</sup> | 60.75%                              |
|         | SM Y DMSO      | 9.50×10 <sup>9</sup> | 8.70×10 <sup>8</sup> | 6.90×10 <sup>8</sup> | 5.10×10 <sup>8</sup> | 3.97×10 <sup>8</sup> | 2.60×10 <sup>8</sup> | 2.09×10 <sup>8</sup> | 1.69×10 <sup>8</sup> | 6.17×10 <sup>7</sup> | 1.66×10 <sup>7</sup> | 72.37%                              |
| 4°C     | TSB            | 9.50×10 <sup>9</sup> | 5.60×10 <sup>8</sup> | 2.42×10 <sup>8</sup> | 2.38×10 <sup>8</sup> | 2.18×10 <sup>8</sup> | 2.12×10 <sup>8</sup> | 1.96×10 <sup>8</sup> | 1.84×10 <sup>8</sup> | 3.47×10 <sup>7</sup> | 2.75×10 <sup>7</sup> | 74.55%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 9.50×10 <sup>9</sup> | 1.75×10 <sup>8</sup> | 8.70×10 <sup>7</sup> | 7.50×10 <sup>7</sup> | 7.03×10 <sup>7</sup> | 5.20×10 <sup>7</sup> | 2.54×10 <sup>7</sup> | 1.20×10 <sup>7</sup> | 2.80×10 <sup>6</sup> | 3.33×10 <sup>5</sup> | 55.35%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 9.50×10 <sup>9</sup> | 3.87×10 <sup>8</sup> | 1.32×10 <sup>8</sup> | 9.80×10 <sup>7</sup> | 8.43×10 <sup>7</sup> | 7.00×10 <sup>7</sup> | 3.10×10 <sup>7</sup> | 1.97×10 <sup>7</sup> | 1.70×10 <sup>7</sup> | 1.53×10 <sup>7</sup> | 72.01%                              |
|         | SM             | 9.50×10 <sup>9</sup> | 8.73×10 <sup>8</sup> | 3.13×10 <sup>8</sup> | 2.72×10 <sup>8</sup> | 2.33×10 <sup>8</sup> | 1.76×10 <sup>8</sup> | 1.45×10 <sup>8</sup> | 9.93×10 <sup>7</sup> | 7.27×10 <sup>7</sup> | 3.67×10 <sup>7</sup> | 65.79%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 9.50×10 <sup>9</sup> | 3.97×10 <sup>8</sup> | 2.24×10 <sup>8</sup> | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.73×10 <sup>8</sup> | 1.47×10 <sup>8</sup> | 1.31×10 <sup>8</sup> | 1.07×10 <sup>8</sup> | 8.87×10 <sup>7</sup> | 6.17×10 <sup>7</sup> | 78.07%                              |
|         | SM Y DMSO      | 9.50×10 <sup>9</sup> | 5.03×10 <sup>8</sup> | 3.40×10 <sup>8</sup> | 2.93×10 <sup>8</sup> | 2.61×10 <sup>8</sup> | 2.31×10 <sup>8</sup> | 2.16×10 <sup>8</sup> | 1.08×10 <sup>8</sup> | 7.23×10 <sup>7</sup> | 3.63×10 <sup>7</sup> | 75.77%                              |
| - 20° C | TSB            | 9.50×10 <sup>9</sup> | 1.00×10 <sup>6</sup> | 8.73×10 <sup>5</sup> | 4.03×10 <sup>5</sup> | 2.18×10 <sup>5</sup> | 1.74×10 <sup>5</sup> | 1.23×10 <sup>5</sup> | 1.04×10 <sup>5</sup> | 8.67×10 <sup>4</sup> | 4.27×10 <sup>4</sup> | 46.40%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 9.50×10 <sup>9</sup> | 3.43×10 <sup>8</sup> | 7.30×10 <sup>7</sup> | 3.80×10 <sup>7</sup> | 2.34×10 <sup>8</sup> | 2.03×10 <sup>8</sup> | 1.74×10 <sup>8</sup> | 1.12×10 <sup>8</sup> | 6.20×10 <sup>7</sup> | 5.90×10 <sup>7</sup> | 77.88%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 9.50×10 <sup>9</sup> | 3.43×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>6</sup> | 6.50×10 <sup>6</sup> | 4.77×10 <sup>6</sup> | 3.83×10 <sup>6</sup> | 2.97×10 <sup>6</sup> | 1.99×10 <sup>6</sup> | 8.63×10 <sup>5</sup> | 5.83×10 <sup>4</sup> | 47.77%                              |
|         | SM             | 9.50×10 <sup>9</sup> | 1.67×10 <sup>6</sup> | 1.55×10 <sup>5</sup> | 1.09×10 <sup>5</sup> | 5.30×10 <sup>4</sup> | 4.23×10 <sup>4</sup> | 3.93×10 <sup>4</sup> | 3.70×10 <sup>4</sup> | 3.43×10 <sup>4</sup> | 3.07×10 <sup>4</sup> | 44.97%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 9.50×10 <sup>9</sup> | 4.03×10 <sup>8</sup> | 3.80×10 <sup>8</sup> | 3.67×10 <sup>8</sup> | 3.40×10 <sup>8</sup> | 3.03×10 <sup>8</sup> | 2.85×10 <sup>8</sup> | 2.78×10 <sup>8</sup> | 2.73×10 <sup>8</sup> | 2.67×10 <sup>8</sup> | 84.45%                              |
|         | SM Y DMSO      | 9.50×10 <sup>9</sup> | 4.60×10 <sup>8</sup> | 1.10×10 <sup>8</sup> | 6.50×10 <sup>7</sup> | 3.57×10 <sup>6</sup> | 7.00×10 <sup>5</sup> | 6.03×10 <sup>5</sup> | 5.27×10 <sup>5</sup> | 4.33×10 <sup>5</sup> | 3.50×10 <sup>5</sup> | 55.56%                              |
| - 80° C | TSB            | 9.50×10 <sup>9</sup> | 2.79×10 <sup>9</sup> | 1.35×10 <sup>9</sup> | 6.50×10 <sup>8</sup> | 4.67×10 <sup>8</sup> | 3.50×10 <sup>8</sup> | 3.40×10 <sup>8</sup> | 3.27×10 <sup>8</sup> | 3.07×10 <sup>8</sup> | 2.86×10 <sup>8</sup> | 84.75%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 9.50×10 <sup>9</sup> | 2.60×10 <sup>9</sup> | 1.89×10 <sup>9</sup> | 1.15×10 <sup>9</sup> | 4.07×10 <sup>8</sup> | 3.23×10 <sup>8</sup> | 2.74×10 <sup>8</sup> | 2.58×10 <sup>8</sup> | 2.37×10 <sup>8</sup> | 2.04×10 <sup>8</sup> | 83.29%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 9.50×10 <sup>9</sup> | 2.83×10 <sup>9</sup> | 7.67×10 <sup>8</sup> | 4.97×10 <sup>8</sup> | 3.30×10 <sup>8</sup> | 2.97×10 <sup>8</sup> | 2.75×10 <sup>8</sup> | 2.63×10 <sup>8</sup> | 2.44×10 <sup>8</sup> | 2.34×10 <sup>8</sup> | 83.89%                              |
|         | SM             | 9.50×10 <sup>9</sup> | 2.95×10 <sup>9</sup> | 1.20×10 <sup>9</sup> | 9.50×10 <sup>8</sup> | 5.43×10 <sup>8</sup> | 3.20×10 <sup>8</sup> | 2.39×10 <sup>8</sup> | 2.07×10 <sup>8</sup> | 1.93×10 <sup>8</sup> | 1.76×10 <sup>8</sup> | 82.65%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 9.50×10 <sup>9</sup> | 3.90×10 <sup>8</sup> | 2.79×10 <sup>8</sup> | 2.54×10 <sup>8</sup> | 2.25×10 <sup>8</sup> | 2.19×10 <sup>8</sup> | 2.04×10 <sup>8</sup> | 1.98×10 <sup>8</sup> | 1.46×10 <sup>8</sup> | 1.29×10 <sup>8</sup> | 81.28%                              |
|         | SM Y DMSO      | 9.50×10 <sup>9</sup> | 3.60×10 <sup>8</sup> | 9.20×10 <sup>7</sup> | 7.50×10 <sup>7</sup> | 4.70×10 <sup>7</sup> | 3.63×10 <sup>7</sup> | 2.87×10 <sup>7</sup> | 2.64×10 <sup>7</sup> | 1.62×10 <sup>7</sup> | 1.39×10 <sup>7</sup> | 71.60%                              |

Nota: TA: temperatura ambiente; TSB: Caldo Tripticasa de Soja; SM: buffer SM; DMSO: dimetilsulfóxido.

\*Se realizó las evaluaciones por triplicado, el resultado se expresó en promedio.

\*Los valores obtenidos se expresan en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

A temperatura ambiente (TA) se observó una disminución progresiva. Este comportamiento coincide con Selcuk et al. (2024), Cieřlik et al. (2022) y Alvi et al. (2018), quienes reportaron pérdidas fágicas en condiciones similares, y con González et al. (2018), quienes observaron reducciones fágicas a temperatura ambiente independientemente del sistema de almacenamiento.

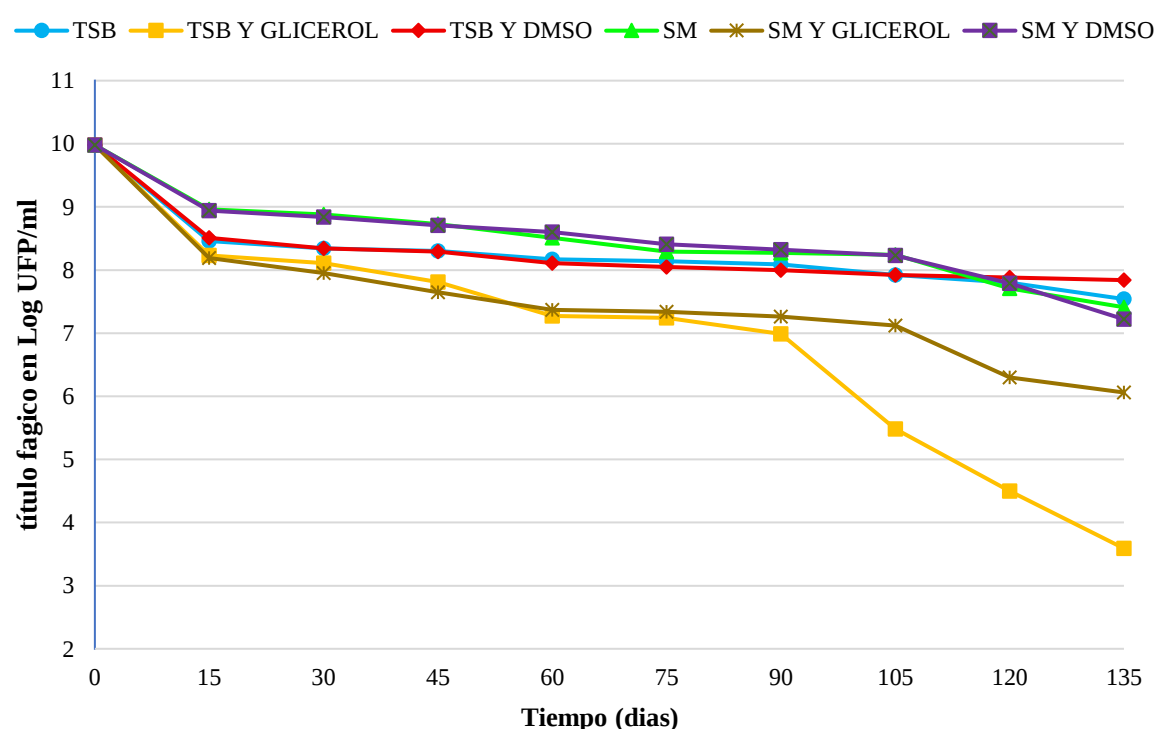
Respecto a las soluciones de suspensión, el Caldo TSB mostró mejor desempeño en la tasa de recuperación fágica (75.61% de recuperación), con una concentración final de  $3.50 \times 10^7$  UFP/mL. El buffer SM mostró menor tasa de recuperación (74.26% de recuperación), con una concentración final de  $2.57 \times 10^7$  UFP/mL. Este comportamiento indica que la composición proteica (peptonas y compuestos orgánicos) del Caldo TSB ejerce un efecto protector parcial sobre las estructuras virales, favoreciendo la estabilidad de la cápside frente a la desnaturalización proteica. En contraste, el buffer SM, al no contener proteínas nutricionales, no proporciona este efecto adicional.

En respuesta a los crioprotectores, la adición de glicerol al 30% en las soluciones de suspensión evidenció reducciones en las tasas de supervivencia fágica, ya que presentó concentraciones finales de  $3.87 \times 10^3$  UFP/mL en Caldo TSB (35.95% de recuperación) y  $1.15 \times 10^6$  UFP/mL en buffer SM (60.75% de recuperación), sin mejoras evidentes frente a las soluciones sin crioprotector. Por otro lado, la adición de DMSO al 10% evidenció mejoras en la estabilidad fágica, con concentraciones finales de  $6.87 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB (78.54% de recuperación) y  $1.66 \times 10^7$  UFP/mL en buffer SM (72.37% de recuperación), siendo relativamente mejor que el glicerol al 30%. Desde el punto de vista mecánico, estos resultados coinciden con Xu et al. (2023) y Xiao et al. (2022), quienes indican que la eficacia del glicerol y el DMSO es altamente dependiente de la temperatura, ya que el mecanismo de acción de los crioprotectores está orientado a la protección frente a la formación de cristales de hielo durante la congelación, pero no

frente a la desnaturalización proteica inducida por la temperatura de ambiente. Asimismo, Selcuk et al. (2024) señalaron que la limitada capacidad de penetración del glicerol, debido a la alta viscosidad del crioprotector, reduce su efectividad protectora frente a la desnaturalización (Figura 14).

**Figura 14**

*Estabilidad del bacteriófago H33IIK, en Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814, a temperatura ambiente*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 08.

A 4 °C, el bacteriófago *H33IIK* de *Klebsiella* presentó reducciones moderadas. Este comportamiento sugiere que, aunque la refrigeración reduce la inactivación, factores específicos del virión limitan su estabilidad.

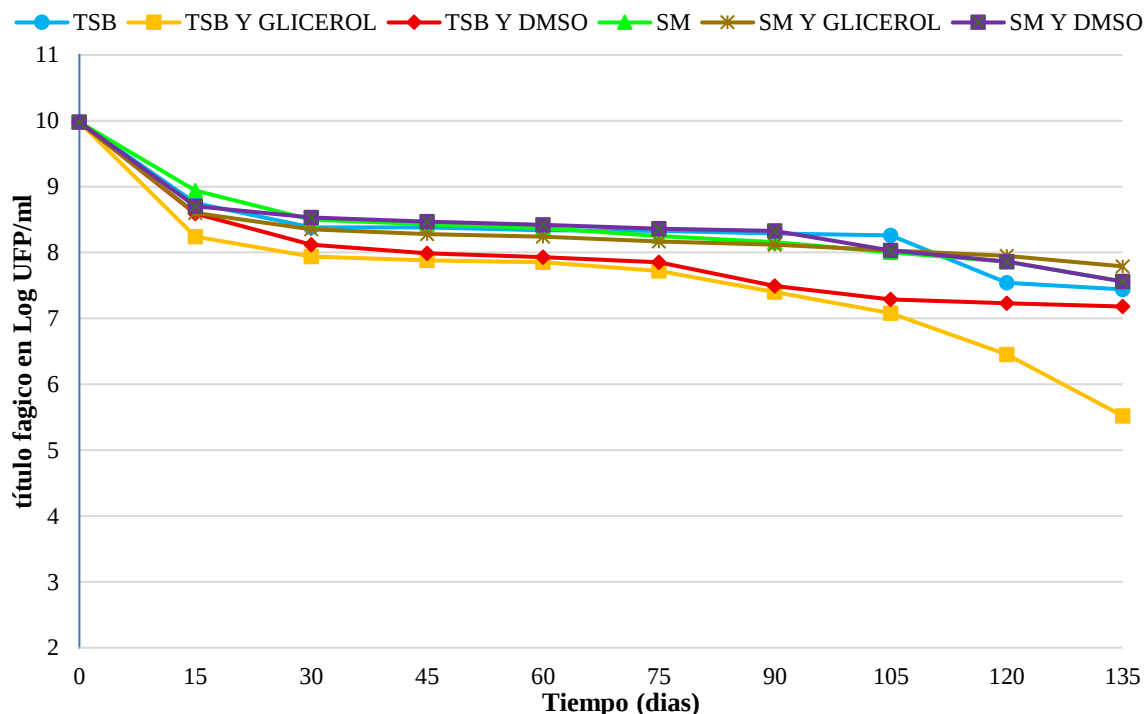
En relación con las soluciones de suspensión, el buffer SM evidenció una mejor tasa de recuperación (75.8% de recuperación) en comparación con el Caldo TSB (74.5% de recuperación) a los 135 días, con concentraciones finales de  $3.66 \times 10^7$  UFP/mL y  $2.75 \times 10^7$  UFP/mL respectivamente. Esto concuerda con Baqer et al. (2023), quienes

evaluaron bacteriófagos de *Klebsiella pneumoniae* y evidenciaron que a 4°C en buffer SM, la reducción fágica fue ligera debido a los aportes iónicos del buffer SM; Huang et al. (2025) y González et al. (2018) destacan que el buffer SM ofrece mayor estabilidad fágica que medios complejos (medios nutricionales). Esto se debe a que, en medios nutricionales, la saturación proteica puede inducir la agregación de proteínas en la estructura del fago, comprometiendo su infectividad. Asimismo, Cieřlik et al. (2022) señalaron que, en su estudio, a 4 °C no evidenciaron daños significativos en la concentración fágica de los fagos almacenados.

En cuanto a los crioprotectores, el DMSO al 10% permitió reducir parcialmente la pérdida de la concentración fágica y mantener la tasa de recuperación del bacteriófago, se registraron concentraciones finales de  $1.53 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB (72.01% de recuperación) y  $3.63 \times 10^7$  UFP/mL (75.77% de recuperación) en buffer SM. Por otro lado, el glicerol al 30% no mejoró la tasa de recuperación del bacteriófago *H33IIK de Klebsiella* en Caldo TSB ( $3.33 \times 10^5$  UFP/mL, 55.35% de recuperación) a los 135 días; mientras que en buffer SM se evidenció mejor estabilidad fágica, con una concentración final de  $6.17 \times 10^7$  UFP/mL (78.07% de recuperación) a los 135 días. Estos resultados coinciden con Selcuk et al. (2024), quienes señalaron que la eficacia de los crioprotectores depende del tipo de fago (Figura 15).

**Figura 15**

*Curva de estabilidad del bacteriófago H33IIK de Klebsiella, en Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814, a 4°C*



*Nota:* Los resultados del grafico se expresan en base al Anexo 08.

En congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , el bacteriófago *H33IIK de Klebsiella* evidenció una marcada inestabilidad fágica, con diferencias altamente significativas entre las condiciones evaluadas, lo que confirma su elevada susceptibilidad al daño por congelación. Esto concuerda con González et al. (2018), quienes señalan que la estabilidad a  $-20^{\circ}\text{C}$  es altamente variable y depende del tipo de fago, pudiendo presentarse desde reducciones moderadas hasta inactivación total.

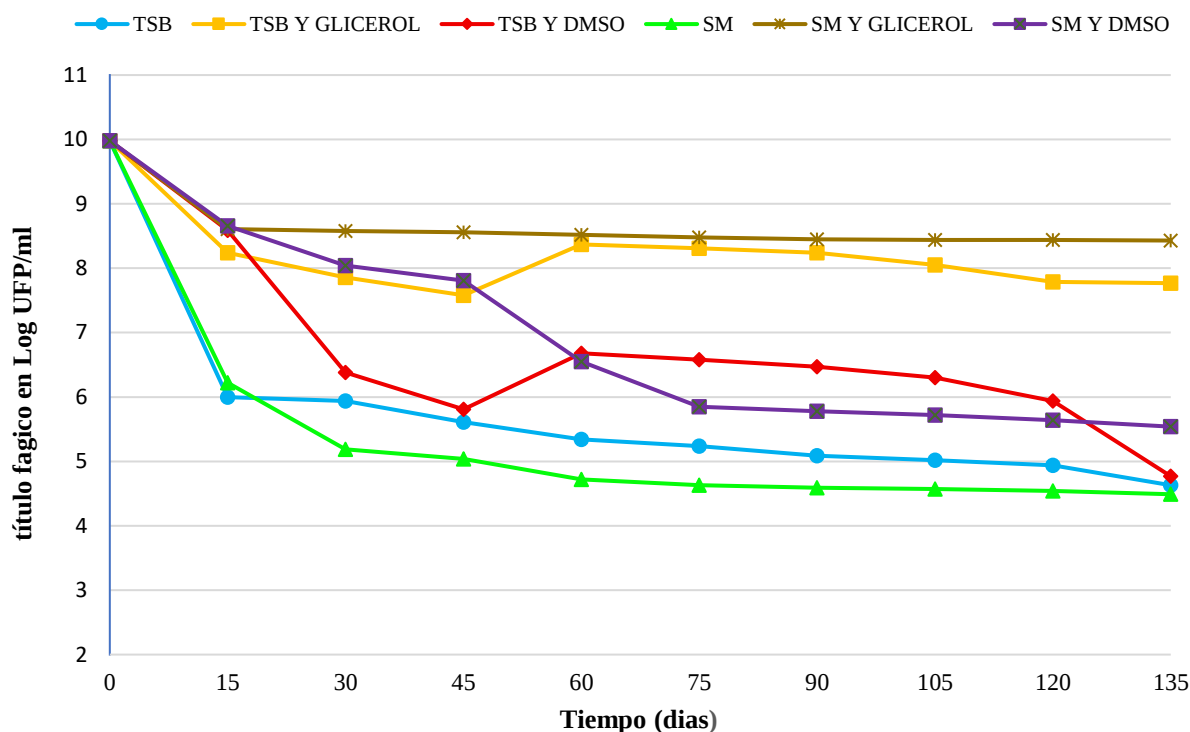
En cuanto a las soluciones de suspensión, tanto el Caldo TSB como el buffer SM mostraron comportamientos desfavorables en la estabilidad fágica y tasa de recuperación del bacteriófago (46.4% de recuperación y 44.97% de recuperación, respectivamente), siendo el Caldo TSB ( $4.27 \times 10^4$  UFP/mL) ligeramente superior al buffer SM ( $3.07 \times 10^4$  UFP/mL) en ausencia de crioprotectores a los 135 días. Estos resultados confirman que

la congelación lenta constituye un factor determinante de la pérdida de viabilidad, debido a la formación de cristales de hielo que provocan la desintegración de la cápside y alteraciones en las proteínas estructurales, tal como ha sido descrito por Blas (2023) y Xu et al. (2023), quienes reportaron reducciones superiores a 4 log en condiciones similares, sin crioprotección. Asimismo, Huang et al. (2025) destacaron que la congelación lenta resulta desfavorable para la estabilidad fágica, debido a la lenta formación de hielo. No obstante, al incorporar crioprotectores, se observó una clara superioridad de estabilidad fágica del buffer SM (55.6-85.4% de recuperación) sobre el Caldo TSB (47.8-77.6% de recuperación), indicando una mejor afinidad del buffer SM con los agentes crioprotectores, debido a su composición iónica, la cual contribuye a la estabilidad de la cápside.

Respecto a los crioprotectores, el glicerol al 30% demostró ser significativamente mejor crioprotector, manteniendo altas tasas de recuperación fágica, con concentraciones finales de  $5.90 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB (77.88% de recuperación) y  $2.67 \times 10^8$  UFP/mL en buffer SM (84.45% de recuperación); mientras que el DMSO al 10% evidenció una protección limitada con concentraciones finales de  $5.83 \times 10^4$  UFP/mL en Caldo TSB (47.77% de recuperación) y  $3.50 \times 10^5$  UFP/mL en buffer SM (55.56% de recuperación). Este comportamiento coincide con el de Xiao et al. (2022), quienes evidenciaron que el glicerol al 30% presenta una mayor eficacia que el DMSO al 10% a  $-20$  °C. Asimismo, Selcuk et al. (2024) señalaron que la eficacia del crioprotector depende del tipo de fago, lo que explica la baja respuesta crioprotectora del DMSO al 10% en el fago *H33IIK de Klebsiella* (Figura 16).

**Figura 16**

*Estabilidad del bacteriófago H33IIK de Klebsiella, en Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814, a -20°C*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 08.

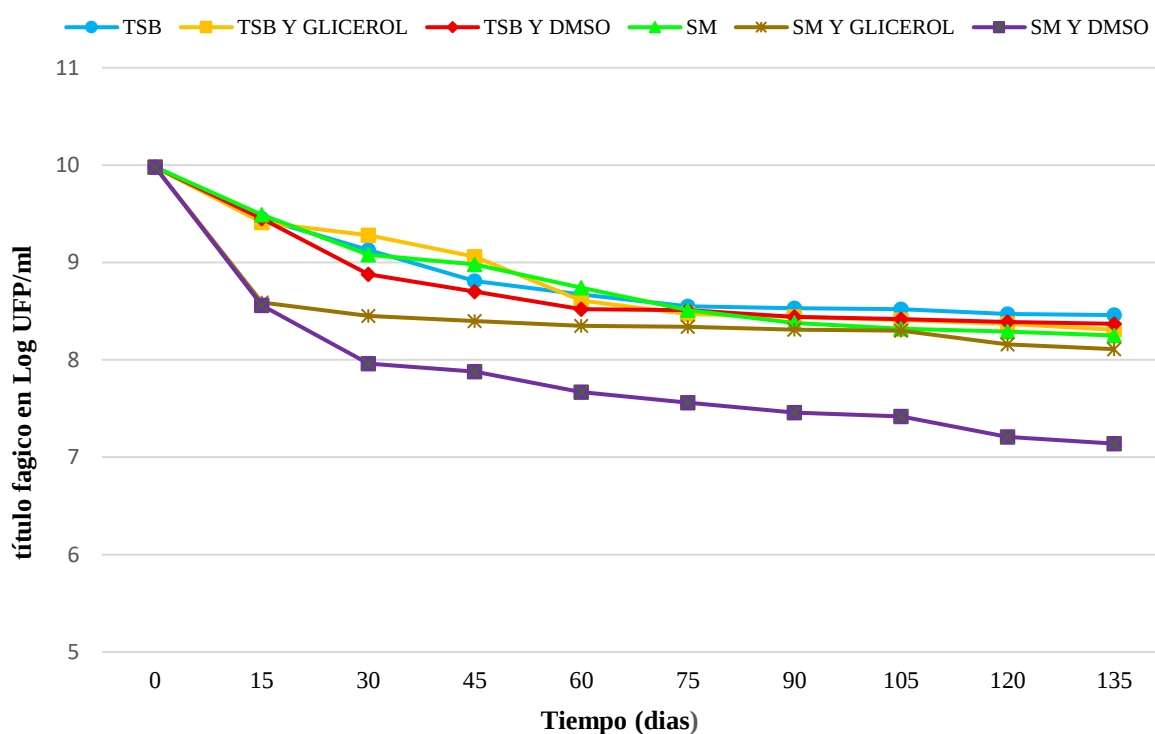
A  $-80^{\circ}\text{C}$ , se observó que la ultra congelación mantuvo tasas de recuperación altas mejorando notablemente estabilidad fágica. En ausencia de crioprotectores, el Caldo TSB mostró un mejor desempeño ( $2.86 \times 10^8$  UFP/mL, 84.75% de recuperación), en comparación con el buffer SM ( $1.76 \times 10^8$  UFP/mL, 82.65% de recuperación). Lo cual sugiere que, en el bacteriófago *H33IIK de Klebsiella*, el medio orgánico ofrece una ligera ventaja frente al daño por congelación. Este comportamiento está asociado a las proteínas y péptidos presentes en el Caldo TSB, que actúan como estabilizantes estructurales.

Respecto al efecto de los crioprotectores, se evidenció que en Caldo TSB, tanto el glicerol al 30% ( $2.04 \times 10^8$  UFP/mL) como el DMSO al 10% ( $2.34 \times 10^8$  UFP/mL) mantuvieron altas tasas de recuperación del bacteriófago (83.29% de recuperación y 83.89% de recuperación, respectivamente); mientras que en buffer SM, el glicerol al 30% mostró

una ligera disminución en la concentración fágica ( $1.29 \times 10^8$  UFP/mL, 81.28% de recuperación) y el DMSO al 10% presentó una marcada disminución en la concentración fágica ( $1.39 \times 10^7$  UFP/mL, 71.6% de recuperación). Este comportamiento indica que, en el fago *H33IIK de Klebsiella*, la interacción entre la solución de suspensión y el crioprotector es crítica. Esto concuerda con Xiao et al. (2022), quienes reportaron que el efecto del DMSO al 10% varía dependiendo de la solución de suspensión. Asimismo, Selcuk et al. (2024) señalaron que la eficacia del crioprotector depende del tipo de fago. Por otro lado, Huang et al. (2025) indicaron que, a  $-80^\circ\text{C}$ , la estabilidad suele ser elevada independientemente del medio, siempre que se minimice la formación de hielo mediante congelación rápida, lo cual es consistente en comparación con la recuperación observada a  $-20^\circ\text{C}$  para este fago (Figura 17).

**Figura 17**

*Curva de estabilidad del bacteriófago H33IIK de Klebsiella, en Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814, a  $-80^\circ\text{C}$*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 08.

### **3.4 Análisis de la evaluación de estabilidad del bacteriófago *H33IIK de Klebsiella***

El bacteriófago *H33IIK de Klebsiella* mostró una estabilidad moderada pero irregular. A temperatura ambiente, registró una tasa de recuperación promedio del 66.25%. Sin embargo, su comportamiento más notable ocurrió a -20°C, donde la recuperación descendió a un 59.51%, siendo este su punto de menor estabilidad debido al daño por cristalización en medios sin protección. Al igual que las otras cepas, su rendimiento óptimo se alcanzó bajo condiciones de ultra congelación a -80°C, logrando estabilizarse con una tasa de recuperación del 81.25% (Tabla 05).

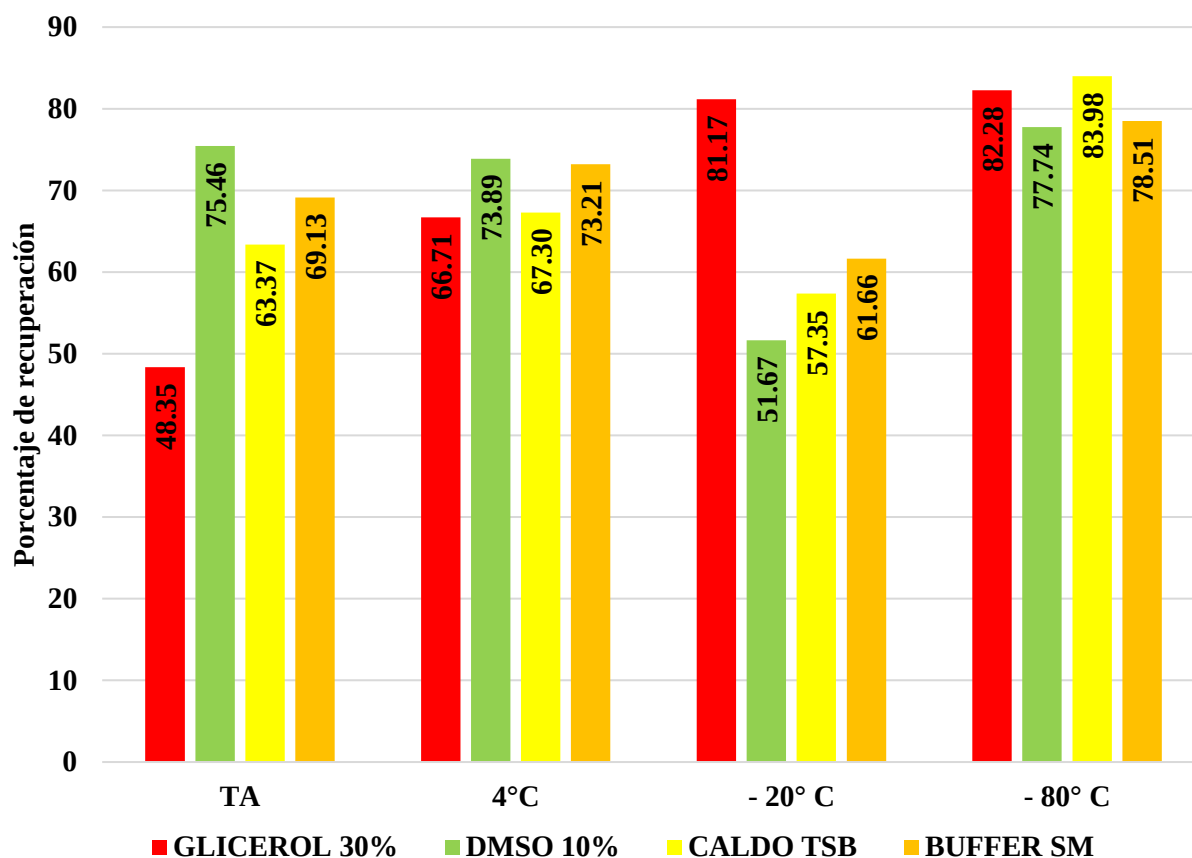
**Tabla 05**

*Promedio porcentual de la tasa de recuperación del bacteriófago H33IIK de Klebsiella bajo diferentes condiciones de preservación*

|                                |                | BACTERIOFAGO H33IIK             |                                     |                           |                                |          |
|--------------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------|
| T°                             | SOLUCION       | TASA DE RECUPERACION AL DIA 135 | PROMEDIO PORCENTUAL DE RECUPERACIÓN | PROMEDIO ENTRE SOLUCIONES | PROMEDIO ENTRE CRIOPROTECTORES |          |
|                                |                |                                 |                                     |                           | GLICEROL 30%                   | DMSO 10% |
| TA                             | TSB            | 75.61%                          | 66.25%                              | 63.37%                    | 48.35%                         | 75.46%   |
|                                | TSB + GLICEROI | 35.95%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 78.54%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM             | 74.26%                          |                                     | 69.13%                    |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 60.75%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 72.37%                          |                                     |                           |                                |          |
| 4°C                            | TSB            | 74.55%                          | 70.26%                              | 67.30%                    | 66.71%                         | 73.89%   |
|                                | TSB + GLICEROI | 55.35%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 72.01%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM             | 65.79%                          |                                     | 73.21%                    |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 78.07%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 75.77%                          |                                     |                           |                                |          |
| - 20° C                        | TSB            | 46.40%                          | 59.51%                              | 57.35%                    | 81.17%                         | 51.67%   |
|                                | TSB + GLICEROI | 77.88%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 47.77%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM             | 44.97%                          |                                     | 61.66%                    |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 84.45%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 55.56%                          |                                     |                           |                                |          |
| - 80° C                        | TSB            | 84.75%                          | 81.24%                              | 83.98%                    | 82.28%                         | 77.74%   |
|                                | TSB + GLICEROI | 83.29%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 83.89%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM             | 82.65%                          |                                     | 78.51%                    |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 81.28%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 71.60%                          |                                     |                           |                                |          |
| PROMEDIO DE RECUPERACIÓN TOTAL |                |                                 | 69.31%                              |                           |                                |          |

**Figura 18**

*Análisis del bacteriófago H33IIK de Klebsiella bajo diferentes condiciones de preservación*



### 3.5 Estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella en Salmonella enterica

La cepa de *Salmonella enterica*, se utilizó como hospedero del bacteriófago H93S de *Salmonella*. el cual fue almacenado a una concentración inicial de  $1.92 \times 10^8$  UFP/mL, mostró un comportamiento más estable a diferencia de los otros bacteriófagos evaluados (Tabla 06).

**Tabla 06**

*Estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella, en Salmonella enterica, evaluado bajo diferentes condiciones de preservación.*

| T°      | SOLUCIONES     | TIEMPO (DIAS)        |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      |                      | TASA DE RECUPERACIÓN AL DIA 135 (%) |
|---------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------------|
|         |                | 0                    | 15                   | 30                   | 45                   | 60                   | 75                   | 90                   | 105                  | 120                  | 135                  |                                     |
| TA      | TSB            | 1.92×10 <sup>8</sup> | 9.45×10 <sup>7</sup> | 7.67×10 <sup>7</sup> | 6.90×10 <sup>7</sup> | 6.10×10 <sup>7</sup> | 5.73×10 <sup>7</sup> | 5.10×10 <sup>7</sup> | 4.63×10 <sup>7</sup> | 3.87×10 <sup>7</sup> | 3.33×10 <sup>7</sup> | 90.82%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 1.92×10 <sup>8</sup> | 9.60×10 <sup>7</sup> | 7.97×10 <sup>7</sup> | 6.70×10 <sup>7</sup> | 5.75×10 <sup>7</sup> | 5.30×10 <sup>7</sup> | 4.70×10 <sup>7</sup> | 3.97×10 <sup>7</sup> | 3.20×10 <sup>7</sup> | 2.70×10 <sup>7</sup> | 89.73%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.38×10 <sup>8</sup> | 1.32×10 <sup>8</sup> | 1.28×10 <sup>8</sup> | 1.22×10 <sup>8</sup> | 1.19×10 <sup>8</sup> | 1.15×10 <sup>8</sup> | 1.11×10 <sup>8</sup> | 1.07×10 <sup>8</sup> | 1.03×10 <sup>8</sup> | 96.74%                              |
|         | SM             | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.39×10 <sup>8</sup> | 1.21×10 <sup>8</sup> | 1.18×10 <sup>8</sup> | 1.13×10 <sup>8</sup> | 1.08×10 <sup>8</sup> | 1.04×10 <sup>8</sup> | 1.01×10 <sup>8</sup> | 9.90×10 <sup>7</sup> | 9.43×10 <sup>7</sup> | 96.26%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.02×10 <sup>8</sup> | 9.87×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>7</sup> | 8.40×10 <sup>7</sup> | 7.80×10 <sup>7</sup> | 6.80×10 <sup>7</sup> | 5.70×10 <sup>7</sup> | 4.90×10 <sup>7</sup> | 3.30×10 <sup>7</sup> | 90.82%                              |
|         | SM Y DMSO      | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.09×10 <sup>8</sup> | 9.47×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>7</sup> | 8.50×10 <sup>7</sup> | 7.53×10 <sup>7</sup> | 6.90×10 <sup>7</sup> | 6.53×10 <sup>7</sup> | 6.00×10 <sup>7</sup> | 5.67×10 <sup>7</sup> | 93.60%                              |
| 4°C     | TSB            | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.36×10 <sup>8</sup> | 1.12×10 <sup>8</sup> | 9.90×10 <sup>7</sup> | 8.70×10 <sup>7</sup> | 7.93×10 <sup>7</sup> | 7.10×10 <sup>7</sup> | 6.63×10 <sup>7</sup> | 5.80×10 <sup>7</sup> | 5.20×10 <sup>7</sup> | 93.24%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.31×10 <sup>8</sup> | 1.21×10 <sup>8</sup> | 1.08×10 <sup>8</sup> | 9.75×10 <sup>7</sup> | 9.30×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>7</sup> | 8.33×10 <sup>7</sup> | 8.00×10 <sup>7</sup> | 7.70×10 <sup>7</sup> | 95.29%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.25×10 <sup>8</sup> | 1.01×10 <sup>8</sup> | 9.75×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>7</sup> | 8.33×10 <sup>7</sup> | 7.70×10 <sup>7</sup> | 6.97×10 <sup>7</sup> | 6.10×10 <sup>7</sup> | 5.33×10 <sup>7</sup> | 93.36%                              |
|         | SM             | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.23×10 <sup>8</sup> | 1.19×10 <sup>8</sup> | 1.01×10 <sup>8</sup> | 9.70×10 <sup>7</sup> | 9.17×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>7</sup> | 8.47×10 <sup>7</sup> | 7.90×10 <sup>7</sup> | 7.57×10 <sup>7</sup> | 95.17%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.34×10 <sup>8</sup> | 1.21×10 <sup>8</sup> | 1.06×10 <sup>8</sup> | 9.80×10 <sup>7</sup> | 9.67×10 <sup>7</sup> | 9.20×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>7</sup> | 8.50×10 <sup>7</sup> | 8.13×10 <sup>7</sup> | 95.53%                              |
|         | SM Y DMSO      | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.14×10 <sup>8</sup> | 9.97×10 <sup>7</sup> | 9.20×10 <sup>7</sup> | 8.75×10 <sup>7</sup> | 8.27×10 <sup>7</sup> | 7.90×10 <sup>7</sup> | 7.20×10 <sup>7</sup> | 6.50×10 <sup>7</sup> | 5.93×10 <sup>7</sup> | 93.84%                              |
| - 20° C | TSB            | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.10×10 <sup>8</sup> | 9.43×10 <sup>7</sup> | 8.90×10 <sup>7</sup> | 7.34×10 <sup>7</sup> | 7.03×10 <sup>7</sup> | 6.40×10 <sup>7</sup> | 5.10×10 <sup>7</sup> | 4.30×10 <sup>7</sup> | 3.77×10 <sup>7</sup> | 91.55%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.11×10 <sup>8</sup> | 9.97×10 <sup>7</sup> | 9.30×10 <sup>7</sup> | 8.75×10 <sup>7</sup> | 8.30×10 <sup>7</sup> | 7.30×10 <sup>7</sup> | 6.53×10 <sup>7</sup> | 5.40×10 <sup>7</sup> | 4.47×10 <sup>7</sup> | 92.39%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.01×10 <sup>8</sup> | 9.23×10 <sup>7</sup> | 8.70×10 <sup>7</sup> | 7.21×10 <sup>7</sup> | 6.37×10 <sup>7</sup> | 5.20×10 <sup>7</sup> | 4.43×10 <sup>7</sup> | 3.80×10 <sup>7</sup> | 2.47×10 <sup>7</sup> | 89.25%                              |
|         | SM             | 1.92×10 <sup>8</sup> | 9.40×10 <sup>7</sup> | 8.61×10 <sup>7</sup> | 8.01×10 <sup>7</sup> | 7.60×10 <sup>7</sup> | 6.33×10 <sup>7</sup> | 4.30×10 <sup>7</sup> | 4.10×10 <sup>7</sup> | 3.50×10 <sup>7</sup> | 2.87×10 <sup>7</sup> | 90.10%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 1.92×10 <sup>8</sup> | 8.37×10 <sup>7</sup> | 7.60×10 <sup>7</sup> | 6.50×10 <sup>7</sup> | 5.95×10 <sup>7</sup> | 5.27×10 <sup>7</sup> | 4.90×10 <sup>7</sup> | 4.80×10 <sup>7</sup> | 4.75×10 <sup>7</sup> | 4.40×10 <sup>7</sup> | 92.27%                              |
|         | SM Y DMSO      | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.13×10 <sup>8</sup> | 7.17×10 <sup>7</sup> | 6.70×10 <sup>7</sup> | 5.30×10 <sup>7</sup> | 4.83×10 <sup>7</sup> | 4.13×10 <sup>7</sup> | 3.70×10 <sup>7</sup> | 2.50×10 <sup>7</sup> | 1.47×10 <sup>7</sup> | 86.59%                              |
| - 80° C | TSB            | 1.92×10 <sup>8</sup> | 2.13×10 <sup>8</sup> | 1.08×10 <sup>8</sup> | 9.80×10 <sup>7</sup> | 9.33×10 <sup>7</sup> | 8.68×10 <sup>7</sup> | 7.90×10 <sup>7</sup> | 7.40×10 <sup>7</sup> | 7.13×10 <sup>7</sup> | 6.80×10 <sup>7</sup> | 94.57%                              |
|         | TSB Y GLICEROL | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.60×10 <sup>8</sup> | 8.43×10 <sup>7</sup> | 7.60×10 <sup>7</sup> | 6.15×10 <sup>7</sup> | 4.90×10 <sup>7</sup> | 4.32×10 <sup>7</sup> | 4.03×10 <sup>7</sup> | 3.80×10 <sup>7</sup> | 3.37×10 <sup>7</sup> | 90.94%                              |
|         | TSB Y DMSO     | 1.92×10 <sup>8</sup> | 8.63×10 <sup>7</sup> | 7.70×10 <sup>7</sup> | 7.20×10 <sup>7</sup> | 6.70×10 <sup>7</sup> | 5.60×10 <sup>7</sup> | 4.20×10 <sup>7</sup> | 3.77×10 <sup>7</sup> | 1.90×10 <sup>7</sup> | 1.00×10 <sup>7</sup> | 84.54%                              |
|         | SM             | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.08×10 <sup>8</sup> | 8.23×10 <sup>7</sup> | 7.10×10 <sup>7</sup> | 6.60×10 <sup>7</sup> | 5.20×10 <sup>7</sup> | 4.65×10 <sup>7</sup> | 4.10×10 <sup>7</sup> | 3.70×10 <sup>7</sup> | 2.60×10 <sup>7</sup> | 89.49%                              |
|         | SM Y GLICEROL  | 1.92×10 <sup>8</sup> | 8.57×10 <sup>7</sup> | 7.97×10 <sup>7</sup> | 7.40×10 <sup>7</sup> | 6.97×10 <sup>7</sup> | 6.03×10 <sup>7</sup> | 5.80×10 <sup>7</sup> | 4.73×10 <sup>7</sup> | 4.01×10 <sup>7</sup> | 3.53×10 <sup>7</sup> | 91.18%                              |
|         | SM Y DMSO      | 1.92×10 <sup>8</sup> | 1.03×10 <sup>8</sup> | 8.67×10 <sup>7</sup> | 7.90×10 <sup>7</sup> | 7.45×10 <sup>7</sup> | 6.70×10 <sup>7</sup> | 5.90×10 <sup>7</sup> | 4.83×10 <sup>7</sup> | 3.50×10 <sup>7</sup> | 2.10×10 <sup>7</sup> | 88.41%                              |

Nota: TA: temperatura ambiente; TSB: Caldo Tripticasa de Soja; SM: buffer SM; DMSO: dimetilsulfóxido.

\*Se realizó las evaluaciones por triplicado, el resultado se expresó en promedio.

\*Los valores obtenidos se expresan en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL).

A temperatura ambiente (TA), se observaron reducciones mínimas en la estabilidad fágica bajo las condiciones evaluadas. En Caldo TSB, la tasa de recuperación fágica fue de 90.82% de recuperación, con una concentración final de  $3.33 \times 10^7$  UFP/mL; mientras que en el buffer SM presentó una mejoría en la tasa de recuperación fágica (96.26% de recuperación), ya que mantuvo una concentración final de  $9.43 \times 10^7$  UFP/mL. Esto confirma que el buffer SM presenta mayor estabilidad para la preservación del bacteriófago *H93S de Salmonella*. Esto concuerda con Phuong et al. (2022), quienes evaluaron fagos de *Salmonella spp.* y determinaron que el buffer SM es más estable, incluso sin la adición de glicerol al 50% y DMSO al 5%, ya que, en dicha investigación, mantuvieron un alto porcentaje de recuperación fágica (90.1% de recuperación). Esta tendencia confirma el efecto positivo del buffer SM gracias a la composición iónica en su formulación, especialmente el  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , los cuales contribuyen a la estabilidad de la cápside viral y a la preservación de la infectividad. Por otro lado, el Caldo TSB a pesar de su riqueza nutricional, evidenció mayor susceptibilidad a la pérdida de viabilidad fágica, promoviendo fenómenos como la agregación proteica y degradación de peptonas (Selcuk et al., 2024), lo cual compromete la integridad estructural del virión.

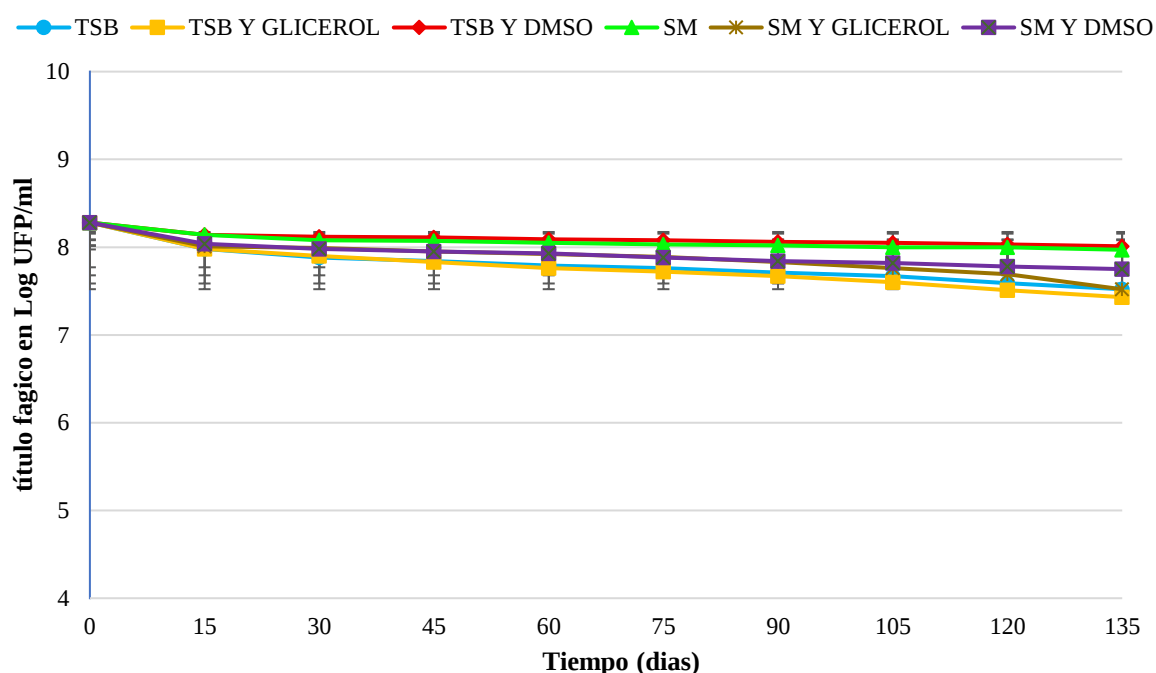
Respecto a la adición de crioprotectores, el DMSO al 10% evidenció una ligera mejora en la estabilidad fágica, alcanzando concentraciones finales de  $1.03 \times 10^8$  UFP/mL (96.74% de recuperación) en Caldo TSB y  $5.67 \times 10^7$  UFP/mL (93.60% de recuperación) en el buffer SM. Por su parte, el glicerol al 30% mostró un comportamiento relativamente consistente, pero ligeramente inferior al del DMSO, ya que presentó concentraciones finales de  $2.70 \times 10^7$  UFP/mL (89.73% de recuperación) en Caldo TSB y de  $3.30 \times 10^7$  UFP/mL (90.82% de recuperación) en el buffer SM. Estos resultados sugieren que el efecto protector del glicerol es limitado a temperatura ambiente. En contraste, Phuong et al. (2022) documentaron que el buffer SM suplementado con glicerol al 50% permitió

mantener altos porcentajes de recuperación fágica (89.4% de recuperación), mientras que el DMSO al 5% mantuvo un porcentaje de recuperación menor (88.2% de recuperación), incluso a temperatura ambiente. Sin embargo, es importante mencionar que en el estudio de Phuong et al. (2022) se utilizó una concentración más alta de glicerol al 50% y una concentración menor de DMSO al 5%, lo que podría explicar la diferencia con los resultados de nuestra investigación, en la que el glicerol al 30% mostró un desempeño inferior al de DMSO al 10%. De manera complementaria, Selcuk et al. (2024) señalaron que el glicerol puede resultar desfavorable en condiciones de temperatura no óptimas, debido a fenómenos de agregación de proteínas inducidos por la viscosidad del medio. Asimismo, Xiao et al. (2022) y Xu et al. (2023) coinciden en que la eficacia del glicerol es altamente dependiente de la temperatura, siendo ineficaz o incluso perjudicial fuera de condiciones de congelación. Así mismo, confirmaron que la estabilidad fágica depende de las características estructurales del fago (Figura 19).

Estas diferencias evidencian que la eficacia del crioprotector es altamente dependiente de su concentración, el tipo de fago y la solución de almacenamiento. En este sentido, se confirmó que la elección del crioprotector influye significativamente en la viabilidad fágica.

**Figura 19**

*Curva de estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella, en Salmonella enterica, a temperatura ambiente*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 11.

A 4 °C, fago *H93S de Salmonella* evidenció una tasa de recuperación fágica alta y constante (93.24-95.53%), con reducciones menores a 1 log respecto a su concentración inicial ( $1.92 \times 10^8$  UFP/mL). Este comportamiento evidencia una alta resistencia estructural, incluso en ausencia de crioprotectores.

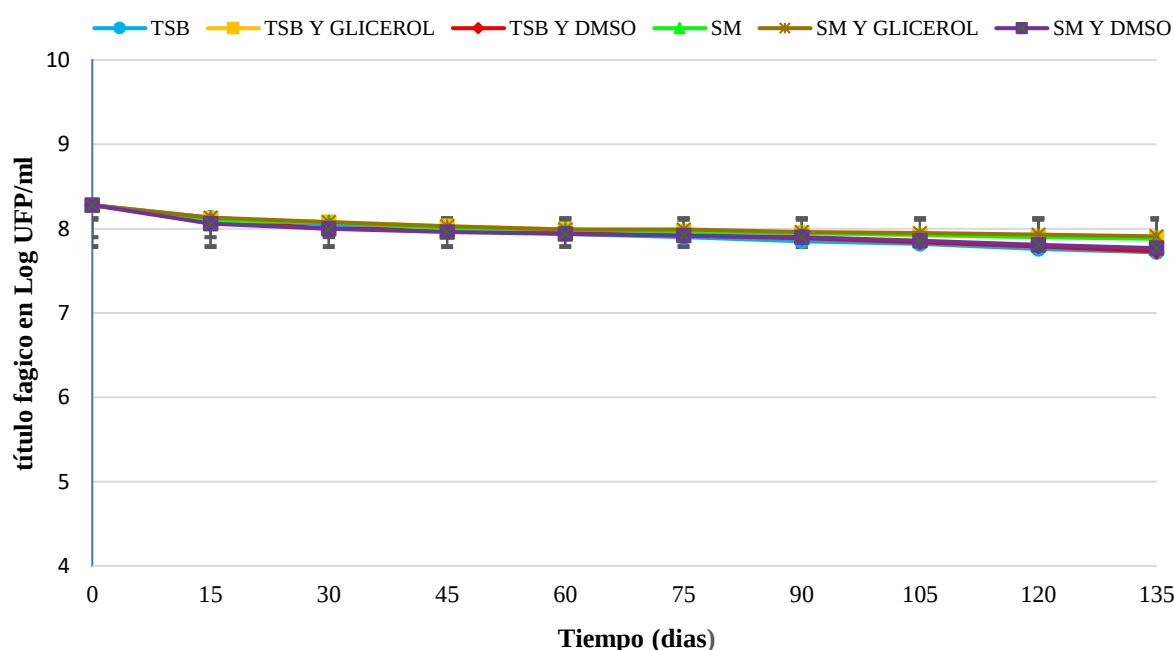
En cuanto a la solución de suspensión, el buffer SM evidenció mejor desempeño, manteniendo concentraciones fágicas cercanas al valor inicial ( $7.57 \times 10^7$  UFP/mL), mientras que el Caldo TSB presentó reducciones ligeramente mayores ( $5.20 \times 10^7$  UFP/mL). Este resultado refuerza el papel estabilizador del buffer SM y coincide con Huang et al. (2025) y Phuong et al. (2022), quienes reportaron altas tasas de recuperación en buffer SM.

Respecto al uso de crioprotectores, el glicerol al 30% presentó un desempeño superior, manteniendo las concentraciones finales en  $7.70 \times 10^7$  UFP/mL (95.29% de recuperación)

en Caldo TSB y  $8.13 \times 10^7$  UFP/mL (95.53% de recuperación) en buffer SM; mientras que el DMSO al 10% evidenció concentraciones ligeramente menores, con concentraciones finales de  $5.33 \times 10^7$  UFP/mL (93.36% de recuperación) en Caldo TSB y  $5.93 \times 10^7$  UFP/mL (93.84% de recuperación) en buffer SM. El glicerol al 30% permitió conservar concentraciones más altas y con menor variabilidad a diferencia del DMSO al 10%, lo que sugiere una mayor compatibilidad con la estructura del fago. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Phuong et al. (2022), quienes demostraron que el almacenamiento a 4°C en buffer SM suplementado con glicerol al 50% mantiene altas tasas de recuperación fágica (89.4% de recuperación) a diferencia del DMSO al 5% (88% de recuperación) y el buffer SM sin crioprotector (88.9% de recuperación). De manera similar, Xiao et al. (2022) reportaron que el glicerol al 30% favorece la recuperación fágica a 4 °C en comparación con el DMSO al 10%, reforzando la tendencia observada en el presente estudio (Figura 20).

**Figura 20**

*Curva de estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella, en Salmonella enterica, a 4°C*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 11.

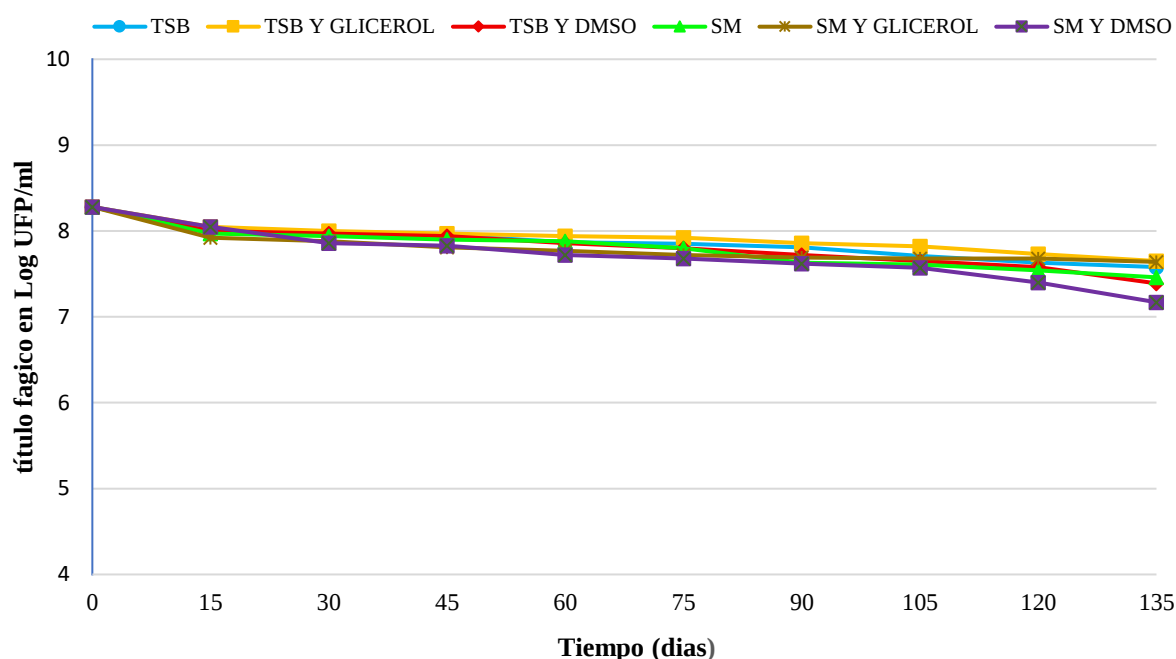
A  $-20^{\circ}\text{C}$ , el fago *H93S de Salmonella* mostró una ligera disminución en la tasa de recuperación fágica (86.59-92.39% de recuperación), evidenciando una alta resistencia estructural del virión frente al estrés por congelación.

En cuanto a las soluciones de suspensión, no se evidenciaron diferencias marcadas entre el Caldo TSB ( $3.77 \times 10^7$  UFP/mL; 91.55%) y el buffer SM ( $2.87 \times 10^7$  UFP/mL; 90.10%), sin crioprotectores. Este comportamiento coincide con Cieřlik et al. (2022) y Bagińska et al. (2024), quienes reportaron que algunos fagos pueden mantenerse estables a temperaturas de congelación incluso sin crioprotectores, con pérdidas mínimas del título. Respecto a los crioprotectores, se evidenció una ligera superioridad del glicerol al 30% tanto en Caldo TSB ( $4.47 \times 10^7$  UFP/mL; 92.39%) como en buffer SM ( $4.40 \times 10^7$  UFP/mL; 92.27%); mientras que el DMSO al 10% mostró un menor rendimiento, con valores de  $2.47 \times 10^7$  UFP/mL en Caldo TSB (89.25%) y  $1.47 \times 10^7$  UFP/mL en buffer SM (86.59%). Este comportamiento coincide con Xiao et al. (2022), quienes reportaron que el glicerol al 30% es más efectivo que el DMSO al 10% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y con Phuong et al. (2022), quienes, para fagos de *Salmonella spp.*, observaron que el buffer SM requiere necesariamente la adición de glicerol al 50%, para evitar pérdidas significativas. Asimismo, Xu et al. (2023) señalaron que la eficacia de los crioprotectores depende del tipo de fago.

A diferencia del fago *H33IIK de Klebsiella*, donde el crioprotector es determinante para evitar la inactivación, en el fago *H93S de Salmonella* el crioprotector presenta más un efecto modular, ya que su alta estabilidad está relacionada a las características propias del fago (Figura 21).

**Figura 21**

*Curva de estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella, en Salmonella enterica, a -20°C*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 11.

A  $-80^{\circ}\text{C}$ , se observó una ligera reducción en la tasa de recuperación fágica (84.54-94.57%). En cuanto a las soluciones de suspensión, el Caldo TSB mostró un mejor desempeño ( $6.80 \times 10^7$  UFP/mL, 94.57% de recuperación) en comparación con el buffer SM ( $2.60 \times 10^7$  UFP/mL, 89.49% de recuperación), lo que sugiere un efecto protector del medio nutricional. Sin embargo, al incorporar crioprotectores, se evidenció una mejor respuesta del buffer SM sobre el Caldo TSB.

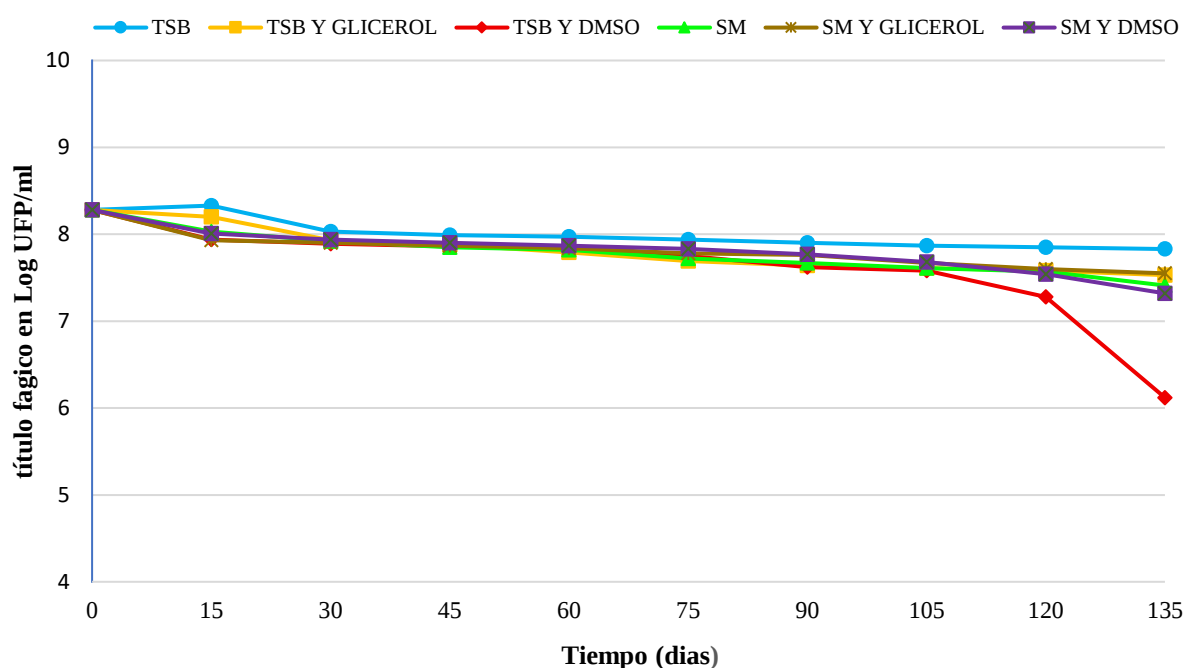
El glicerol al 30% mostró un efecto ligeramente positivo tanto en Caldo TSB ( $3.37 \times 10^7$  UFP/mL) como en el buffer SM ( $3.53 \times 10^7$  UFP/mL); mientras que la adición de DMSO al 10% mostró una notable disminución en la concentración fágica en Caldo TSB ( $1.00 \times 10^7$  UFP/mL) y buffer SM ( $2.10 \times 10^7$  UFP/mL). Este comportamiento contrasta con lo reportado por Xu et al. (2023), quienes observaron una mayor eficacia del DMSO a

-80 °C, lo que refuerza la idea de que la respuesta del crioprotector depende del tipo de fago.

En general, no se evidenció que el fago *H93S de Salmonella* presente una baja dependencia tanto del medio de suspensión como de los crioprotectores. Este comportamiento coincide con Bagińska et al. (2024) y Cieślik et al. (2022), quienes reportaron fagos con alta estabilidad a temperaturas de congelación profunda, incluso sin crioprotección (Figura 22).

**Figura 22**

*Curva de estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella, en Salmonella enterica, a -80°C*



*Nota:* Los resultados del gráfico se expresan en base al Anexo 11.

### 3.6 Análisis de la evaluación de estabilidad del bacteriófago *H93S de Salmonella*

El bacteriófago *H93S de Salmonella* mantuvo tasas de recuperación consistentemente altas. A temperatura ambiente mantuvo una tasa de recuperación promedio de 93%, en 4°C la tasa de recuperación promedio fue de 94.40%, en -20°C y -80°C se evidenció una

tasa de recuperación promedio de 90.36% y 89.86%, respectivamente. Este comportamiento sugiere que el bacteriófago *H93S de Salmonella* presenta una estructura viral altamente estable (Tabla 07).

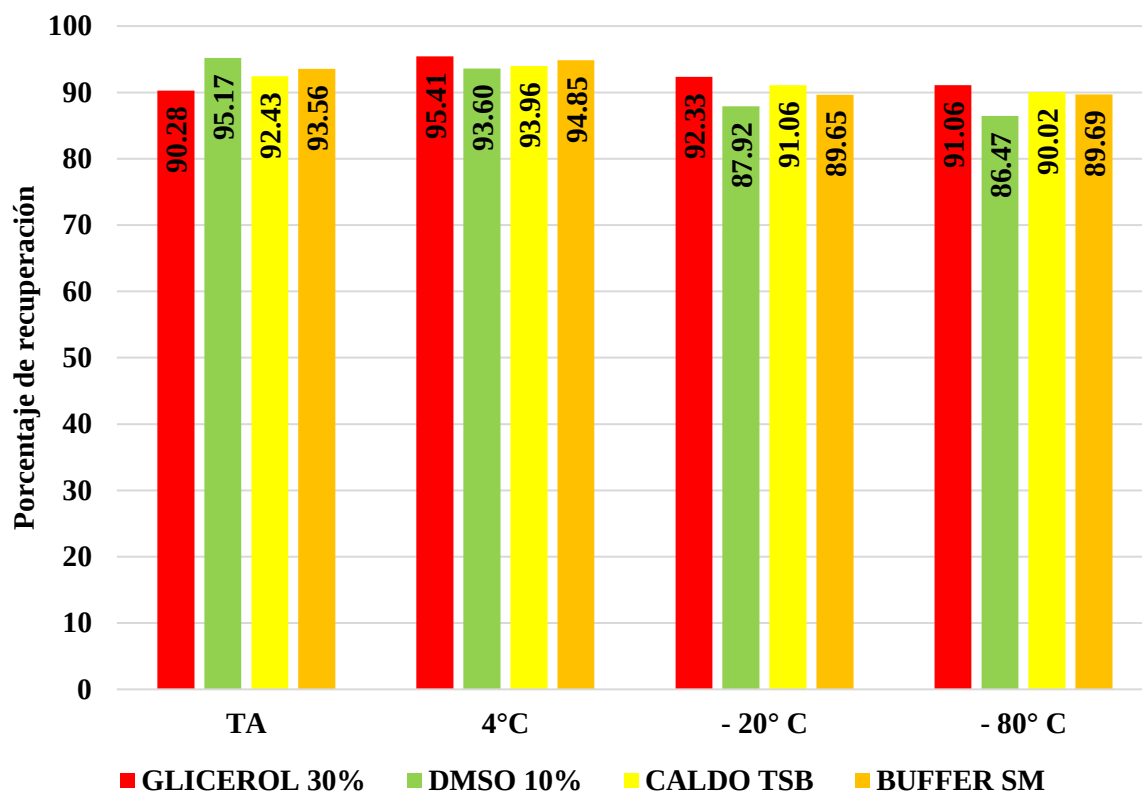
**Tabla 07**

*Promedio porcentual de la tasa de recuperación del bacteriófago H93S de Salmonella bajo diferentes condiciones de preservación*

|                                |                | BACTERIOFAGO H93S               |                                     |                           |                                |          |
|--------------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|----------|
| T°                             | SOLUCION       | TASA DE RECUPERACION AL DIA 135 | PROMEDIO PORCENTUAL DE RECUPERACIÓN | PROMEDIO ENTRE SOLUCIONES | PROMEDIO ENTRE CRIOPROTECTORES |          |
|                                |                |                                 |                                     |                           | GLICEROL 30%                   | DMSO 10% |
| TA                             | TSB            | 90.82%                          | 93.00%                              | 92.43%                    | 90.28%                         | 95.17%   |
|                                | TSB + GLICEROL | 89.73%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 96.74%                          |                                     | 93.56%                    |                                |          |
|                                | SM             | 96.26%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 90.82%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 93.60%                          |                                     |                           |                                |          |
| 4°C                            | TSB            | 93.24%                          | 94.40%                              | 93.96%                    | 95.41%                         | 93.60%   |
|                                | TSB + GLICEROL | 95.29%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 93.36%                          |                                     | 94.85%                    |                                |          |
|                                | SM             | 95.17%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 95.53%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 93.84%                          |                                     |                           |                                |          |
| - 20° C                        | TSB            | 91.55%                          | 90.36%                              | 91.06%                    | 92.33%                         | 87.92%   |
|                                | TSB + GLICEROL | 92.39%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 89.25%                          |                                     | 89.65%                    |                                |          |
|                                | SM             | 90.10%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 92.27%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 86.59%                          |                                     |                           |                                |          |
| - 80° C                        | TSB            | 94.57%                          | 89.86%                              | 90.02%                    | 91.06%                         | 86.47%   |
|                                | TSB + GLICEROL | 90.94%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | TSB + DMSO     | 84.54%                          |                                     | 89.69%                    |                                |          |
|                                | SM             | 89.49%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + GLICEROL  | 91.18%                          |                                     |                           |                                |          |
|                                | SM + DMSO      | 88.41%                          |                                     |                           |                                |          |
| PROMEDIO DE RECUPERACIÓN TOTAL |                |                                 | 91.90%                              |                           |                                |          |

**Figura 23**

*Análisis del bacteriófago H33IIK de Klebsiella bajo diferentes condiciones de preservación*



## CONCLUSION

1. La estabilidad de los bacteriófagos *HEc4I* de *Escherichia* en *Escherichia coli* NCTC 13476, *H33IIK* de *Klebsiella* en *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 2814 y *H93S* de *Salmonella* en *Salmonella enterica* bajo diferentes condiciones de preservación, dependió de la interacción entre la temperatura, la solución de suspensión y los crioprotectores durante los 135 días de almacenamiento. La tasa de recuperación de los bacteriófagos *HEc4I* de *Escherichia*, *H33IIK* de *Klebsiella* y *H93S* de *Salmonella* fue de 73.31%, 69.75% y 91.90% respectivamente. A temperatura de -80°C los bacteriófagos *HEc4I* de *Escherichia* y *H33IIK* de *Klebsiella* presentaron una tasa de recuperación optima de 87.57 y 81.25% respectivamente, y a 4°C el bacteriófago *H93S* de *Salmonella* presento una tasa de recuperación optima de 94.40%
2. El bacteriófago *HEc4I* de *Escherichia* ( $3,10 \times 10^9$  UFP/mL), presentó una tasa de recuperación promedio a **temperatura ambiente** de 53.07%, en Caldo TSB 54.77%, Buffer SM 51.37%, en DMSO al 10% fue 80.80% y en Glicerol al 30% se inactivó. A 4°C la tasa de recuperación promedio fue 71.23%, en DMSO al 10% fue 83.00%, Buffer SM 87.67%, Caldo TSB 54.80% y Glicerol al 30% fue 42.75%. A -20°C la tasa de recuperación fue 81,38%, en Caldo TSB 81.53%, en Buffer SM 81.23%, en glicerol al 30% fue 82,35% y en DMSO al 10% fue 78,50%. A -80°C la tasa de recuperación promedio fue 87.57%, en buffer SM 87.63%, en Caldo TSB 87.50%, en DMSO al 10% fue 88.15% y en glicerol al 30% fue 87.25%.
3. El bacteriófago *H33IIK* de *Klebsiella* ( $9.50 \times 10^9$  UFP/mL), presentó una tasa de recuperación promedio a **temperatura ambiente** de 66.27%; en caldo TSB 63.37%, en buffer SM 69.00%, en DMSO al 10% fue 75.45% y en glicerol al 30% fue 48.40%. A 4 °C, la tasa de recuperación promedio fue 71.95%; en buffer SM 76.57%, en caldo TSB 67.33%, en glicerol al 30% fue 66.75% y en DMSO al 10% fue 73.90%. A -20 °C, la tasa de

recuperación promedio fue 59.53%; en caldo TSB 57.37%, en buffer SM 61.70%, en glicerol al 30% fue 81.20% y en DMSO al 10% fue 51.70%. A **-80 °C**, la tasa de recuperación promedio fue 81.25%; en caldo TSB 84.00%, en buffer SM 78.50%, en glicerol al 30% fue 82.30% y en DMSO al 10% fue 77.75%.

4. El bacteriófago *H93S de Salmonella* ( $1.92 \times 10^8$  UFP/mL), presentó una tasa de recuperación promedio a **temperatura ambiente** de 92.98%; en caldo TSB 92.40%, en buffer SM 93.57%, en DMSO al 10% fue 95.15% y en glicerol al 30% fue 90.25%. A **4 °C**, la tasa de recuperación promedio fue 94.40%; en caldo TSB 93.97%, en buffer SM 94.83%, en DMSO al 10% fue 95.15% y en glicerol al 30% fue 93.60%. A **-20 °C**, la tasa de recuperación promedio fue 90.37%; en caldo TSB 91.07%, en buffer SM de 89.67%, en glicerol al 30% fue 92.35% y en DMSO al 10% de 87.67%. A **-80 °C**, la tasa de recuperación promedio fue 89.95%; en caldo TSB 89.70%, en buffer SM 90.00%, en glicerol al 30% fue 91.05% y en DMSO al 10% fue 86.45%.

## **RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda realizar evaluaciones específicas para cada bacteriófago antes de definir sus condiciones de almacenamiento, debido a la variabilidad en su respuesta.
2. Se recomienda evaluar los crioprotectores a diferentes concentraciones.
3. Se aconseja ampliar el periodo de evaluación para la estabilidad de los bacteriófagos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña, W., & Peceros, B. (2024). Determinación de la actividad lítica de bacteriófagos obtenidos de aguas de la cuenca del río Huatanay contra cepas de *Escherichia coli* multidrogo resistentes. <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/10457>
- Aguilar, E., Marin, M., Nuñez, D., Espinoza, A., Ramirez, P., & Mamani, E. (2026). Isolation and Characterization of a *Klebsiella Phage H33IIK* Targeting Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Peru. *Antibiotics*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics15040365>
- Ajmera, A., & Shabbir, N. (2025). Salmonella. En StatPearls. StatPearls Publishing. (Salmonella). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>
- Alvi, I., Asif, M., Tabassum, R., Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). Storage of Bacteriophages at 4°C Leads to no Loss in Their Titer after One Year. *Pakistan journal of zoology*, 50. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2018.50.6.sc8>
- Ayala, R., Moiseenko, A. V., Chen, T.-H., Kulikov, E. E., Golomidova, A. K., Orekhov, P. S., Street, M. A., Sokolova, O. S., Letarov, A. V., & Wolf, M. (2023). Nearly complete structure of bacteriophage DT57C reveals architecture of head-to-tail interface and lateral tail fibers. *Nature Communications*, 14(1), 8205. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43824-9>
- Bagińska, N., Grygiel, I., Orwat, F., Harhala, M. A., Jędrusiak, A., Gębarowska, E., Letkiewicz, S., Górski, A., & Jończyk-Matysiak, E. (2024). Stability study in selected conditions and biofilm-reducing activity of phages active against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 14(1), 4285. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54469-z>

- Baqer, A. A., Fang, K., Mohd-Assaad, N., Adnan, S. N. A., & Nor, N. S. M. (2023). In Vitro Activity, Stability and Molecular Characterization of Eight Potent Bacteriophages Infecting Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Viruses*, 15(1).  
<https://doi.org/10.3390/v15010117>
- Barzegar, F., Razavi, S. H., Salehian, R., Akbari, N., Esmaeili, N., & Amini Valashani, A. (2026). Novel insights into phage-based films and coatings: Innovative solutions for active food packaging systems. *Journal of Stored Products Research*, 115, 102855.  
<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102855>
- Blas, S. I. (2023). Encapsulación de fagos en perlas de alginato para el delivery de fagoterapia en acuicultura contra vibrios.  
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/194462>
- Blasco, L., Bleriot, I., Fernández-Grela, P., Paño-Pardo, J. R., Oteo-Iglesias, J., & Tomás, M. (2025). Estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de la fagoterapia. *Farmacia Hospitalaria*, 49(6), 407-412. <https://doi.org/10.1016/j.farma.2025.04.003>
- Bolsan, A. C., Sampaio, G. V., Rodrigues, H. C., Silva De Souza, S., Edwiges, T., Celant De Prá, M., & Gabiatti, N. C. (2024). Phage formulations and delivery strategies: Unleashing the potential against antibiotic-resistant bacteria. *Microbiological Research*, 282, 127662. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127662>
- Bruttin, A., & Brüssow, H. (2005). Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally: A Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2874-2878. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005>
- Calancha, Y. E. (2023). Estudio del potencial de bacteriófagos líticos como herramientas de control biológico de *Campylobacter spp.* Resistentes a antibióticos. 11(1), 129.

- Cao, Y., Khanal, D., Kim, J., Chang, R. Y. K., Byun, A. S., Morales, S., Banaszak Holl, M. M., & Chan, H.-K. (2023). Stability of bacteriophages in organic solvents for formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 646, 123505. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123505>
- Chang, T., & Zhao, G. (2021). Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Advanced Science*, 8(6), 2002425. <https://doi.org/10.1002/advs.202002425>
- Choi, D., Ryu, S., & Kong, M. (2025). Phage-derived proteins: Advancing food safety through biocontrol and detection of foodborne pathogens. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 24(2), e70124. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70124>
- Cieřlik, M., Harhala, M., Orwat, F., Dąbrowska, K., Górski, A., & Jończyk-Matysiak, E. (2022). Two Newly Isolated Enterobacter-Specific Bacteriophages: Biological Properties and Stability Studies. *Viruses*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/v14071518>
- Cruz, P., Castiblanco, J., Correa, N. E., & Montoya-Ortíz, G. (2013). Análisis de ácidos nucleicos. En *Autoinmunidad: Del banco a la cama* (Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., p. 760). Prensa Universitaria El Rosario. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459462/figure/analysisofnucleic.f5/>
- Cui, L., Watanabe, S., Miyanaga, K., Kiga, K., Sasahara, T., Aiba, Y., Tan, X.-E., Veerananarayanan, S., Thitiananpakorn, K., Nguyen, H. M., & Wannigama, D. L. (2024). A Comprehensive Review on Phage Therapy and Phage-Based Drug Development. *Antibiotics*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090870>

- Cuyutupa, A. Y. (2022). Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos aislados de intestino de pollos y específicos de *Salmonella Infantis* multidrogo-resistente. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.  
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/18550>
- Dashnau, J. L., Nucci, N. V., Sharp, K. A., & Vanderkooi, J. M. (2006). Hydrogen bonding and the cryoprotective properties of glycerol/water mixtures. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 110(27), 13670-13677. <https://doi.org/10.1021/jp0618680>
- Deng, X., Wang, L., You, X., Dai, P., & Zeng, Y. (2017). Advances in the T7 phage display system (Review). *Molecular Medicine Reports*.  
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7994>
- Ding, J., Yan, W., Zheng, R., Ma, M., & Jiang, L. (2025). Combating *Klebsiella pneumoniae*: From antimicrobial resistance mechanisms to phage-based combination therapies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1691215.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1691215>
- Domínguez, N. (2020). Bacteriófagos. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 20(1), 164-165. <http://dx.doi.org/10.25176/rfmh.v20i1.2554>
- Dong, N., Yang, X., Chan, E. W.-C., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine*, 79, 103998.  
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (2024). European pharmacopoeia phage therapy medicinal products (5.31). *European Pharmacopoeia*.  
<https://doi.org/01/2025:53100>

Faltus, T. (2024). The Medicinal Phage—Regulatory Roadmap for Phage Therapy under EU Pharmaceutical Legislation. *Viruses*, 16(3), Article 3.

<https://doi.org/10.3390/v16030443>

Farooq, T., Hussain, M. D., Shakeel, M. T., Tariqjaveed, M., Aslam, M. N., Naqvi, S. A. H., Amjad, R., Tang, Y., She, X., & He, Z. (2022). Deploying Viruses against Phytobacteria: Potential Use of Phage Cocktails as a Multifaceted Approach to Combat Resistant Bacterial Plant Pathogens. *Viruses*, 14(2), 171.

<https://doi.org/10.3390/v14020171>

Fathima, B., & Archer, A. C. (2021). Bacteriophage therapy: Recent developments and applications of a renaissance weapon. *Research in Microbiology*, 172(6), 103863.

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103863>

Fauconnier, A. (2019). Phage Therapy Regulation: From Night to Dawn. *Viruses*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/v11040352>

Fuentes, M. A., Gil, A. C., Martínez, C. A., Baizabal, V. M., & Valdez, J. J. (2021). El enemigo de mi enemigo es... Un virus que ataca a las bacterias: Los bacteriófagos. *Revista Digital Universitaria*, 22(4).

<https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2021.22.4.1>

Gao, M., Wang, C., Qiang, X., Liu, H., Li, P., Pei, G., Zhang, X., Mi, Z., Huang, Y., Tong, Y., & Bai, C. (2020). Isolation and Characterization of a Novel Bacteriophage Infecting Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Current Microbiology*, 77(5), 722-729. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01849-8>

Garcia, C. (2013). Estructura de fibras de bacteriófagos.

<https://repositorio.uam.es/entities/publication/39c9e4d1-3061-453f-8520-69c4eb2b576f>

Ge, H., Fu, S., Guo, H., Hu, M., Xu, Z., Zhou, X., Chen, X., & Jiao, X. (2022). Application and challenge of bacteriophage in the food protection. *International Journal of Food Microbiology*, 380, 109872. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109872>

Giri, N. (2021). Bacteriophage Structure, Classification, Assembly and Phage Therapy. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(2), 239-250. <https://doi.org/10.13005/bbra/2911>

González, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., Martínez, B., & García, P. (2018). Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products. *PLOS ONE*, 13(10), e0205728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205728>

Gonzalez, M., Araujo, R. S., Ferreira, F., Ayala, S., & Undurraga, E. A. (2025). Prevalence and Distribution of *Salmonella* in Water Bodies in South America: A Systematic Review. *Microorganisms*, 13(3), 489. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13030489>

Guo, N., Wei, Q., & Xu, Y. (2020). Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2(2), 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2020.11.003>

Harper, D. R., Abedon, S. T., Burrowes, B. H., & McConville, M. L. (2021). *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*. Springer International Publishing AG.

- Hernández, A. M., Mendoza-Corvis, F., Salgado, J., Gontijo, M., Batalha, L. S., Perez, G., Sierra, O. P., & Soto Lopez, M. E. (2025). Application of Conservation Strategies for Bacteriophages Used in the Biocontrol of Pathogenic Microorganisms in Food. *Journal of Food Safety*, 45(1), e70014. <https://doi.org/10.1111/jfs.70014>
- Huang, W., Khan Mirzaei, M., & Deng, L. (2025). Comparative evaluation of long-term preservation methods for morphologically distinct bacteriophages. *Microbiology Spectrum*, 13(7), e01442-24. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01442-24>
- Hussain, W., Ullah, M. W., Farooq, U., Aziz, A., & Wang, S. (2021). Bacteriophage-based advanced bacterial detection: Concept, mechanisms, and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 177, 112973. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.112973>
- Jonczyk, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2019). Factors determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 17(8), 583-606. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1646126>
- Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2022). Bacteriophages. En StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>
- Kaur, R., Mandal, D., & Kumar, A. (2023). Phage therapy for *Acinetobacter baumannii* infection. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 200, 303-324. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.04.006>
- Kim, E.-J., Lim, M.-C., Woo, M.-A., Kim, B. S., & Lim, J.-A. (2024). Development of Stabilizing Solution for Long-Term Storage of Bacteriophages at Room Temperature and Application to Control Foodborne Pathogens. *Viruses*, 16(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/v16071155>

- King, A. M. Q., Adams, Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012a). Family—Myoviridae. En Virus Taxonomy (pp. 46-62). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00002-1>
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012b). Familia—Podoviridae. En Virus Taxonomy (pp. 63-85). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00003-3>
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (Eds.). (2012c). Family—Siphoviridae. En Virus Taxonomy (pp. 86-98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00004-5>
- 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>
- Leprince, A., & Mahillon, J. (2023). Phage Adsorption to Gram-Positive Bacteria. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010196>
- Liu, Y., Huang, K., Zhou, Y., Gou, D., & Shi, H. (2021). Hydrogen Bonding and the Structural Properties of Glycerol–Water Mixtures with a Microwave Field: A Molecular Dynamics Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(29), 8099-8106. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.1c03232>
- Lobocka, M. B., Głowacka, A., & Golec, P. (2018). Methods for Bacteriophage Preservation. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1693, 219-230. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_17)

- Luque, P., Álvarez, M. T., Luque Cruz, P., & Álvarez Aliaga, M. T. (2024). Eficacia de los productos bio-basados en fagos en el control de patógenos transmitidos por alimentos. *Revista CON-CIENCIA*, 12(1), 55-75. <https://doi.org/10.53287/xwaj3579ks79e>
- Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G. T., Clokie, M. R. J., Garton, N. J., Stapley, A. G. F., & Kirpichnikova, A. (2017). Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science, Recent nanotechnology and colloid science development for biomedical applications*, 249, 100-133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Mansouri, M., Mobarez, A. M., & Nojoomi, F. (2021). Comprehensive study of common Enterogenic *E. coli* in Iran during 2010–2020: A systematic review. *Gene Reports*, 25, 101316. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101316>
- Marton, H. L., Bhatt, A., Sagona, A. P., Kilbride, P., & Gibson, M. I. (2024). Screening of Hydrophilic Polymers Reveals Broad Activity in Protecting Phages during Cryopreservation. *Biomacromolecules*, 25(1), 413-424. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c01042>
- Mohamed, H. M., Sundar, P., Ridwan, N. A. A., Cheong, A. J., Mohamad Salleh, N. A., Sulaiman, N., Mh Busra, F., & Maarof, M. (2024). Optimisation of cryopreservation conditions, including storage duration and revival methods, for the viability of human primary cells. *BMC Molecular and Cell Biology*, 25(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12860-024-00516-6>
- Nobrega, F. L., Vlot, M., de Jonge, P. A., Dreesens, L. L., Beaumont, H. J. E., Lavigne, R., Dutilh, B. E., & Brouns, S. J. J. (2018). Targeting mechanisms of tailed

- bacteriophages. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 760-773.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0070-8>
- Ochońska, D., & Brzychczy, M. (2024). *Klebsiella pneumoniae* – Taxonomy, Occurrence, Identification, Virulence Factors and Pathogenicity. *Advancements of Microbiology*, 63(3), 157-175. <https://doi.org/10.2478/am-2024-0014>
- Organización Mundial de la Salud. (2025). La OMS advierte de la resistencia generalizada en todo el mundo a antibióticos de uso habitual. <https://www.who.int/es/news/item/13-10-2025-who-warns-of-widespread-resistance-to-common-antibiotics-worldwide>
- Padrón, N. (2023). Bacteriófagos: Aliados contra las superbacterias. <https://doi.org/10.62472>
- Palma, M., & Qi, B. (2024). Advancing Phage Therapy: A Comprehensive Review of the Safety, Efficacy, and Future Prospects for the Targeted Treatment of Bacterial Infections. *Infectious Disease Reports*, 16(6), 1127-1181.  
<https://doi.org/10.3390/idr16060092>
- Phuong, L. N. N., Anh, L. H., Huan, P. K. N., Loc, H. T., Trang, C. T. H., Mo, T. T. H., Xuan, N. H., & Ngu, N. T. (2022). The effect of different media and temperature conditions for *Salmonella* bacteriophage preservation: *Veterinary Integrative Sciences*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.12982/VIS.2022.036>
- Pires, D. P., Costa, A. R., Pinto, G., Meneses, L., & Azeredo, J. (2020). Current challenges and future opportunities of phage therapy. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 684-700. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa017>
- Popoff, M. Y., & Le Minor, L. E. (2015). *Salmonella*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-1). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01166>

- Rahi, P., Rodrigues, C., & Brisse, S. (2024). *Klebsiella*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-23). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01150.pub2>
- Ramos, J., Superio, J., Galindo-Villegas, J., & Acosta, F. (2021). Phage Therapy as a Focused Management Strategy in Aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10436. <https://doi.org/10.3390/ijms221910436>
- Rivera, E. O., Tirko, N. N., & Dudley, E. G. (2025). Regulatory Landscape and the Potential of Bacteriophage Applications in the United States' Food Industry. *Journal of Food Protection*, 88(6), 100510. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2025.100510>
- Rodriguez, A. (2023). Revisión bibliográfica: Aplicaciones de los bacteriófagos como agentes antibacterianos en la industria agroalimentaria. [Universidade da Coruña].  
[https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/33385/RodriguezLamas\\_Alba\\_TFG\\_2023.pdf?sequence=2](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/33385/RodriguezLamas_Alba_TFG_2023.pdf?sequence=2)
- Sahu, S., Garg, A., Saini, R., & Debnath, A. (2024). Interface Water Assists in Dimethyl Sulfoxide Crossing and Poration in Model Bilayer. *Langmuir*, 40(11), 5764-5775.  
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.3c03498>
- Saini, P., Bandsode, V., Singh, A., Mendem, S. K., Semmler, T., Alam, M., & Ahmed, N. (2024). Genomic insights into virulence, antimicrobial resistance, and adaptation acumen of *Escherichia coli* isolated from an urban environment. *mBio*, 15(3), e03545-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.03545-23>
- Scheutz, F., & Strockbine, N. A. (2015). *Escherichia*. En W. B. Whitman (Ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 1-49). Wiley.  
<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01147>

- Selcuk, E., Dokuz, S., & Ozbek, T. (2024). Evaluating the Stability of Lytic and Lysogenic Bacteriophages in Various Protectants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 113(6), 1488-1497. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2024.01.010>
- Serrano, J. M. (2020). Los bacteriófagos como alternativa terapéutica a los antibióticos. <https://idus.us.es/handle/11441/103482>
- Stone, E., Campbell, K., Grant, I., & McAuliffe, O. (2019). Understanding and Exploiting Phage–Host Interactions. *Viruses*, 11(6), 567. <https://doi.org/10.3390/v11060567>
- Turner, D., Adriaenssens, E. M., Amann, R. I., Bardy, P., Bartlau, N., Barylski, J., Błażej, S., Bouzari, M., Briegel, A., Briers, Y., Carrillo, D., Chen, X., Claessen, D., Cook, R., Crisci, M. A., Dechesne, A., Deptula, P., Dutilh, B. E., Ely, B., ... ICTV Taxonomy Summary Consortium. (2025). Summary of taxonomy changes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) from the Bacterial Viruses Subcommittee, 2025. *Journal of General Virology*, 106(7), 002111. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.002111>
- Vázquez, R., Díez-Martínez, R., Domingo-Calap, P., García, P., Gutiérrez, D., Muniesa, M., Ruiz-Ruigómez, M., Sanjuán, R., Tomás, M., Tormo-Mas, M. Á., & García, P. (2022). Essential Topics for the Regulatory Consideration of Phages as Clinically Valuable Therapeutic Agents: A Perspective from Spain. *Microorganisms*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040717>
- Wdowiak, M., Paczesny, J., & Raza, S. (2022). Enhancing the Stability of Bacteriophages Using Physical, Chemical, and Nano-Based Approaches: A Review. *Pharmaceutics*, 14(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091936>

- Xiao, Y., Huang, P., Huang, Z., Yu, K., Song, Y., Guo, N., Dai, H., Jiang, M., Xu, Y., Wang, D., & Wei, Q. (2022). Influencing factors on the preservation of lytic bacteriophage VP3. *Biosafety and Health*, 04(05), 314-320.  
<https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2022.06.004>
- Xu, Z., Ding, Z., Zhang, Y., Liu, X., Wang, Q., Shao, S., & Liu, Q. (2023). Shelf-life prediction and storage stability of *Aeromonas* bacteriophage vB\_AsM\_ZHF. *Virus Research*, 323, 198997. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198997>
- Yang, C.-Y., Erickstad, M., Tadrist, L., Ronan, E., Gutierrez, E., Wong-Ng, J., & Groisman, A. (2020). Aggregation Temperature of *Escherichia coli* Depends on Steepness of the Thermal Gradient. *Biophysical Journal*, 118(11), 2816-2828.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.02.033>
- Yuan, Y., Wang, L., Li, X., Tan, D., Cong, C., & Xu, Y. (2019). Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Virus Research*, 272, 197734.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197734>
- Zerbini, F. M., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Alfenas-Zerbini, P., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., García, M. L., Hendrickson, R. C., Junglen, S., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lambert, A. J., Łobocka, M., Oksanen, H. M., Robertson, D. L., Rubino, L., Sabanadzovic, S., ... Varsani, A. (2023). Changes to virus taxonomy and the ICTV Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2023). *Archives of Virology*, 168(7), 175.  
<https://doi.org/10.1007/s00705-023-05797-4>
- Zhai, X., Castro-Mejía, J. L., Gobbi, A., Aslampaloglou, A., Kot, W., Nielsen, D. S., & Deng, L. (2023). The impact of storage buffer and storage conditions on fecal samples for

bacteriophage infectivity and metavirome analyses. *Microbiome*, 11(1), 193.

<https://doi.org/10.1186/s40168-023-01632-9>

Zhang, M., Zhang, T., Yu, M., Chen, Y.-L., & Jin, M. (2022a). The Life Cycle Transitions of Temperate Phages: Regulating Factors and Potential Ecological Implications. *Viruses*, 14(9), 1904. <https://doi.org/10.3390/v14091904>

Zhang, Y., Guo, Y., Qiu, T., Gao, M., & Wang, X. (2022b). Bacteriophages: Underestimated vehicles of antibiotic resistance genes in the soil. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.936267>

Zia, S., & Alkheraije, K. A. (2023). Recent trends in the use of bacteriophages as replacement of antimicrobials against food-animal pathogens. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1162465>

## ANEXOS

### Anexo 01

*Reactivación de la cepa Escherichia coli NCTC 13476 hospedero de HE4cI.*



### Anexo 02

*Reactivación de la cepa Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814 hospedero de H33IIK.*



### Anexo 03

*Reactivación de la cepa Salmonella enterica hospedero de H93S.*



## Anexo 04

*Estabilidad del bacteriófago HEc4I, hospedero de Escherichia coli NCTC 13476, bajo diferentes soluciones de preservación, expresado en log<sub>10</sub>.*

| T°      | SOLUCION       | TIEMPO (DIAS) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|----------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|         |                | 0             | 15   | 30   | 45   | 60   | 75   | 90   | 105  | 120  | 135  |
| TA      | TSB            | 9.49          | 8.49 | 8.4  | 8.21 | 8.19 | 8.16 | 8.14 | 8.1  | 7.88 | 7.76 |
|         | TSB + GLICEROL | 9.49          | 6.37 | 5.29 | 4.35 | 2.35 | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
|         | TSB + DMSO     | 9.49          | 8.44 | 8.36 | 8.33 | 8.25 | 8.14 | 8.08 | 8.05 | 7.89 | 7.83 |
|         | SM             | 9.49          | 9.42 | 8.55 | 8.55 | 8.51 | 8.5  | 8.5  | 8.49 | 8.16 | 7.12 |
|         | SM + GLICEROL  | 9.49          | 9.47 | 8.93 | 6.63 | 5.78 | 4.2  | 3.21 | 2.62 | 0.52 | 0    |
|         | SM + DMSO      | 9.49          | 8.51 | 8.43 | 8.39 | 8.38 | 8.37 | 8.35 | 8.32 | 8.13 | 7.51 |
| 4°C     | TSB            | 9.49          | 8.58 | 8.45 | 8.44 | 8.39 | 8.39 | 8.38 | 8.35 | 8.23 | 8.22 |
|         | TSB + GLICEROL | 9.49          | 5.55 | 4.94 | 4.03 | 3.36 | 3.17 | 2.1  | 1.37 | 0    | 0    |
|         | TSB + DMSO     | 9.49          | 9.46 | 9.28 | 8.41 | 8.2  | 8.19 | 8.33 | 8.4  | 8.11 | 7.38 |
|         | SM             | 9.49          | 8.76 | 8.67 | 8.64 | 8.55 | 8.54 | 8.53 | 8.52 | 8.52 | 8.47 |
|         | SM + GLICEROL  | 9.49          | 8.44 | 8.36 | 8.29 | 8.27 | 8.26 | 8.25 | 8.22 | 8.15 | 8.11 |
|         | SM + DMSO      | 9.49          | 8.54 | 8.53 | 8.51 | 8.5  | 8.47 | 8.39 | 8.52 | 8.38 | 8.37 |
| - 20° C | TSB            | 9.49          | 8.51 | 8.47 | 8.48 | 8.41 | 8.41 | 8.38 | 8.37 | 8.21 | 8.2  |
|         | TSB + GLICEROL | 9.49          | 8.35 | 8.29 | 8.21 | 7.98 | 7.91 | 7.9  | 7.78 | 7.62 | 7.58 |
|         | TSB + DMSO     | 9.49          | 8.32 | 8.14 | 8.12 | 8.01 | 7.94 | 7.9  | 7.71 | 7.58 | 7.43 |
|         | SM             | 9.49          | 8.45 | 8.42 | 8.38 | 8.34 | 8.33 | 8.31 | 8.29 | 8.12 | 7.61 |
|         | SM + GLICEROL  | 9.49          | 8.45 | 8.28 | 8.26 | 8.23 | 8.21 | 8.18 | 8.16 | 8.05 | 8.05 |
|         | SM + DMSO      | 9.49          | 8.6  | 8.45 | 8.22 | 8.01 | 7.98 | 7.95 | 7.73 | 7.6  | 7.47 |
| - 80° C | TSB            | 9.49          | 8.73 | 8.66 | 8.55 | 8.5  | 8.47 | 8.46 | 8.45 | 8.35 | 8.33 |
|         | TSB + GLICEROL | 9.49          | 8.68 | 8.59 | 8.54 | 8.51 | 8.39 | 8.36 | 8.33 | 8.33 | 8.23 |
|         | TSB + DMSO     | 9.49          | 8.79 | 8.72 | 8.67 | 8.66 | 8.64 | 8.53 | 8.41 | 8.37 | 8.35 |
|         | SM             | 9.49          | 8.8  | 8.75 | 8.68 | 8.62 | 8.59 | 8.55 | 8.4  | 8.3  | 8.24 |
|         | SM + GLICEROL  | 9.49          | 8.67 | 8.62 | 8.51 | 8.44 | 8.41 | 8.4  | 8.36 | 8.34 | 8.33 |
|         | SM + DMSO      | 9.49          | 8.67 | 8.57 | 8.46 | 8.45 | 8.44 | 8.43 | 8.41 | 8.39 | 8.38 |

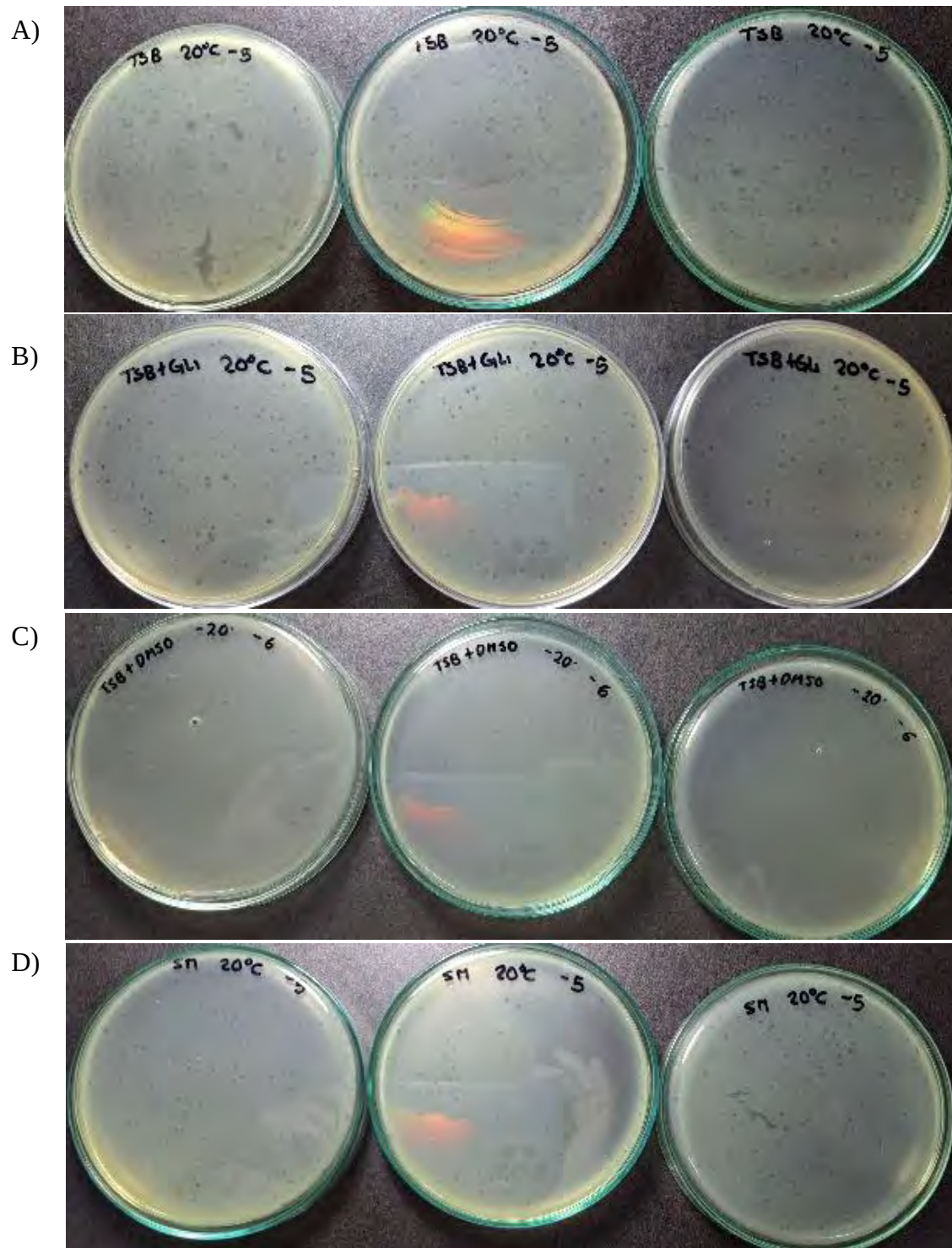
## Anexo 05

*Comparaciones múltiples sobre el efecto de la solución y la temperatura en la tasa de recuperación del fago HEC4I.*

| Solución       | Comparación de temperatura | Media $\pm$ SD 1 | Media $\pm$ SD 2 | Ajustado P |
|----------------|----------------------------|------------------|------------------|------------|
| TSB            | TA vs 4 °C                 | 7.76 $\pm$ 0.02  | 8.22 $\pm$ 0.03  | 0.004      |
| TSB            | TA vs -20 °C               | 7.76 $\pm$ 0.02  | 8.17 $\pm$ 0.05  | 0.01       |
| TSB            | TA vs -80 °C               | 7.76 $\pm$ 0.02  | 8.33 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| TSB            | 4 °C vs -20 °C             | 8.22 $\pm$ 0.03  | 8.17 $\pm$ 0.05  | 0.032      |
| TSB            | 4 °C vs -80 °C             | 8.22 $\pm$ 0.03  | 8.33 $\pm$ 0.01  | 0.002      |
| TSB            | -20 °C vs -80 °C           | 8.17 $\pm$ 0.05  | 8.33 $\pm$ 0.01  | 0.001      |
| TSB + Glicerol | TA vs 4 °C                 | 0.00 $\pm$ 0.00  | 0.00 $\pm$ 0.00  | ns         |
| TSB + Glicerol | TA vs -20 °C               | 0.00 $\pm$ 0.00  | 7.58 $\pm$ 0.03  | <0.001     |
| TSB + Glicerol | TA vs -80 °C               | 0.00 $\pm$ 0.00  | 8.23 $\pm$ 0.04  | <0.001     |
| TSB + Glicerol | 4 °C vs -20 °C             | 0.00 $\pm$ 0.00  | 7.58 $\pm$ 0.03  | <0.001     |
| TSB + Glicerol | 4 °C vs -80 °C             | 0.00 $\pm$ 0.00  | 8.23 $\pm$ 0.04  | <0.001     |
| TSB + Glicerol | -20 °C vs -80 °C           | 7.58 $\pm$ 0.03  | 8.23 $\pm$ 0.04  | 0.014      |
| TSB + DMSO     | TA vs 4 °C                 | 7.83 $\pm$ 0.02  | 7.85 $\pm$ 0.01  | 0.835      |
| TSB + DMSO     | TA vs -20 °C               | 7.83 $\pm$ 0.02  | 7.43 $\pm$ 0.01  | 0.008      |
| TSB + DMSO     | TA vs -80 °C               | 7.83 $\pm$ 0.02  | 8.35 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| TSB + DMSO     | 4 °C vs -20 °C             | 7.85 $\pm$ 0.01  | 7.43 $\pm$ 0.01  | 0.001      |
| TSB + DMSO     | 4 °C vs -80 °C             | 7.85 $\pm$ 0.01  | 8.35 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| TSB + DMSO     | -20 °C vs -80 °C           | 7.43 $\pm$ 0.01  | 8.35 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| SM             | TA vs 4 °C                 | 7.12 $\pm$ 0.07  | 8.47 $\pm$ 0.04  | <0.001     |
| SM             | TA vs -20 °C               | 7.12 $\pm$ 0.07  | 7.61 $\pm$ 0.06  | <0.001     |
| SM             | TA vs -80 °C               | 7.12 $\pm$ 0.07  | 8.24 $\pm$ 0.02  | <0.001     |
| SM             | 4 °C vs -20 °C             | 8.47 $\pm$ 0.04  | 7.61 $\pm$ 0.06  | 0.002      |
| SM             | 4 °C vs -80 °C             | 8.47 $\pm$ 0.04  | 8.24 $\pm$ 0.02  | 0.008      |
| SM             | -20 °C vs -80 °C           | 7.61 $\pm$ 0.06  | 8.24 $\pm$ 0.02  | 0.01       |
| SM + Glicerol  | TA vs 4 °C                 | 0.00 $\pm$ 0.00  | 8.11 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| SM + Glicerol  | TA vs -20 °C               | 0.00 $\pm$ 0.00  | 8.03 $\pm$ 0.02  | <0.001     |
| SM + Glicerol  | TA vs -80 °C               | 0.00 $\pm$ 0.00  | 8.33 $\pm$ 0.03  | <0.001     |
| SM + Glicerol  | 4 °C vs -20 °C             | 8.11 $\pm$ 0.01  | 8.03 $\pm$ 0.02  | 0.041      |
| SM + Glicerol  | 4 °C vs -80 °C             | 8.11 $\pm$ 0.01  | 8.33 $\pm$ 0.03  | 0.028      |
| SM + Glicerol  | -20 °C vs -80 °C           | 8.03 $\pm$ 0.02  | 8.33 $\pm$ 0.03  | 0.055      |
| SM + DMSO      | TA vs 4 °C                 | 7.51 $\pm$ 0.04  | 8.37 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| SM + DMSO      | TA vs -20 °C               | 7.51 $\pm$ 0.04  | 7.47 $\pm$ 0.01  | 0.412      |
| SM + DMSO      | TA vs -80 °C               | 7.51 $\pm$ 0.04  | 8.38 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| SM + DMSO      | 4 °C vs -20 °C             | 8.37 $\pm$ 0.01  | 7.47 $\pm$ 0.01  | <0.001     |
| SM + DMSO      | 4 °C vs -80 °C             | 8.37 $\pm$ 0.01  | 8.38 $\pm$ 0.01  | 0.612      |
| SM + DMSO      | -20 °C vs -80 °C           | 7.47 $\pm$ 0.01  | 8.38 $\pm$ 0.01  | <0.001     |

## Anexo 06

*Estabilidad del bacteriófago HEc4I de Escherichia, en Escherichia coli NCTC 13476, bajo diferentes soluciones de preservación.*



E)



F)



*Nota:* A) en Caldo TSB, B) en Caldo TSB con glicerol al 20%, C) en Caldo TSB con DMSO al 10%, D) en buffer SM, E) en buffer SM con glicerol al 20%, F) en buffer SM con DMSO 10%.

## Anexo 07

### *Registro de temperatura ambiente*

| <b>FECHA</b> | <b>TEM (T°)</b> | <b>FECHA</b> | <b>TEM (T°)</b> |
|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| 13/02/2025   | 18.6°           | 17/07/2025   | 18.7°           |
| 18/02/2025   | 18.5°           | 1/08/2025    | 18.5°           |
| 23/02/2025   | 18.4°           | 6/08/2025    | 18.4°           |
| 28/02/2025   | 18.6°           | 11/08/2025   | 18.6°           |
| 5/03/2025    | 18.7°           | 16/08/2025   | 18.5°           |
| 10/03/2025   | 19.0°           | 21/08/2025   | 18.6°           |
| 15/03/2025   | 18.8°           | 26/08/2025   | 18.8°           |
| 20/03/2025   | 18.8°           | 31/08/2025   | 18.7°           |
| 25/03/2025   | 18.7°           | 5/09/2025    | 18.9°           |
| 30/03/2025   | 18.9°           | 10/09/2025   | 18.7°           |
| 4/04/2025    | 18.9°           | 15/09/2025   | 18.8°           |
| 9/04/2025    | 18.6°           | 20/09/2025   | 18.5°           |
| 14/04/2025   | 18.9°           | 25/09/2025   | 18.9°           |
| 19/04/2025   | 18.7°           | 30/09/2025   | 19.0°           |
| 24/04/2025   | 19.1°           | 5/10/2025    | 18.9°           |
| 29/04/2025   | 18.8°           | 10/10/2025   | 18.7°           |
| 4/05/2025    | 18.5°           | 15/10/2025   | 18.8°           |
| 9/05/2025    | 18.9°           | 20/10/2025   | 18.7°           |
| 14/05/2025   | 18.8°           | 25/10/2025   | 18.7°           |
| 19/05/2025   | 18.9°           | 30/10/2025   | 18.6°           |
| 24/05/2025   | 18.9°           | 4/11/2025    | 18.7°           |
| 29/05/2025   | 18.7°           | 9/11/2025    | 18.7°           |
| 3/06/2025    | 18.9°           | 14/11/2025   | 18.8°           |
| 8/06/2025    | 18.8°           | 19/11/2025   | 18.7°           |
| 13/06/2025   | 18.5°           | 24/11/2025   | 18.6°           |
| 18/06/2025   | 18.6°           | 29/11/2025   | 18.6°           |
| 23/06/2025   | 18.8°           | 4/12/2025    | 18.7°           |
| 28/06/2025   | 18.7°           | 9/12/2025    | 18.8°           |
| 7/07/2025    | 18.9°           | 14/12/2025   | 19.0°           |
| 12/07/2025   | 19.0°           | 19/12/2025   | 19.1°           |

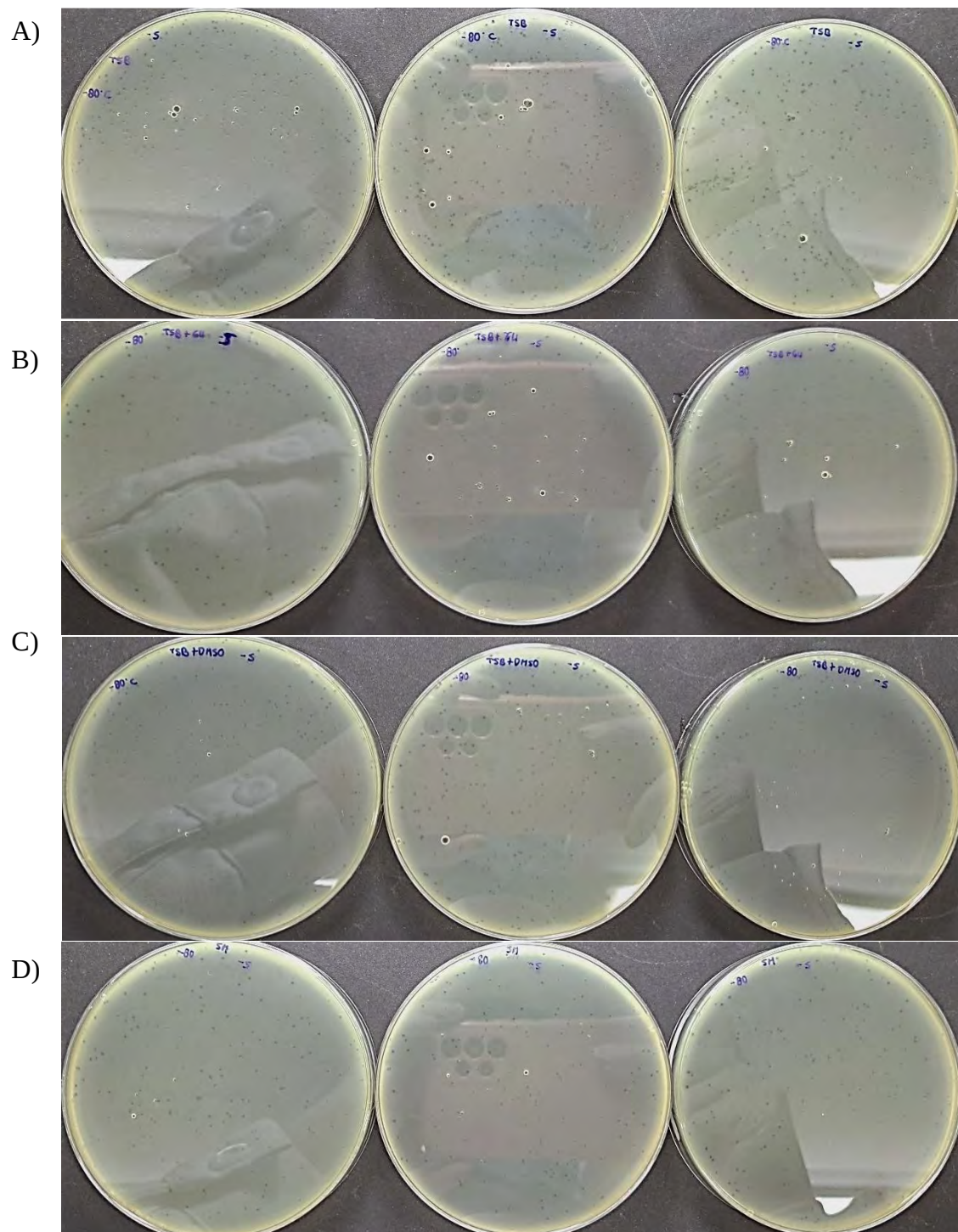
## Anexo 08

*Estabilidad del bacteriófago H33IIK de Klebsiella, en Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814, bajo diferentes soluciones de preservación, expresado en log<sub>10</sub>.*

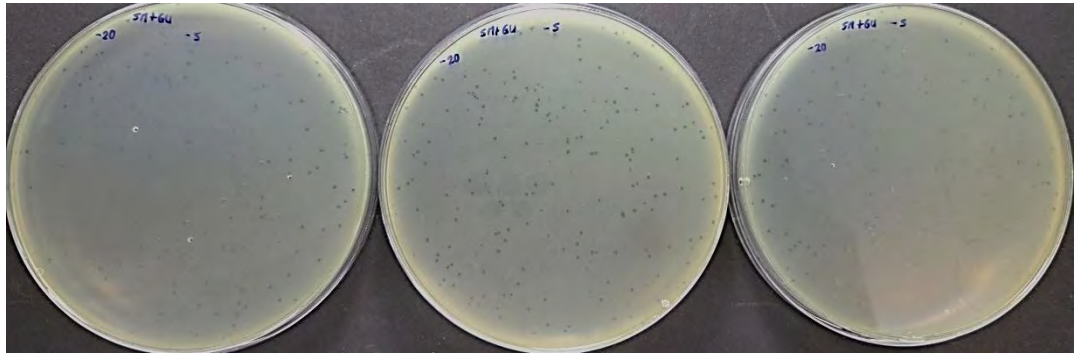
| T°      | SOLUCION       | TIEMPO (DIAS) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|----------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|         |                | 0             | 15   | 30   | 45   | 60   | 75   | 90   | 105  | 120  | 135  |
| TA      | TSB            | 9,98          | 8,46 | 8,34 | 8,30 | 8,17 | 8,14 | 8,09 | 7,92 | 7,80 | 7,54 |
|         | TSB + GLICEROL | 9,98          | 8,23 | 8,11 | 7,81 | 7,27 | 7,24 | 6,99 | 5,48 | 4,50 | 3,59 |
|         | TSB + DMSO     | 9,98          | 8,51 | 8,34 | 8,29 | 8,11 | 8,05 | 8,00 | 7,92 | 7,88 | 7,84 |
|         | SM             | 9,98          | 8,96 | 8,88 | 8,73 | 8,51 | 8,29 | 8,27 | 8,24 | 7,71 | 7,41 |
|         | SM + GLICEROL  | 9,98          | 8,19 | 7,95 | 7,65 | 7,37 | 7,34 | 7,26 | 7,12 | 6,30 | 6,06 |
|         | SM + DMSO      | 9,98          | 8,94 | 8,84 | 8,71 | 8,60 | 8,41 | 8,32 | 8,23 | 7,79 | 7,22 |
| 4°C     | TSB            | 9,98          | 8,75 | 8,38 | 8,38 | 8,34 | 8,33 | 8,29 | 8,26 | 7,54 | 7,44 |
|         | TSB + GLICEROL | 9,98          | 8,24 | 7,94 | 7,88 | 7,85 | 7,72 | 7,40 | 7,08 | 6,45 | 5,52 |
|         | TSB + DMSO     | 9,98          | 8,59 | 8,12 | 7,99 | 7,93 | 7,85 | 7,49 | 7,29 | 7,23 | 7,18 |
|         | SM             | 9,98          | 8,94 | 8,50 | 8,43 | 8,37 | 8,24 | 8,16 | 8,00 | 7,86 | 7,56 |
|         | SM + GLICEROL  | 9,98          | 8,60 | 8,35 | 8,28 | 8,24 | 8,17 | 8,12 | 8,03 | 7,95 | 7,79 |
|         | SM + DMSO      | 9,98          | 8,70 | 8,53 | 8,47 | 8,42 | 8,36 | 8,34 | 8,03 | 7,86 | 7,56 |
| - 20° C | TSB            | 9,98          | 6,00 | 5,94 | 5,61 | 5,34 | 5,24 | 5,09 | 5,02 | 4,94 | 4,63 |
|         | TSB + GLICEROL | 9,98          | 8,54 | 7,86 | 8,58 | 8,37 | 8,31 | 8,24 | 8,05 | 7,79 | 7,77 |
|         | TSB + DMSO     | 9,98          | 7,54 | 6,95 | 6,81 | 6,68 | 6,58 | 6,47 | 6,30 | 5,94 | 4,77 |
|         | SM             | 9,98          | 6,22 | 5,19 | 5,04 | 4,72 | 4,63 | 4,59 | 4,57 | 4,54 | 4,49 |
|         | SM + GLICEROL  | 9,98          | 8,61 | 8,58 | 8,56 | 8,52 | 8,48 | 8,45 | 8,44 | 8,44 | 8,43 |
|         | SM + DMSO      | 9,98          | 8,66 | 8,04 | 7,81 | 6,55 | 5,85 | 5,78 | 5,72 | 5,64 | 5,54 |
| - 80° C | TSB            | 9,98          | 9,45 | 9,13 | 8,81 | 8,67 | 8,55 | 8,53 | 8,52 | 8,47 | 8,46 |
|         | TSB + GLICEROL | 9,98          | 9,41 | 9,28 | 9,06 | 8,61 | 8,51 | 8,44 | 8,41 | 8,38 | 8,31 |
|         | TSB + DMSO     | 9,98          | 9,45 | 8,88 | 8,70 | 8,52 | 8,47 | 8,44 | 8,42 | 8,39 | 8,37 |
|         | SM             | 9,98          | 9,49 | 9,08 | 8,98 | 8,74 | 8,51 | 8,38 | 8,32 | 8,29 | 8,25 |
|         | SM + GLICEROL  | 9,98          | 8,59 | 8,45 | 8,40 | 8,35 | 8,34 | 8,31 | 8,30 | 8,17 | 8,11 |
|         | SM + DMSO      | 9,98          | 8,56 | 7,96 | 7,88 | 7,67 | 7,56 | 7,46 | 7,42 | 7,21 | 7,14 |

## Anexo 09

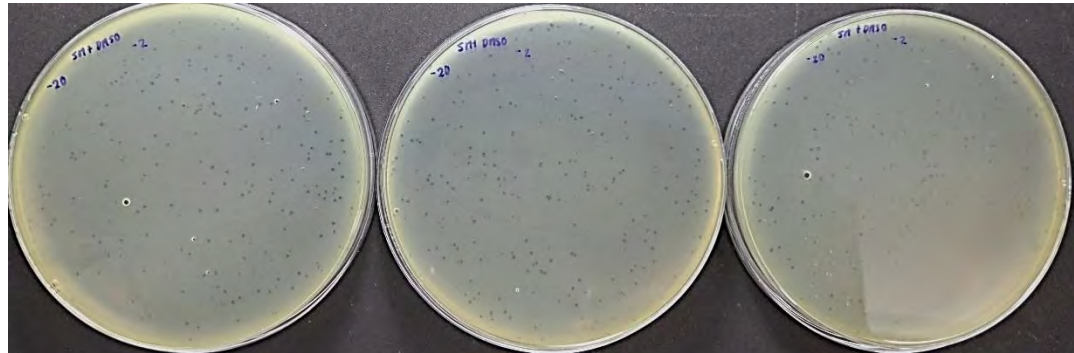
*Estabilidad del bacteriófago H33IIK, en Klebsiella pneumoniae ATCC BAA 2814, bajo diferentes soluciones de preservación.*



E)



F)



*Nota:* A) en Caldo TSB, B) en Caldo TSB con glicerol al 20%, C) en Caldo TSB con DMSO al 10%, D) en buffer SM, E) en buffer SM con glicerol al 20%, F) en buffer SM con DMSO 10%.

## Anexo 10

*Comparaciones múltiples sobre el efecto de la solución y la temperatura en la tasa de recuperación del fago H33IIK de Klebsiella.*

| <b>Solution</b> | <b>Temperature comparison</b> | <b>Mean ± SD 1</b> | <b>Mean ± SD 2</b> | <b>P ajustado</b> |
|-----------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| TSB             | TA vs 4 °C                    | 7.54 ± 0.03        | 7.44 ± 0.05        | 0.812             |
| TSB             | TA vs -20 °C                  | 7.54 ± 0.03        | 4.63 ± 0.12        | <0.001            |
| TSB             | TA vs -80 °C                  | 7.54 ± 0.03        | 8.46 ± 0.04        | 0.021             |
| TSB             | 4 °C vs -20 °C                | 7.44 ± 0.05        | 4.63 ± 0.12        | <0.001            |
| TSB             | 4 °C vs -80 °C                | 7.44 ± 0.05        | 8.46 ± 0.04        | 0.017             |
| TSB             | -20 °C vs -80 °C              | 4.63 ± 0.12        | 8.46 ± 0.04        | <0.001            |
| TSB + Glicerol  | TA vs 4 °C                    | 3.59 ± 0.08        | 5.52 ± 0.11        | <0.001            |
| TSB + Glicerol  | TA vs -20 °C                  | 3.59 ± 0.08        | 7.77 ± 0.04        | <0.001            |
| TSB + Glicerol  | TA vs -80 °C                  | 3.59 ± 0.08        | 8.31 ± 0.03        | <0.001            |
| TSB + Glicerol  | 4 °C vs -20 °C                | 5.52 ± 0.11        | 7.77 ± 0.04        | <0.001            |
| TSB + Glicerol  | 4 °C vs -80 °C                | 5.52 ± 0.11        | 8.31 ± 0.03        | <0.001            |
| TSB + Glicerol  | -20 °C vs -80 °C              | 7.77 ± 0.04        | 8.31 ± 0.03        | 0.094             |
| TSB + DMSO      | TA vs 4 °C                    | 7.84 ± 0.05        | 7.18 ± 0.04        | 0.041             |
| TSB + DMSO      | TA vs -20 °C                  | 7.84 ± 0.05        | 4.77 ± 0.07        | <0.001            |
| TSB + DMSO      | TA vs -80 °C                  | 7.84 ± 0.05        | 8.37 ± 0.05        | 0.062             |
| TSB + DMSO      | 4 °C vs -20 °C                | 7.18 ± 0.04        | 4.77 ± 0.07        | <0.001            |
| TSB + DMSO      | 4 °C vs -80 °C                | 7.18 ± 0.04        | 8.37 ± 0.05        | 0.033             |
| TSB + DMSO      | -20 °C vs -80 °C              | 4.77 ± 0.07        | 8.37 ± 0.05        | <0.001            |
| SM              | TA vs 4 °C                    | 7.41 ± 0.04        | 7.56 ± 0.03        | 0.742             |
| SM              | TA vs -20 °C                  | 7.41 ± 0.04        | 4.49 ± 0.09        | <0.001            |
| SM              | TA vs -80 °C                  | 7.41 ± 0.04        | 8.25 ± 0.04        | 0.028             |
| SM              | 4 °C vs -20 °C                | 7.56 ± 0.03        | 4.49 ± 0.09        | <0.001            |
| SM              | 4 °C vs -80 °C                | 7.56 ± 0.03        | 8.25 ± 0.04        | 0.036             |
| SM              | -20 °C vs -80 °C              | 4.49 ± 0.09        | 8.25 ± 0.04        | <0.001            |
| SM + Glicerol   | TA vs 4 °C                    | 6.06 ± 0.06        | 7.79 ± 0.04        | <0.001            |
| SM + Glicerol   | TA vs -20 °C                  | 6.06 ± 0.06        | 8.43 ± 0.05        | <0.001            |
| SM + Glicerol   | TA vs -80 °C                  | 6.06 ± 0.06        | 8.11 ± 0.04        | <0.001            |
| SM + Glicerol   | 4 °C vs -20 °C                | 7.79 ± 0.04        | 8.43 ± 0.05        | 0.031             |
| SM + Glicerol   | 4 °C vs -80 °C                | 7.79 ± 0.04        | 8.11 ± 0.04        | 0.188             |
| SM + Glicerol   | -20 °C vs -80 °C              | 8.43 ± 0.05        | 8.11 ± 0.04        | 0.209             |
| SM + DMSO       | TA vs 4 °C                    | 7.22 ± 0.05        | 7.56 ± 0.04        | 0.214             |
| SM + DMSO       | TA vs -20 °C                  | 7.22 ± 0.05        | 5.54 ± 0.06        | <0.001            |
| SM + DMSO       | TA vs -80 °C                  | 7.22 ± 0.05        | 7.14 ± 0.04        | 0.903             |
| SM + DMSO       | 4 °C vs -20 °C                | 7.56 ± 0.04        | 5.54 ± 0.06        | <0.001            |
| SM + DMSO       | 4 °C vs -80 °C                | 7.56 ± 0.04        | 7.14 ± 0.04        | 0.097             |
| SM + DMSO       | -20 °C vs -80 °C              | 5.54 ± 0.06        | 7.14 ± 0.04        | <0.001            |

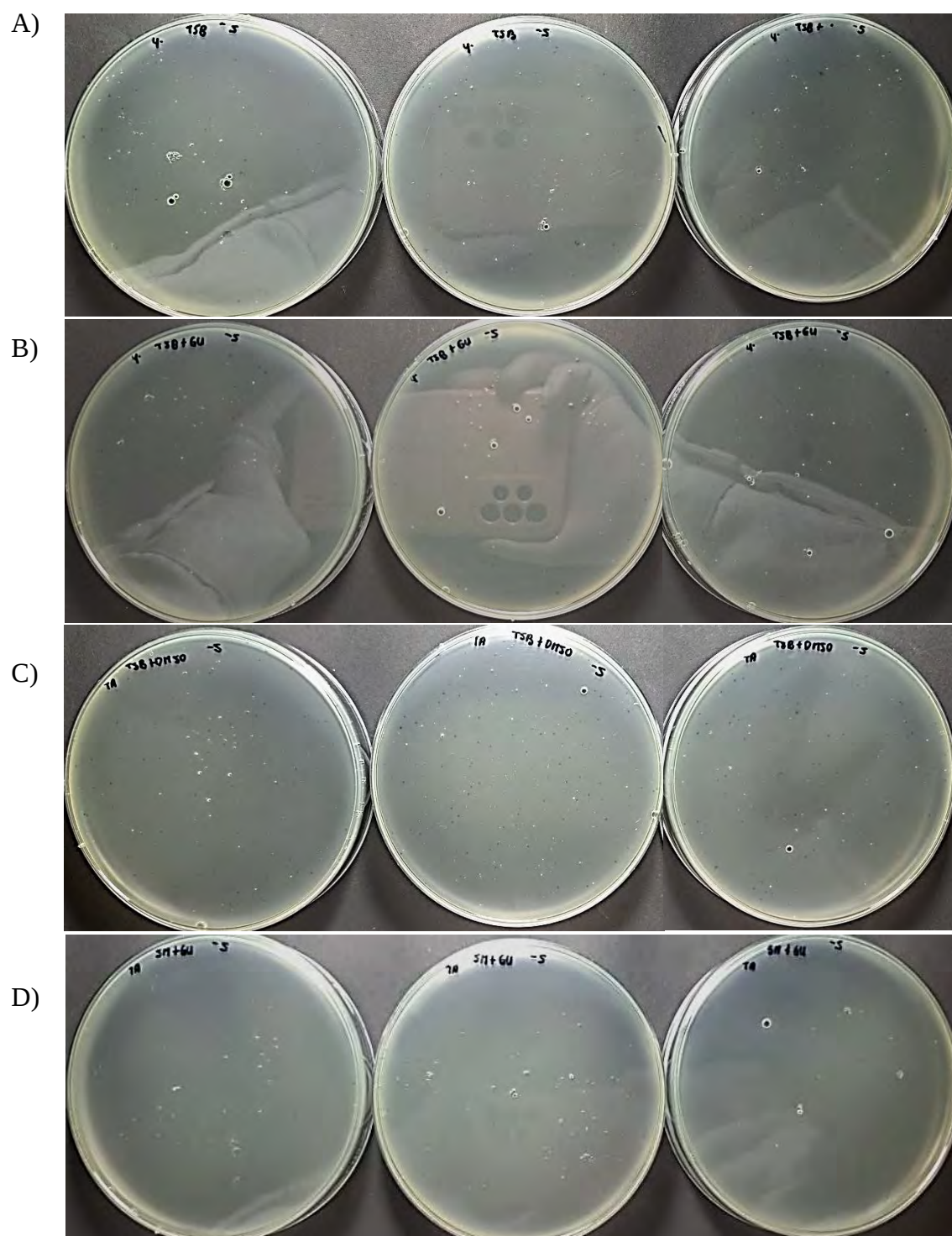
## Anexo 11

*Estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella, en Salmonella enterica, bajo diferentes soluciones de preservación, expresado en log<sub>10</sub>.*

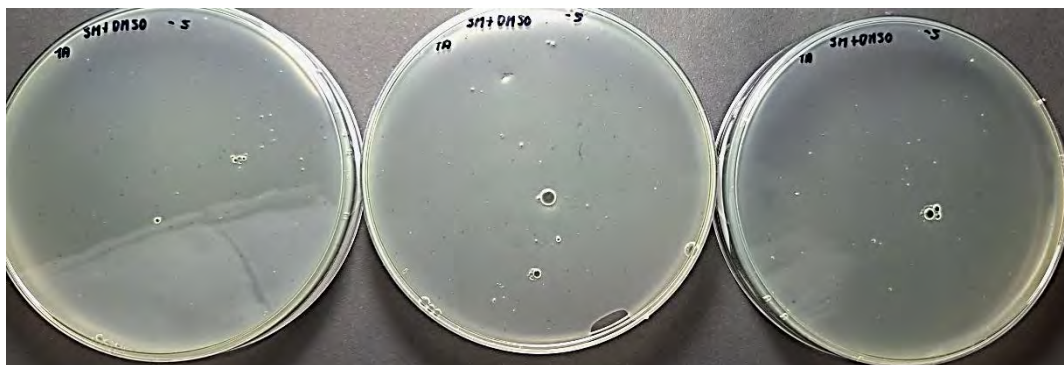
| T°      | SOLUCION       | TIEMPO (DIAS) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------|----------------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|         |                | 0             | 15   | 30   | 45   | 60   | 75   | 90   | 105  | 120  | 135  |
| TA      | TSB            | 8.28          | 7.98 | 7.88 | 7.84 | 7.79 | 7.76 | 7.71 | 7.67 | 7.59 | 7.52 |
|         | TSB + GLICEROL | 8.28          | 7.98 | 7.9  | 7.83 | 7.76 | 7.72 | 7.67 | 7.6  | 7.51 | 7.43 |
|         | TSB + DMSO     | 8.28          | 8.14 | 8.12 | 8.11 | 8.09 | 8.08 | 8.06 | 8.05 | 8.03 | 8.01 |
|         | SM             | 8.28          | 8.14 | 8.08 | 8.07 | 8.05 | 8.03 | 8.02 | 8    | 8    | 7.97 |
|         | SM + GLICEROL  | 8.28          | 8.01 | 7.99 | 7.95 | 7.92 | 7.89 | 7.83 | 7.76 | 7.69 | 7.52 |
|         | SM + DMSO      | 8.28          | 8.04 | 7.98 | 7.95 | 7.93 | 7.88 | 7.84 | 7.82 | 7.78 | 7.75 |
| 4°C     | TSB            | 8.28          | 8.13 | 8.05 | 8    | 7.94 | 7.9  | 7.85 | 7.82 | 7.76 | 7.72 |
|         | TSB + GLICEROL | 8.28          | 8.12 | 8.08 | 8.03 | 7.99 | 7.97 | 7.95 | 7.92 | 7.9  | 7.89 |
|         | TSB + DMSO     | 8.28          | 8.1  | 8    | 7.99 | 7.95 | 7.92 | 7.89 | 7.84 | 7.79 | 7.73 |
|         | SM             | 8.28          | 8.09 | 8.08 | 8    | 7.99 | 7.96 | 7.95 | 7.93 | 7.9  | 7.88 |
|         | SM + GLICEROL  | 8.28          | 8.13 | 8.08 | 8.03 | 7.99 | 7.99 | 7.96 | 7.95 | 7.93 | 7.91 |
|         | SM + DMSO      | 8.28          | 8.06 | 8    | 7.96 | 7.94 | 7.92 | 7.9  | 7.86 | 7.81 | 7.77 |
| - 20° C | TSB            | 8.28          | 8.04 | 7.97 | 7.95 | 7.87 | 7.85 | 7.81 | 7.71 | 7.63 | 7.58 |
|         | TSB + GLICEROL | 8.28          | 8.05 | 8    | 7.97 | 7.94 | 7.92 | 7.86 | 7.82 | 7.73 | 7.65 |
|         | TSB + DMSO     | 8.28          | 8    | 7.97 | 7.94 | 7.86 | 7.8  | 7.72 | 7.65 | 7.58 | 7.39 |
|         | SM             | 8.28          | 7.97 | 7.94 | 7.9  | 7.88 | 7.8  | 7.63 | 7.61 | 7.54 | 7.46 |
|         | SM + GLICEROL  | 8.28          | 7.92 | 7.88 | 7.81 | 7.77 | 7.72 | 7.69 | 7.68 | 7.68 | 7.64 |
|         | SM + DMSO      | 8.28          | 8.05 | 7.86 | 7.83 | 7.72 | 7.68 | 7.62 | 7.57 | 7.4  | 7.17 |
| - 80° C | TSB            | 8.28          | 8.33 | 8.03 | 7.99 | 7.97 | 7.94 | 7.9  | 7.87 | 7.85 | 7.83 |
|         | TSB + GLICEROL | 8.28          | 8.2  | 7.93 | 7.88 | 7.79 | 7.69 | 7.64 | 7.61 | 7.58 | 7.53 |
|         | TSB + DMSO     | 8.28          | 7.94 | 7.89 | 7.86 | 7.83 | 7.75 | 7.62 | 7.58 | 7.28 | 6.12 |
|         | SM             | 8.28          | 8.03 | 7.92 | 7.85 | 7.82 | 7.72 | 7.67 | 7.61 | 7.57 | 7.41 |
|         | SM + GLICEROL  | 8.28          | 7.93 | 7.9  | 7.87 | 7.84 | 7.78 | 7.76 | 7.67 | 7.6  | 7.55 |
|         | SM + DMSO      | 8.28          | 8.01 | 7.94 | 7.9  | 7.87 | 7.83 | 7.77 | 7.68 | 7.54 | 7.32 |

## Anexo 12

*Estabilidad del bacteriófago H93S de Salmonella, en Salmonella enterica, bajo diferentes soluciones de preservación.*



E)



*Nota:* A) en Caldo TSB, B) en Caldo TSB con glicerol al 20%, C) en Caldo TSB con DMSO al 10%, D) en buffer SM con glicerol al 20%, E) en buffer SM con DMSO 10%.

## Anexo 13

*Comparaciones múltiples sobre el efecto de la solución y la temperatura en la tasa de recuperación del fago H93S de Salmonella.*

| Solución       | Tem. comparación | Mean ± SD 1 | Mean ± SD 2 | P ajustado |
|----------------|------------------|-------------|-------------|------------|
| TSB            | TA vs 4 °C       | 7.52 ± 0.02 | 7.71 ± 0.10 | 0.118      |
| TSB            | TA vs -20 °C     | 7.52 ± 0.02 | 7.57 ± 0.06 | 0.721      |
| TSB            | TA vs -80 °C     | 7.52 ± 0.02 | 7.83 ± 0.08 | 0.021      |
| TSB            | 4 °C vs -20 °C   | 7.71 ± 0.10 | 7.57 ± 0.06 | 0.334      |
| TSB            | 4 °C vs -80 °C   | 7.71 ± 0.10 | 7.83 ± 0.08 | 0.412      |
| TSB            | -20 °C vs -80 °C | 7.57 ± 0.06 | 7.83 ± 0.08 | 0.048      |
| TSB + Glicerol | TA vs 4 °C       | 7.43 ± 0.06 | 7.88 ± 0.05 | 0.003      |
| TSB + Glicerol | TA vs -20 °C     | 7.43 ± 0.06 | 7.64 ± 0.11 | 0.172      |
| TSB + Glicerol | TA vs -80 °C     | 7.43 ± 0.06 | 7.52 ± 0.07 | 0.531      |
| TSB + Glicerol | 4 °C vs -20 °C   | 7.88 ± 0.05 | 7.64 ± 0.11 | 0.041      |
| TSB + Glicerol | 4 °C vs -80 °C   | 7.88 ± 0.05 | 7.52 ± 0.07 | 0.008      |
| TSB + Glicerol | -20 °C vs -80 °C | 7.64 ± 0.11 | 7.52 ± 0.07 | 0.337      |
| TSB + DMSO     | TA vs 4 °C       | 8.01 ± 0.03 | 7.73 ± 0.05 | 0.028      |
| TSB + DMSO     | TA vs -20 °C     | 8.01 ± 0.03 | 7.38 ± 0.11 | <0.001     |
| TSB + DMSO     | TA vs -80 °C     | 8.01 ± 0.03 | 6.00 ± 0.00 | <0.001     |
| TSB + DMSO     | 4 °C vs -20 °C   | 7.73 ± 0.05 | 7.38 ± 0.11 | 0.009      |
| TSB + DMSO     | 4 °C vs -80 °C   | 7.73 ± 0.05 | 6.00 ± 0.00 | <0.001     |
| TSB + DMSO     | -20 °C vs -80 °C | 7.38 ± 0.11 | 6.00 ± 0.00 | <0.001     |
| SM             | TA vs 4 °C       | 7.97 ± 0.06 | 7.88 ± 0.02 | 0.482      |
| SM             | TA vs -20 °C     | 7.97 ± 0.06 | 7.46 ± 0.03 | <0.001     |
| SM             | TA vs -80 °C     | 7.97 ± 0.06 | 7.40 ± 0.13 | <0.001     |
| SM             | 4 °C vs -20 °C   | 7.88 ± 0.02 | 7.46 ± 0.03 | 0.003      |
| SM             | 4 °C vs -80 °C   | 7.88 ± 0.02 | 7.40 ± 0.13 | 0.002      |
| SM             | -20 °C vs -80 °C | 7.46 ± 0.03 | 7.40 ± 0.13 | 0.812      |
| SM + Glicerol  | TA vs 4 °C       | 7.49 ± 0.19 | 7.91 ± 0.06 | 0.016      |
| SM + Glicerol  | TA vs -20 °C     | 7.49 ± 0.19 | 7.64 ± 0.08 | 0.441      |
| SM + Glicerol  | TA vs -80 °C     | 7.49 ± 0.19 | 7.54 ± 0.08 | 0.911      |
| SM + Glicerol  | 4 °C vs -20 °C   | 7.91 ± 0.06 | 7.64 ± 0.08 | 0.027      |
| SM + Glicerol  | 4 °C vs -80 °C   | 7.91 ± 0.06 | 7.54 ± 0.08 | 0.011      |
| SM + Glicerol  | -20 °C vs -80 °C | 7.64 ± 0.08 | 7.54 ± 0.08 | 0.584      |
| SM + DMSO      | TA vs 4 °C       | 7.75 ± 0.08 | 7.77 ± 0.04 | 0.964      |
| SM + DMSO      | TA vs -20 °C     | 7.75 ± 0.08 | 7.16 ± 0.06 | <0.001     |
| SM + DMSO      | TA vs -80 °C     | 7.75 ± 0.08 | 7.31 ± 0.11 | 0.002      |
| SM + DMSO      | 4 °C vs -20 °C   | 7.77 ± 0.04 | 7.16 ± 0.06 | <0.001     |
| SM + DMSO      | 4 °C vs -80 °C   | 7.77 ± 0.04 | 7.31 ± 0.11 | 0.003      |
| SM + DMSO      | -20 °C vs -80 °C | 7.16 ± 0.06 | 7.31 ± 0.11 | 0.251      |

## Anexo 14

### Ficha técnica de información de *Escherichia coli* NCTC 13476



#### Escherichia coli

|                     |                         |
|---------------------|-------------------------|
| Número de catálogo: | NCTC 13476              |
| Nombre actual:      | <i>Escherichia coli</i> |
| Tipo de cepa:       | Cepa de referencia      |

#### General Info

Otros números de colección: CCUG 68729

Familia: *Enterobacteriaceae*

Grupo de riesgo (ACDP): Grupo de riesgo (ACDP) 2

Condiciones de lanzamiento: [Términos y condiciones de suministro de patógenos microbianos: Seguridad](#)

#### Culture Conditions

Growth Conditions on Solid Media: Nutrient agar, 24 hours, 37°C, O<sub>2</sub>

#### Biological and Genomic Info

Whole Genome Sequence: [Link on ENA Database](#)

Gram Stain Result: Negative

Strain Data: *E. coli* IMP-type (unsequenced)

#### Documents

- Ficha de datos de seguridad (MSDS) para productos de cultivo bacteriano en formato liofilizado.
- Guía fotográfica: Cómo abrir y cultivar tus cepas NCTC liofilizadas

#### External Media

- Video guide: How to open and grow your freeze dried NCTC strains

#### Available Formats:

Ampoule (Bacteria)

#### Guía de citación

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in the publication as: *Escherichia coli* (NCTC 13476)

#### Información sobre bioseguridad

It is the responsibility of the customer to ensure that their facilities comply with biosafety regulations for their own country.

#### Más información

The Culture Collections represent deposits of cultures from world-wide sources. While every effort is made to ensure details distributed by Culture Collections are accurate, Culture Collections cannot be held responsible for any inaccuracies in the data supplied. References where quoted are mainly attributed to the establishment of the cell culture and not for any specific property of the cell line, therefore further references should be obtained regarding cell culture characteristics. Passage numbers where given act only as a guide and Culture Collections does not guarantee the passage number stated will be the passage number received by the customer.

Cultures supplied by Culture Collections are for research purposes only. Enquiries regarding the commercial use of a cell line are referred to the depositor of the cell line. Some cell lines have additional special release conditions such as the requirement for a material transfer agreement to be completed by the potential recipient prior to the supply of the cell line. Please view the [Terms & Conditions of Supply](#) for more information.

Copyright © Agencia de Seguridad Sanitaria del Reino Unido

## Anexo 15

### Ficha técnica de información de *Klebsiella pneumoniae* BAA 2814

Product Sheet

# *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan

BAA-2814™

## Description

*Klebsiella pneumoniae* strain KP1074 [B21] is a whole-genome sequenced bacterium that was isolated from a human with leukemia/lymphoma in Tel-Hashomer, Israel. This strain produces *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-3). The depositor states that this strain can be used as a QC reference strain for testing new beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations such as meropenem/vaborbactam. The bacterium is a CLSI control strain for antimicrobial susceptibility testing.

**Strain designation:** KP1074 [B21]  
**Deposited As:** *Klebsiella pneumoniae*  
**Type strain:** No

---

## Storage Conditions

**Product format:** Frozen  
**Storage conditions:** -80°C or colder

---

## Intended Use

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.

---

## BSL 2

ATCC determines the biosafety level of a material based on our risk assessment as guided by the current edition of *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*

---

 **ATCC™** *Credible leads to incredible™* [www.atcc.org](http://www.atcc.org) Page 1 of 5

***Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan**

BAA-2814

(BMBL), U.S. Department of Health and Human Services. It is your responsibility to understand the hazards associated with the material per your organization's policies and procedures as well as any other applicable regulations as enforced by your local or national agencies.

ATCC highly recommends that appropriate personal protective equipment is always used when handling vials. For cultures that require storage in liquid nitrogen, it is important to note that some vials may leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vial exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris. Unless necessary, ATCC recommends that these cultures be stored in the vapor phase of liquid nitrogen rather than submersed in liquid nitrogen.

---

**Certificate of Analysis**

For batch-specific test results, refer to the applicable certificate of analysis that can be found at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

---

**Growth Conditions****Medium:**

ATCC Medium 3: Nutrient agar or nutrient broth

**Temperature:** 37°C**Atmosphere:** Aerobic

---

**Handling Procedures**

***Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan**

BAA-2814

1. Open thawed vial according to enclosed instructions or visit [www.atcc.org](http://www.atcc.org) for instructions.
2. Aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #3 broth. Additional test tubes can be inoculated by transferring 0.5 mL of the primary broth tube to these secondary tubes.
3. Use several drops of the primary broth tube to inoculate a #3 plate and/or #3 agar slant.
4. Incubate at 37°C for 24 hours.

**Notes**

The depositor states that this strain can be used as a QC reference strain for testing new beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations, such as meropenem/vaborbactam.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

**Material Citation**

If use of this material results in a scientific publication, please cite the material in the following manner: *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan (ATCC BAA-2814)

**References**

References and other information relating to this material are available at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

**Warranty**

The product is provided 'AS IS' and the viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, provided that the customer has stored and handled

## ***Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan**

BAA-2814

Product Sheet

the product according to the information included on the product information sheet, website, and Certificate of Analysis. For living cultures, ATCC lists the media formulation and reagents that have been found to be effective for the product. While other unspecified media and reagents may also produce satisfactory results, a change in the ATCC and/or depositor-recommended protocols may affect the recovery, growth, and/or function of the product. If an alternative medium formulation or reagent is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid. Except as expressly set forth herein, no other warranties of any kind are provided, express or implied, including, but not limited to, any implied warranties of merchantability, fitness for a particular purpose, manufacture according to cGMP standards, typicality, safety, accuracy, and/or noninfringement.

### **Disclaimers**

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use. Any proposed commercial use is prohibited without a license from ATCC.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate or complete and the customer bears the sole responsibility of confirming the accuracy and completeness of any such information.

This product is sent on the condition that the customer is responsible for and assumes all risk and responsibility in connection with the receipt, handling, storage, disposal, and use of the ATCC product including without limitation taking all appropriate safety and handling precautions to minimize health or environmental risk. As a condition of receiving the material, the customer agrees that any activity undertaken with the ATCC product and any progeny or modifications will be conducted in compliance with all applicable laws, regulations, and guidelines. This product is provided 'AS IS' with no representations or warranties whatsoever except as expressly set forth herein and in no event shall ATCC, its parents, subsidiaries,

***Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan**

BAA-2814

directors, officers, agents, employees, assigns, successors, and affiliates be liable for indirect, special, incidental, or consequential damages of any kind in connection with or arising out of the customer's use of the product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the material transfer agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is available at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

---

**Copyright and Trademark Information**

© ATCC 2023. All rights reserved.

ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

---

**Revision**

This information on this document was last updated on 2025-10-01

---

**Contact Information**

ATCC

10801 University Boulevard

Manassas, VA 20110-2209

USA

US telephone: 800-638-6597

Worldwide telephone: +1-703-365-2700

Email: [tech@atcc.org](mailto:tech@atcc.org) or contact your local distributor

## Anexo 16

### *Purificación de bacteriófago*



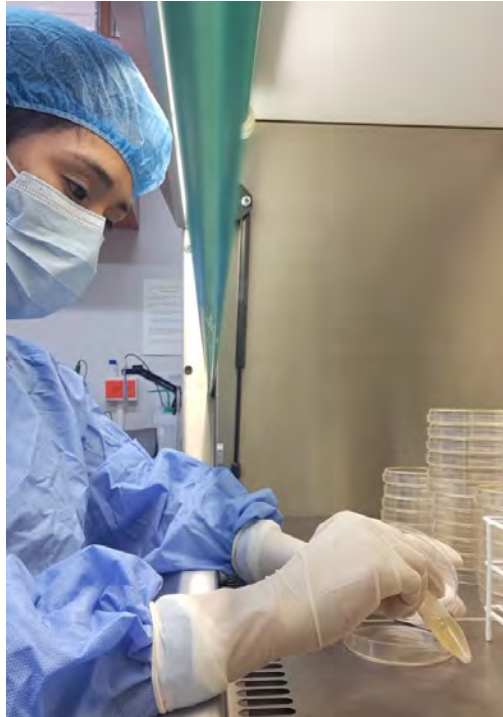
## Anexo 17

### *Diluciones seriadas para el ensayo de bicapa*



## Anexo 18

### *Ensayo de bicapa*



## Anexo 19

### *Almacenamiento de bacteriófagos*



## Anexo 20

*incubación de las placas*

