

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultades de Ciencias y Humanidades



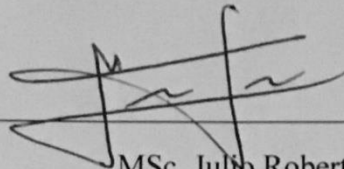
Evaluación y análisis de bacteriófagos silvestres para la
inhibición de formación de biopelículas de *Klebsiella*
pneumoniae y *Morganella morganii*

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por:
Mariandreé Linares Fernández
para optar a grado de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

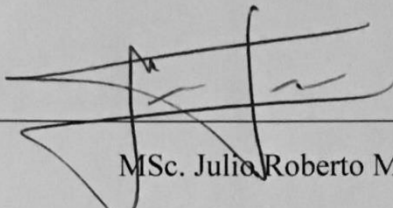
Guatemala

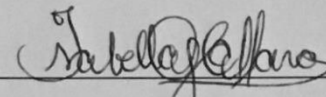
2019

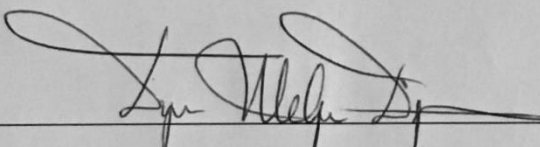
Vo. Bo. :

(f) 
MSc. Julio Roberto Matute Torres

Tribunal Examinador

(f) 
MSc. Julio Roberto Matute Torres

(f) 
MSc. Isabella García Caffaro

(f) 
MSc. Dyna Melgar Dorigoni

Fecha de aprobación: Guatemala 4 de diciembre de 2019

ÍNDICE

LISTADOS DE CUADROS.....	iii
LISTADO DE FIGURAS	iv
PREFACIO	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
A. General.....	2
B. Específicos.....	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
A. Bacteriófagos	4
1. Historia.....	5
2. Rol.....	6
3. Mecanismo de replicación	7
a. Lítico.....	8
b. Lisogénico.....	8
B. Enterobacterias.....	8
1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
2. <i>Morganella morganii</i>	9
a. Patogenicidad.....	10
C. Biopelículas.....	10
1. Mecanismo.....	11
2. Programa Moscamed	12
V. METODOLOGÍA	14
A. Sitio.....	14
B. Sujetos de estudio	14
C. Diseño,	14
D. Tipo.....	14
E. Criterios	15

F.	Variables	15
G.	Hipótesis	16
H.	Instrumentos de medición	16
I.	Procedimiento	16
VI.	RESULTADOS.....	23
A.	Aislamiento de fagos.....	23
B.	Título.....	23
C.	Velocidad lítica	24
D.	Optimización.....	27
a.	Biopelículas.....	27
b.	Fagos	28
E.	Pruebas de infección	30
F.	Pruebas de infección con antisépticos.....	33
G.	Valores estadísticos.....	35
VII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	36
VIII.	CONCLUSIONES	41
IX.	RECOMENDACIONES.....	42
X.	BIBILOGRAFÍA	43
XI.	GLOSARIO	50
XII.	ANEXOS	51

LISTADOS DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de enfoque de modelos combinados de dos etapas	14
Cuadro 2. Variables empleadas para el estudio	15
Cuadro 3. Valores UFP de fagos purificados en diluciones según número de placas de lisis	24
Cuadro 4. Identificación de mezclas de cocteles para tratamiento con fagos	31

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de bacteriófagos según morfología y genética	5
Figura 2. Principales mecanismos de protección bacteriana contra bacteriófagos	6
Figura 3. Ciclos biológicos de desarrollo de bacteriófagos	7
Figura 4. Interacción de bacteriófagos con biopelícula	11
Figura 5. Representación general del ciclo de vida de una biopelícula	12
Figura 6. Esquema desglosado de metodología descrita para el estudio.....	22
Figura 7. Visualización de placas de fagos líticos en césped bacteriano	23
Figura 8. Efectos de tratamiento con fagos en células bacterianas de <i>K. pneumoniae</i> conforme al tiempo	25
Figura 9. . Efectos en la densidad óptica conforme al tiempo en curva de muerte para <i>M.morganii</i> con tratamiento de fagos.....	26
Figura 10. Comparación de formación de biopelículas totales por volumen de cultivo bacteriano añadido	27
Figura 11. Comparación de formación de biopelículas totales conforme a volúmenes tratamiento con fagos de <i>K. pneumoniae</i>	28
Figura 12. Comparación de formación de biopelículas totales conforme a volúmenes tratamiento con fagos de <i>M. morganii</i>	29
Figura 13. Comparación de formación de biopelículas según coctel de fagos de <i>K. pneumoniae</i>	32
Figura 14. Comparación de formación de biopelículas según coctel de fagos de <i>M. morganii</i>	33
Figura 15. Comparación de formación de biopelículas totales en presencia de antisépticos según coctel de fagos de <i>K. pneumoniae</i>	34
Figura 16. Absorbancia de biopelículas totales en presencia de antisépticos según coctel de fagos de <i>M. morganii</i>	34

PREFACIO

El siguiente trabajo se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. El diseño de este inicia en febrero 2018 como respuesta a un problema actual aplicado a la Planta de cría masiva de moscas del Programa Moscamed. Debido a su rol como depredador bacteriano, la propuesta para el control de contaminación por *Klebsiella pneumoniae* y *Morganella morganii* buscaba emplear bacteriófagos líticos silvestres como control biológico.

La elaboración de este proyecto me permitió profundizar acerca de temas en microbiología y virología que ahora dirigen mis mayores intereses para posteriores estudios junto a la inmunología. La idea de trabajar con bacteriófagos me generó mucho interés y motivación para cada día trabajar por obtener los resultados esperados. La experiencia y conocimiento que adquirí trabajando en su desarrollo el último año en el laboratorio B-Hive son una base importante en mi educación de pregrado que me permitirá alcanzar nuevos retos a un alto nivel.

Agradezco a mis padres, José Bernardo y Claudia María, por la oportunidad que me dieron al estudiar en la Universidad del Valle y su apoyo incondicional. Ellos, que me enseñaron a dar lo mejor de mí trabajando con compromiso, respeto y responsabilidad. A mi hermano, José Pablo, por dar los pasos que guían e iluminan mi camino. A mi hermana, Krista, por su comprensión e inspiración. A Kira, por acompañarme desde el inicio y Emma por hacerlo hacia el final.

Agradezco al equipo de trabajo del laboratorio que me acompañó durante la elaboración del proyecto; a Ana Mercedes por su apoyo y motivación diaria, y a Isabella y Nohemy por su ánimo constante. Al Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) y el Departamento de Bioquímica y Microbiología por proveer el acceso al uso del laboratorio B-Hive. También al programa PPQ/APHIS/USDA/medfly Action Program/Guatemala por respaldar el financiamiento del proyecto. Por último, agradezco a mi directora de carrera y directora del CEB, PhD. Pamela Pennington, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo y el tiempo que me brindó para asesorar cada paso del trabajo. A mi asesor de tesis, MSc. Julio Roberto Matute, por su paciencia y confianza hacia mí durante el desarrollo del proyecto, un verdadero mentor de quien cada día aprendí una nueva lección.

RESUMEN

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan exclusivamente bacterias. Se consideran la entidad biológica más abundante en la biósfera con una alta especificidad de huéspedes. Bacterias productoras de biopelículas como *Klebsiella pneumoniae* y *Morganella morganii* suelen representar una grave problemática por su capacidad de adhesión a diversas superficies. Por su parte, *K. pneumoniae* se encuentra en la microbiota de moscas de la fruta, *Anastrepha ludens* y *Ceratitis capitata*, en una relación simbiótica mientras que *M. morganii* actúa como patógeno para ambas. En las plantas de cría masiva de las cepas de sexado genético de *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens*, cuyo objetivo es la producción y liberación de moscas macho estériles como control autocida de la plaga, se ha determinado la aparición de biopelículas de *M. morganii* en diferentes instares del insecto, así como la presencia de *K. pneumoniae* en pupas de envíos internacionales. Conforme a la problemática de contaminación con dichas bacterias emergente en las plantas de cría masiva, el objetivo del estudio fue aislar y analizar cócteles de bacteriófagos líticos, a partir de la suspensión de huevo y humedal artificial para evaluar su capacidad en la inhibición de la formación de biopelículas de *K. pneumoniae* y *M. morganii* como tratamiento alternativo. Se logró aislar tres bacteriófagos silvestres con capacidad lítica específicos para *K. pneumoniae* a partir de la suspensión de huevo previo a la siembra en dieta larval de *C. capitata* y cinco bacteriófagos específicos para *M. morganii* a partir de humedal artificial. Asimismo, se identificaron tres cócteles de fagos para *K. pneumoniae* y cinco para *M. morganii* con capacidad de reducir la formación de biopelículas aún en presencia de los antisépticos Betadine y Betasept.

I. INTRODUCCIÓN

El Programa Moscamed en Guatemala se encarga de la detección y el control de la mosca del Mediterráneo en la región que incluye a Guatemala, Belice y Chiapas, México (“Programa Moscamed Guatemala,” n.d.). Para la generación de áreas libres de la plaga el Programa ha implementado controles mediante la producción y liberación de moscas estériles. Sin embargo, se ha determinado la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en la planta de cría masiva de las cepas del sexado genético de *Anastrepha ludens* así como *Morganella morganii* en la planta de producción de *Ceratitis capitata*. Dichas Enterobacterias presentan un gran desafío para su control y eliminación debido a su capacidad de la formación de biopelículas en diversas superficies.

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son virus que infectan de forma específica a bacterias (Kęsik-Szeloch *et al.*, 2013). Debido a su alta especificidad y abundancia en el ambiente, estos pueden ser empelados para la eliminación del problema de contaminación en la Planta de Moscamed. El uso exclusivo de antisépticos se ha probado presenta una baja eficiencia y puede causar resistencia debido a la capa exopolisacárida de ambas bacterias. Por lo anterior, el siguiente trabajo busca emplear y evaluar cocteles de bacteriófagos aislados de ambientes acuáticos como control microbiológico para la remoción de biopelículas de *K. pneumoniae* y *M. morganii*.

II. OBJETIVOS

A. General

Evaluación y análisis de bacteriófagos líticos aislados de suspensión de huevo previo a la siembra en dieta larval de *Ceratitis capitata*, y de humedal artificial, para inhibir la formación de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae* y *Morganella morganii*.

B. Específicos

1. Aislar y enriquecer bacteriófagos líticos específicos de *K. pneumoniae* a partir de suspensión de huevo previo a la siembra en dieta larval de *C. capitata*, y de *M. morganii* a partir de humedal artificial.
2. Estandarizar condiciones óptimas para formación de biopelículas de *K. pneumoniae* y *M. morganii*.
3. Comparar cócteles de bacteriófagos en la inhibición de formación de biopelículas de *K. pneumoniae* y *M. morganii*.
4. Evaluar la interacción de cócteles de bacteriófagos de *K. pneumoniae* y *M. morganii* con antisépticos comerciales para la inhibición de formación de biopelículas.

III. JUSTIFICACIÓN

La capacidad de formación de biopelícula de *Klebsiella pneumoniae* y de *Morganella morganii* les confiere características de resistencia para su propagación dado el ambiente estructural que se despliega de la matriz extracelular. Entre estas, se incluye la adherencia a diversas superficies y su proliferación en ambientes hostiles. Siendo patógenos oportunistas, su persistencia en el ambiente conlleva la posibilidad del desarrollo de graves infecciones en la población susceptible, especialmente a aquellos bajo condiciones de inmunosupresión. Dada la emergente problemática relacionada al incremento de resistencia a antimicrobianos en bacterias, se demuestra la importancia de la generación de controles microbiológicos contra dichas bacterias. Esto es crucial para evitar su propagación en los diferentes instares de producción, donde introducen efectos detrimentales en los procesos de cría masiva de insectos. En las plantas de cría masiva de cepas de sexado genético, la presencia de altos niveles de *K. pneumoniae* y *M. morganii* en la producción de *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens*, respectivamente, *K. pneumoniae* supone una pérdida económica a nivel de exportación debido a las regulaciones y requerimientos que exigen los clientes internacionales y *M. morganii* produce mortandad en el desarrollo larval. El tratamiento actual para *K. pneumoniae* emplea antisépticos con resultados poco consistentes para control de su propagación y a la formación de biopelículas y para el caso de *M. morganii* se utiliza una solución de HCL y preservantes para inhibir su desarrollo durante el proceso de cría larval. A partir de esto, el tratamiento específico para su control y disminución poblacional puede mejorarse con el uso de bacteriófagos; tomando ventaja de su rol ecológico como depredadores bacterianos.

Por ello, se propone la aplicación de bacteriófagos como una herramienta con alto potencial para el control de *K. pneumoniae* y *M. morganii* presentes en las plantas de cría masiva de cepas de sexado genético de *Ceratitis capitata* y *Anastrepha ludens* mediante la interrupción de la formación de biopelículas o su disrupción misma.

El desarrollo del estudio se encuentra respaldado por el financiamiento del programa PPQ/APHIS/USDA/Medfly Action Program/Guatemala, en cuanto a recursos financieros y materiales. Se cuenta con el apoyo del Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) y Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala conforme al uso de laboratorio equipado para llevar a cabo el proceso de investigación.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Bacteriófagos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan bacterias. Son considerados las entidades de mayor densidad poblacional en la naturaleza (Kęsik-Szeloch *et al.*, 2013). Se estima que, en total, su densidad alcanza entre 10^8 y 10^{10} partículas por mililitro de agua y 10^7 partículas por gramo de tierra en ambientes terrestres (Parasion, Kwiatek, Gryko, Mizak, & Malm, 2014).

Una de las características que definen su eficiencia para control bacteriano es que poseen una alta especialización hacia sus hospederos (Walker, Kropinski, & Lavigne, 2018). Esta característica, junto a su rol ecológico como depredador bacteriano, hacen de los fagos un ente biológico con una alta gama de aplicaciones biotecnológicas. Entre estas, se puede aplicar a posible tratamiento de bacterias con resistencia a antimicrobianos (Górski *et al.*, 2018).

Conforme a su naturaleza viral, los bacteriófagos actúan como parásitos obligados requiriendo células vivas para su proliferación (Matsuzaki *et al.*, 2005). Ellos se adsorben a la pared celular e inyectan su material genético hacia el citosol penetrando la barrera física ejemplificados de forma gráfica en Figura 3. Así, el material genético toma control de la maquinaria celular y se replica dentro del hospedero. A manera que se obtiene una densidad alta de partículas virales se produce lisis celular mediada por endolisinas. O bien, dependiendo de las condiciones a las que se vea expuesto, el genoma viral puede integrarse al genoma de la bacteria a través del ciclo lisogénico (Jamal, Tasneem, Hussain, & Andleeb, 2015). Esto de acuerdo a los diversos mecanismos de infección que pueden presentar hacia el hospedero y las condiciones ambientales en las que se encuentre (Chan & Abedon, 2015).

Generalmente, los bacteriófagos pueden presentar diversas morfologías en cuanto a su tamaño y organización de su material genético (Kasman & Porter, 2019). Consisten en una estructura principal proteica que comprime el material genético, que puede ser ADN o ARN monocatenarios y bicatenarios. Además, pueden estar acompañados de enzimas específicas del virus útiles durante las fases infecciosas del ciclo (Parasion *et al.*, 2014). Se pueden presentar en diversas estructuras, variando características como su capa proteica, cola, y lipoproteínas en su capa externa; y estructura filamentosa, icosaédrica, entre otros. (Keen & Dantas, 2018). Según su morfología y secuencia genómica, los bacteriófagos se pueden clasificar dentro de 22 familias descritas y aprobadas por el Comité Internacional Taxonómico de Virus (ICTV: <https://talk.ictvonline.org/>). La denominación de cada fago se construye según el género de su hospedero bacteriano, la palabra “fago” y un identificador único. Se muestra a continuación en la Figura 1 parte de la clasificación a nivel de

orden y familia de los bacteriófagos según su morfología y material genómico contenido (Matsuzaki *et al.*, 2005).

Orden	Familia	Morfología	Ácido Nucleico	
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>		ADN doble hebra	
	<i>Siphoviridae</i>			
	<i>Podoviridae</i>			
	<i>Tectiviridae</i> ^a			
	<i>Corticoviridae</i> ^a			
	<i>Lipothrixviridae</i> ^b			
	<i>Plasmaviridae</i>			
	<i>Rudiviridae</i>			
	<i>Fuselloviridae</i>			ADN una hebra ARN una hebra ARN doble hebra, segmentado
	<i>Inoviridae</i>			
	<i>Microviridae</i>			
	<i>Leviviridae</i>			
		<i>Cytoviridae</i>		

^a Contenido lipídico
^b Envueltos

(Matsuzaki *et al.*, 2005)

Figura 1. Clasificación de bacteriófagos según morfología y genética.

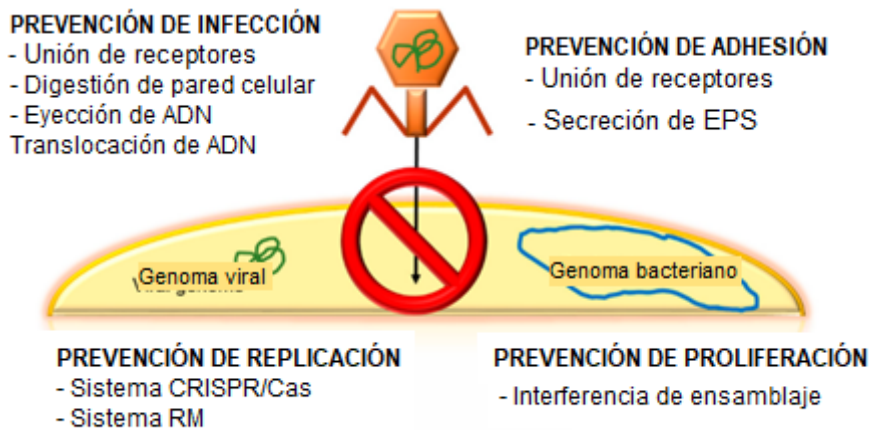
La importancia de aislar y caracterizar bacteriófagos silvestres radica en su capacidad como tratamiento a enfermedades mediadas por bacterias patógenas multidrogasresistentes, su potencial como un banco genético bacteriano, y las posibles aplicaciones en biología molecular y en biología sintética (Donlan, 2001). Su acción es eficaz hacia mecanismos de defensa que produce la bacteria como la formación de biopelículas. En este caso, mediante la producción de enzimas específicas capaces de degradar la matriz exopolisacárida de los biopelículas (Jamal *et al.*, 2015). Así, con una protección compuesta de polímeros extracelulares, la penetración e infección de los bacteriófagos es eficiente al infectar células persistentes permaneciendo en latencia hasta su reactivación metabólica. Especialmente, cuando se encuentra un mayor número de bacteria que componen la biopelícula, amplificando su infección (Harper *et al.*, 2014^a).

1. Historia

La palabra fago proviene del griego *phagein* “que come.” La primera identificación de una infección específica de bacterias sucedió en 1915. Dicho descubrimiento se le atribuye inicialmente al microbiólogo Frederick William Twort (Gu *et al.*, 2012). Luego, en 1917, las observaciones del científico Felix d’Herelle, describieron microorganismos invisibles al ojo humano, antagonistas a

las bacterias patógenas en filtrados de bancos de pacientes con disentería, en París. Esto lo llevó a concluir que aquellos entes eran virus clave para la infección bacteriana. Con ello, demostró una relación entre el título viral y la progresión de la enfermedad mientras que en la recuperación de los pacientes alcanzaba su punto máximo (Pires, Cleto, Sillankorva, Azeredo, & Lu, 2016).

En 1979, se comienza a presentar un aumento en el número de publicaciones relacionadas al estudio de bacteriófagos. Entre 1980 y 1990 se da la revolución biotecnológica que inicia con el desarrollo de técnicas con ADN recombinante, teniendo a los fagos como vectores primarios (Fong *et al.*, 2017). Aun siendo un tema con alto potencial de investigación, el descubrimiento de los antibióticos y su ventajosa actividad de amplio espectro, así como su estabilidad en el proceso de preparación, redireccionó los estudios en cuanto a bacteriófagos (Walker *et al.*, 2018). No obstante, la necesidad por tratamientos eficaces contra bacterias resistentes alrededor del mundo ha devuelto la atención a estos virus de bacterias (Cisek, Dąbrowska, Gregorczyk, & Wyzewski, 2017).



(Domingo-Calap & Delgado-Martínez, 2018)

Figura 2. Principales mecanismos de protección bacteriana contra bacteriófagos.

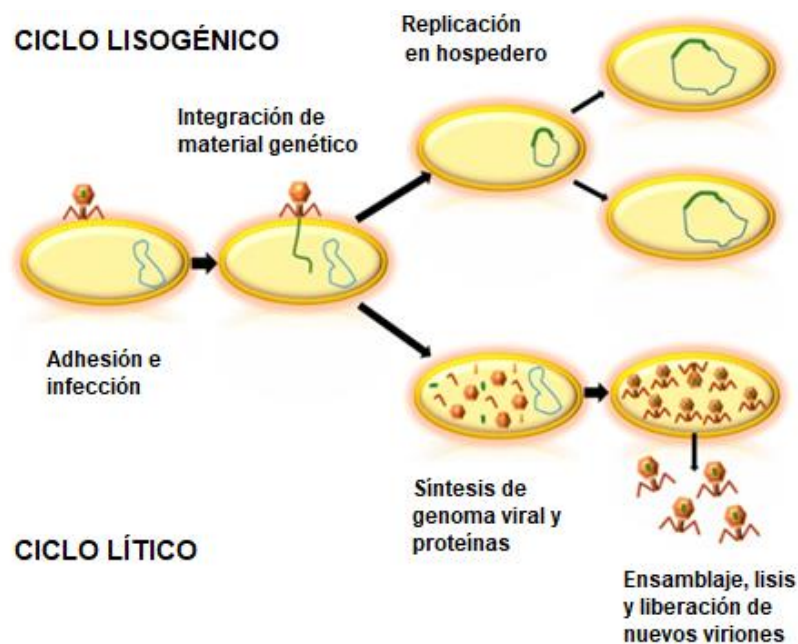
2. Rol ecológico

Los bacteriófagos pertenecen al grupo de organismos más numeroso y con mayor diversidad entre los virus, dominando la biósfera (Dang & Sullivan, 2014). Se estima se encuentra alrededor de 10^7 partículas de fagos en un gramo de tierra y 10^8 - 10^{10} partículas por mililitro de agua. Estos pueden encontrarse en diversos ambientes naturales siendo tierra, agua, desechos, así como en tejido animal y vegetal (Ashelford *et al.*, 2003). Así, su abundancia en el ambiente natural permite el funcionamiento balanceado del ecosistema a nivel microscópico, al ser capaces de alterar las poblaciones microbianas específicas. Se consideran importantes para el ser humano por su

capacidad de interactuar exclusivamente con el microbioma. Siendo actores críticos en el intercambio genético entre bacterias patógenas y no patógenas mediante transducción, surge la posibilidad de su empleo como control (Simms, 2018; Kasman & Porter, 2019). No obstante, existen mecanismos de defensa de parte de las bacterias que deben ser considerados. Se describe en la Figura 2 los mecanismos que pueden emplear las bacterias en defensa a la infección viral. Especialmente se evade la replicación por el empleo del sistema CRISPR/Cas, la infección por receptores y digestión de la pared celular (Domingo-Calap & Delgado-Martínez, 2018).

3. Mecanismo de replicación

Los bacteriófagos logran discernir entre especies bacterianas dada su especificidad, incluso entre cepas de una misma especie. Una vez se ha completado la adsorción al huésped susceptible, según su mecanismo de infección, los bacteriófagos pueden seguir uno de dos vías para replicación: virulentos (líticos) o temperados (lisogénicos) (Abedon, Abedon, & T., 2015). Se muestra en la Figura 3 un esquema de ambos mecanismos partiendo desde la adsorción del fago para inicio de la infección. Por una parte, la característica con mayor provecho de los bacteriófagos líticos es que no se integran al genoma del hospedero, provocando lisis celular en respuesta a la interacción lo cual surge como posible aplicación a infecciones mientras que el lisogénico sí se integra al genoma bacteriano (Chan & Abedon, 2015).



(Domingo-Calap & Delgado-Martínez, 2018).

Figura 3. Ciclos biológicos de desarrollo de bacteriófagos: Mecanismo lítico y lisogénico.

a. Lítico

Los bacteriófagos se adsorben a la superficie bacteriana mediante colas filamentosas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula a infectar (Karumidze *et al.*, 2013). Al adsorberse a la bacteria, el material genético del fago penetra la célula, introduciendo su genoma al interior de la célula hospedera. En el citoplasma, utiliza el metabolismo de la bacteria para su replicación de manera que se puedan ensamblar copias del virión original (Grose & Casjens, 2014). Es decir, la célula proporciona los insumos necesarios para la producción y ensamblaje de nuevos fagos de manera involuntaria (Harper *et al.*, 2014b).

Dentro de la célula los virus producen endolisinas que, en condiciones de alta concentración y presión, causan lisis celular permitiendo que las múltiples réplicas del fago se dispersen al sistema exterior para infectar a una nueva célula bacteriana (Matsuzaki *et al.*, 2005). Las ventajas de su mecanismo se ven reflejadas como aplicación para tratamientos contra bacterias resistentes comprendiendo un enfoque provechoso para el área médica y la industrial (Cisek *et al.*, 2017).

b. Lisogénico

En el ciclo de replicación lisogénica, la infección se basa en integrar el replicón del fago en el genoma del hospedero, o bien, se retiene como un elemento episomal (Matsuzaki *et al.*, 2005). Este permanece como un profago y se replica, transmitiéndose a las células hijas de forma latente. Sin embargo, los profagos pueden redireccionarse al ciclo lítico y lisar la célula huésped en respuesta a cambios de las condiciones ambientales que le provoquen estrés. En biopelículas, dicho mecanismo es crítico para una remoción eficaz dado que permite la infección latente de células persistentes. Cuando estas atraviesan su activación metabólica, el genoma del bacteriófago también lo hace, dirigiéndose hacia su ciclo lítico (Harper *et al.*, 2014).

B. Enterobacterias

Las enterobacterias son una familia de bacilos Gram negativos no esporoformadores. En su mayoría, son anaeróbicos facultativos, fermentadores de azúcares y presentan motilidad mediante flagelos. Su identificación se realiza mediante pruebas de catalasa positiva y oxidasa negativa en medios diferenciales. Esta familia engloba géneros notables, dada su patogenicidad, como *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp. y *Morganella* sp. (León-Izurieta *et al.*, 2016).

1. *Klebsiella pneumoniae*

Aislada por primera vez en 1882 por Friedlander, *K. pneumoniae* es un patógeno oportunista Gram negativo y un grave problema nosocomial a nivel mundial (Claudia Vuotto, Longo, Balice, Donelli, & Varaldo, 2014^a). Pertenece a la familia de Enterobacteriaceae, tiene una estructura no-encapsulada y, a diferencia de varios géneros que engloba esta familia, *Klebsiella* no presenta motilidad (Chung, 2016).

Entre los factores de virulencia que le permiten su supervivencia e inciden directamente en su patogenicidad, se resalta las fimbria de tipo I y III, cápsula antifagocítica (CPS), lipopolisacáridos (LPS) y transportadores de membrana (De Rosa, Corcione, Cavallo, Di Perri, & Bassetti, 2015). Según (Bandeira et al., 2014; Di Martino, Cafferini, Joly, & Darfeuille-Michaud, 2003), los pili de tipo I y III, constituyen un factor esencial para el establecimiento de la bacteria dado que le confieren de una mayor adherencia a superficies abióticas como vidrio y poliestireno mediante la formación de biopelículas. La capacidad de *K. pneumoniae* para la formación de biopelículas fue determinada en 1992 por primera vez *in vivo* por G. Reid a través de microscopía electrónica de células epiteliales de la médula espinal de un paciente con infección urinaria de la bacteria (Claudia Vuotto, Longo, Balice, Donelli, & Varaldo, 2014b).

Se le atribuye a *K. pneumoniae* ser una de las mayores causas de infecciones nosocomiales infectando severamente aquellos pacientes inmunocomprometidos (Karumidze *et al.*, 2013). Dentro del organismo, conforme a su comportamiento oportunista, despliega altos grados de virulencia hacia su hospedero con la capacidad de desarrollar resistencia a antibióticos (Ashurst & Dawson, 2019). En cuanto se establece la infección, la bacteria forma biopelículas, como mecanismo para evadir a las primeras defensas del cuerpo humano (Taha, Connerton, Connerton, & El-Shibiny, 2018). Estas le permiten desarrollarse en un ambiente de protección ante antibióticos y otros factores externos, promoviendo su prevalencia en superficies epiteliales. Así, con el incremento a resistencias a antibióticos, se han encontrado cepas *K. pneumoniae* aisladas que presentan resistencia a gran espectro de Betalactámicos, carbapenems, fluoroquinolonas y sulfanamidas (C. Vuotto *et al.*, 2017).

2. *Morganella morganii*

Patógeno oportunista inusual, *M. morganii* fue aislada por primera vez en 1906 por Morgan *et al.* A partir de un cultivo fecal pediátrico (De, Raj, & Maiti, 2016). Presenta motilidad por flagelos peritricos siendo anaeróbico facultativo no fermentador de lactosa y productor de ureasa (American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *et al.*, 2002). El genoma de la bacteria es de 4

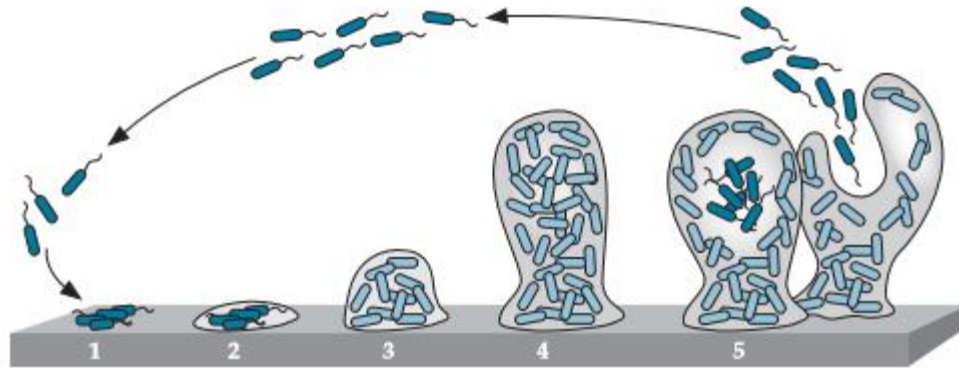
millones de pares de bases (bp, por sus siglas en inglés), 4,000 correspondiendo a las secuencias que codifican sus proteínas (Chen *et al.*, 2012). Por lo general, habita el tracto gastrointestinal de mamíferos, humanos y reptiles siendo parte de la microbiota normal (Yamaki, Omachi, Kawai, & Yamazaki, 2014). Aunque es poco frecuente como causa principal de una infección, puede representar un alto riesgo para personas inmunocomprometidas con heridas post-operatorias (Liu, Zhu, Hu, & Rao, 2016).

a. Patogenicidad

La patogenicidad de *M. morgani* se basa en la adhesión mediante pili de tipo IV y la secreción de ureasas, hemolisinas, y LPS (De la Rosa *et al.*, 2016). Estos factores de virulencia le confieren la particularidad de carácter oportunista; causando infecciones urinarias, sepsis, abscesos, celulitis y bacteremias (De, Raj, Haldar, Mukherjee, & Maiti, 2017). La adhesión es la primera interacción con el patógeno que permite el desarrollo de la formación de biopelícula y, en consecuencia, la colonización de la bacteria en el hospedero. Asimismo (Liu *et al.*, 2016), resaltan la producción de ureasa como factor de aptitud bacteriano que le permite la formación de biopelículas en casos de infección del tracto urinario. Aún si la bacteria no presenta alta patogenicidad, el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos ha incrementado en los recientes años, especialmente en aquellos causantes de enfermedades nosocomiales (Li *et al.*, 2018).

C. Biopelículas

Según (Jamal *et al.*, 2015), las bacterias pueden adherirse de manera efectiva a diversas superficies mediante la producción de biopelículas. Este ambiente consiste en una asociación de microorganismos procariontes y/o eucariotes con un orden estructurado que secretan sustancias poliméricas extracelulares (EPS) mediante las bacterias que los conforman. Se caracteriza por el incremento en la tolerancia a agentes antimicrobianos (de Carvalho, 2018). Según Parasion, 2014, su composición puede darse entre un <2% de proteína, <1% de material genético, 2% de polisacáridos, y hasta 97% de agua. Este último siendo el mayor componente dado que promueve la fluidez del material biológico dentro de la matriz formando canales de transporte. Conforme datos obtenidos de Vasudevan, 2014, la comunidad bacteriana fue descrita por primera vez en la superficie de dientes de un paciente por el alemán Antoni Van Leeuwenhoek en 1683 empleando un microscopio simple, denominándolos como “animáculos” en la superficie dental. El desarrollo de la formación de biofilms en superficies se representa en la Figura 4 en la cual se resalta la relevancia de la secreción de exopolisacáridos para soportar la comunidad unida entre sí (Wilson, Salyers, Whitt, & Winkler, 2011).



(Wilson *et al.*, 2011)

Figura 4. Representación general del ciclo de vida de una biopelícula siendo los pasos: (1) adhesión reversible, (2) síntesis de matriz exopolisacárida, (3) formación de colonias, (4) Maduración y (5) dispersión.

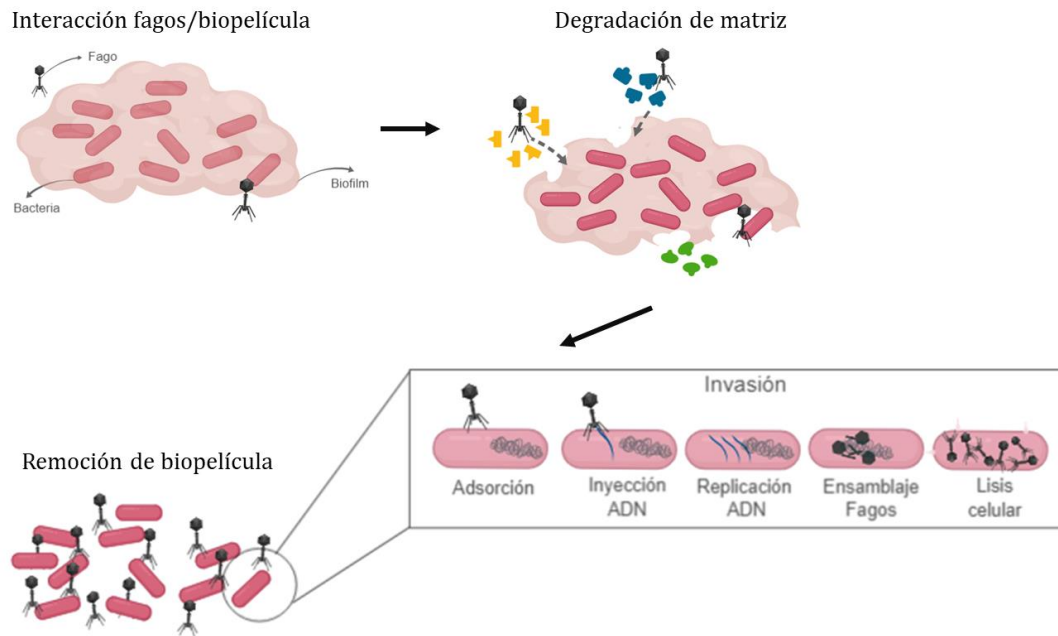
La patogenicidad se determina de acuerdo a su capacidad de formación de biopelícula ya que es un paso esencial para la eficiencia de la infección y el establecimiento celular bacteriano (Bjarnsholt, 2013). Así, las bacterias se logran adherir y organizarse en diversas superficies bióticas como órganos blandos, y abióticas como plástico, látex, silicona, vidrio y varios metales. De esta forma, les confieren protección y un ambiente ideal para el intercambio genético entre distintos géneros bacterianos permitiendo la disminución de susceptibilidad a agentes antimicrobianos (Donlan, 2001). No obstante, el proceso de adherencia dependerá de la superficie del sustrato y de célula. Así, entre mayor aspereza e hidrofobicidad de la superficie, mayor probabilidad que el biopelícula se forme (Di Martino *et al.*, 2003).

1. *Mecanismo*

Entre los mayores problemas que surge en cuanto a la producción de biopelícula, se menciona la protección que le confiere dando como resultado un acceso restringido hacia las células bacterianas (Bjarnsholt, 2013). La estrategia para su control y eliminación debe centrarse, primero, en la eliminación o penetración de la matriz polisacárida. Es importante mencionar la capacidad de los bacteriófagos silvestres de producir depolimerasas, las cuales les confieren la capacidad de degradar la matriz de biopelícula dando acceso directo a interactuar con la bacteria (Karumidze *et al.*, 2013). La producción de dichas enzimas puede lograr la inhibición de proliferación de bacterias formadoras de biopelículas (Parasion *et al.*, 2014). A partir de ello, se presenta en la Figura 5 la interacción esperada entre bacteriófagos y biopelículas en el cual la degradación de la matriz exopolisacárida permite su adsorción a la bacteria

(Vasudevan, 2014). Según Abedon, 2015, la interacción del biopelícula sucede por periodos prolongados y hay un acceso físico y directo con la región objetivo. No obstante, cabe resaltar que su alta especificidad reduce el rango de infección en que puede emplearse (Pei & Lamas-Samanamud, 2014).

El mecanismo de adherencia de bacterias por medio de biopelículas se hace relevante cuando al relacionarse directamente con enfermedades asociadas a hospitales (nosocomiales). Este logra un desarrollo y prevalencia en superficies inanimadas como material quirúrgico, pero también puede adherirse a una herida, sutura o dispositivo médico implantado (Jamal, Tasneem, Hussain, & Andleeb, 2015). Esto representa un riesgo alto de desarrollo de la infección mediante la dispersión de células microbianas patógenas en el huésped. Así, su tratamiento y remoción se ve comprometido con la emergente resistencia a antimicrobianos de cepas bacterianas. Para biopelículas, dicha la capacidad de sobrevivir en presencia de altas dosis de antibióticos se denomina recalcitancia la cual permite altas recurrencias de infección con bacterias oportunistas (Ramos-Gallardo, 2016).



(Vasudevan, 2014) Biorender.

Figura 5. Interacción de bacteriófagos con biopelícula.

2. Programa Moscamed

El Programa Moscamed en Guatemala se encarga de la detección y control de la mosca del Mediterráneo en la región de Guatemala, Belice y Chiapas, México. Se estableció a finales de la década de 1970 siendo una unidad descentralizada del Ministerio de Agricultura, Ganadería y

Alimentación. El mayor objetivo de la entidad sobre la plaga de la mosca del Mediterráneo es la protección a la producción frutícola para así generar áreas libres que puedan comercializar sus productos que alcancen los requisitos para exportación (Enkerlin *et al.*, 2017).

Entre sus mecanismos de control se resalta la producción y liberación de moscas macho estériles como control autocida de la plaga. Para ello, se crían de forma masiva machos estériles iniciando desde el estadio de huevecillos. Para su empleo a nivel comercial, es requerido mantener los estándares de calidad de los insectos producidos siendo clave el manejo apropiado de la limpieza y desinfección desde el inicio del proceso (“Programa Moscamed Guatemala,” n.d.).

V. METODOLOGÍA

A. Sitio de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio del Departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala empleando muestras de agua proveniente de la suspensión de huevo previo a la siembra en dieta larval de *M. morganii* recolectadas de la planta El Pino de del programa Moscamed y muestras de agua obtenidas de humedal artificial en Guatemala.

B. Sujetos de estudio

Se trabajó con bacteriófagos de *K. pneumoniae* aislados de muestras agua de suspensión de huevo de *C. capitata* recolectadas planta El Pino del Programa Moscamed ubicada en km. 47.5 carretera a El Salvador, Parque Nacional Laguna El Pino Barberena, Santa Rosa, Guatemala. Así como bacteriófagos de *M. morganii* aislados de muestras de agua de un humedal artificial en Guatemala. El tratamiento de susceptibilidad se empleó en una cepa de *K. pneumoniae* secuenciada obtenida de la superficie de huevos de *A. ludens* y una cepa de *M. morganii* aislada de la superficie de bandejas durante el tercer estadio (larva) de la Planta Moscamed El Pino.

C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

Cuadro 1. Resumen de enfoque de modelos combinados de dos etapas aplicado al estudio.

Métodos	Diseño	Enfoque	Tipo
Ensayo cristal violeta, curvas de crecimiento al inverso	Cuantitativo	Exploratorio	Experimental comparativa

D. Tipo y tamaño de muestra

Quince muestras que corresponden a la suspensión de huevo de *C. capitata* de colonias base y machos térmicos y bandejas de dieta para la producción de larvas de la planta El Pino de Moscamed ubicada en km. 47.5 carretera a El Salvador, Parque Nacional Laguna El Pino Barberena, Santa Rosa, Guatemala. Y dos muestras de agua obtenidas de humedal artificial en Guatemala.

E. Criterios de inclusión y exclusión

1. Inclusión

- Fagos que presenten actividad lítica.
- Fagos que presenten actividad lítica por inducción con radiación
- Fagos que presenten placas circulares.
- Si el cóctel de fagos presenta mayor efectividad como inhibidor.

2. Exclusión

- Fagos que presenten lisogenia.
- Fagos que no presenten circunferencia.
- Si el cóctel de fagos presenta menor efectividad como inhibidor.

F. Variables

Cuadro 2. Variables empleadas para el estudio.

Variable	Descripción	Tipo	Unidades de medición
Tiempo	Cantidad de tiempo para crecimiento de bacterias y formación de biopelícula	Cuantitativa independiente	h
Concentración de sales	Cantidad de CaCl ₂ y MgSO ₄ añadido al medio de crecimiento	Cuantitativa independiente	μM
Contenido de medio	Proporción de medio para formación de biopelícula	Cuantitativa independiente	mL
Contenido de aeración	Proporción de oxígeno disponible para crecimiento de bacterias	Cuantitativa independiente	cm ³
Nivel de agitación	Velocidad de agitación para crecimiento bacteriano y formación de biopelícula	Cuantitativa independiente	g

G. Hipótesis

Ho: El cóctel de bacteriófagos líticos aislados de suspensión de huevo de colonias base y machos térmicos de *C. capitata* y de muestras de agua humedal artificial no aumenta la inhibición de formación de biopelícula de *K. pneumoniae* y *M. morgani*, respectivamente.

Ha: El cóctel de bacteriófagos líticos aislados de suspensión de huevo de colonias base y machos térmicos de *C. capitata* y de muestras de agua humedal artificial aumenta la inhibición de formación de biopelícula de *K. pneumoniae* y *M. morgani*, respectivamente.

H. Instrumentos de medición

No aplica.

I. Procedimiento

Se muestra en la Figura 6 un esquema sobre el proceso realizado en el estudio.

1. Aislamiento de bacteriófagos

- Se recolectaron 150mL de suspensión de huevo *C. capitata* de contenedores de las diferentes colonias de la Planta de Moscamed. Se tomó una bolsa estéril de muestra de alimentos y sumergió en contenedor seleccionado para tomar muestra de agua utilizando guantes de protección.
- En tubo cónico de 50 mL, se agregó 1 mL de caldo LB 10X enriquecido con CaCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM, 1 mL de *K. pneumoniae* obtenida de Moscamed (10⁸ ufc/mL) en fase logarítmica y 9mL de suspensión de huevo.
- Se incubó por 16 h a 37°C en agitación constante de 120rpm.
- Tras incubación, se agregaron 200 µL de cloroformo. Agitó moderadamente e incubó a 4°C por 15 min.
- Se filtró el lisado con una membrana estéril de 0.22 µm.
- El procedimiento se repitió para *M. morgani*.

a. Prueba de puntos

- Se precalentó agarosa LB al 0.7%, enriquecido con CaCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM y adicionó a 1 mL de bacteria en fase logarítmica, a 45 °C en baño María a tubo de 9 mL. Se agregó 1 mL del lisado y mezcló, manteniendo una temperatura de 45 °C.
- Se prepararon placas con agar base LB enriquecido con calcio y 1.5% de agar.

- La mezcla de agar suave derretido se vertió sobre agar base solidificado e incubó a 37 °C por 16 h.
- Se ubicó las placas de lisis de bacteriófagos por medio de estereoscopio y marcó. Se identificaron las morfologías de cada lisis.
- Se tomó una alícuota de placa ubicada con puntas estériles de 10 µL de cada morfología distinta e inoculó en 5mL de LB fortificado con CaCl₂ y 120 µL de bacteria. Se incubó a 37°C por 2h.
- Se agregaron 50 µL de cloroformo, se agitó en vórtex e incubó a 4°C por 1h.
- Se realizaron diluciones seriadas con buffer de fagos e incubaron en prueba de agar suave.
- El procedimiento fue repetido hasta la obtención de placas de lisis homogéneas.
- Al obtener placas de lisis homogéneas, se agregaron 200 µL de cloroformo a cajas Petri y se recuperó capa de agar suave utilizando un esparcidor microbiológico estéril.
- Se centrifugó agar suave con cloroformo a 6000 xg por 20 min. Se aspiró sobrenadante con jeringa y se filtró por membrana de 0.22 µm.
- Se repitió el procedimiento hasta obtención de concentración deseada de bacteriófagos líticos.
- El procedimiento se repitió para la obtención de aislamiento de bacteriófagos de *M. organii*.

b. Aumento de título viral

- Se agregó 1mL de caldo de *K. pneumoniae* logarítmico a 15mL de caldo LB enriquecido con CaCl₂ y MgSO₄ en Erlenmeyer de 125 mL.
- Se adicionaron 150 µL de bacteriófagos aislados de placas e incubaron a 37 °C en una incubadora con agitación a 120rpm.
- Cada tres días, se agregó 1 mL de *K. pneumoniae* logarítmico fresco y 5 mL de caldo LB enriquecido con CaCl₂ fresco.
- Se cuantificó el OD600 por espectrofotometría utilizando celdas de cuarzo.
- Tras el aumento de título, se centrifugó a 6000 rpm por 5 min y filtró cultivo por membrana con diámetro de 0.22 µm.
- El procedimiento se repitió para la obtención de aislamiento de bacteriófagos de *M. organii*.

2. Determinación de título de bacteriófagos

a. Prueba de puntos

- Se agregó 900µL de caldo LB con 100µL de cultivo filtrado en tubo Eppendorf de 1.5mL.
- Se realizaron diluciones seriadas de aislado de fagos en tubos cónicos de 15mL. Se emplearon 3 tubos para cada fago reduciendo la cantidad de cultivo con factor de dilución 1:10.
- Se agregó 2 mL de filtrado de fagos, de cada dilución, y 2mL de cultivo *K. pneumoniae* de 24 h. en tubo de 1.5mL. Se adicionó CaCl₂ 10mM y MgSO₄ 10mM y se mantuvo por 10-30 min a temperatura ambiente.
- Se agregaron 3mL de agarosa suave precalentada a 50°C.
- Se vertió la mezcla en placa de medio LB agar sólido. Se permitió solidificar por 20 min e incubar a 37°C por 24h con placa invertida. Se rotuló cada caja con la identificación de cada fago y número de dilución.
- se repitió procedimiento para cada filtrado de bacteriófago.
- Al pasar incubación, se calculó el título de Unidades Formadoras de Placas por mL en la suspensión original según la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{\text{número de placas de lisis}}{\text{volumen inóculo} * \text{dilución}}$$

b. Re-aislamiento de fagos

- Se ubicaron las placas de lisis de bacteriófagos por medio de estereoscopio y se colocó marcaje. Se identificaron las morfologías de cada lisis.
- Se agregaron 200 µL de cloroformo a cajas Petri para recuperar la capa de agar suave utilizando un esparcidor microbiológico estéril.
- Se centrifugó el agar suave con cloroformo a 6000 xg por 20 min. Se aspiró el sobrenadante con jeringa y se filtró por membrana de 0.45µm.
- Se repitió procedimiento hasta obtención de concentración deseada de bacteriófagos líticos.

c. Enriquecimiento para aumento de título de fagos

- Se agregaron 5 mL de caldo de *K. pneumoniae* logarítmico a 325 mL de caldo LB enriquecido con CaCl₂ en Erlenmeyer de 500 mL.

- Se adicionaron 2.5 mL de bacteriófagos aislados de placas y se incubaron a 37°C y 120 rpm en incubadora con agitación.
- Cada cuatro días, se agregaron 5 mL de *K. pneumoniae* de la fase logarítmica y 10 mL de caldo LB enriquecido con CaCl₂ fresco.
- Cada semana, se repitió la cuantificación de OD600 en Nanodrop utilizando celdas de cuarzo.
- Tras el aumento de título viral, se filtró bacteriófagos de cultivo por medio de filtros diámetro de 0.22 µm en tubos cónicos de 50 mL.
- El procedimiento se repitió para la obtención de aislamiento de bacteriófagos de *M. morganii*.

3. Determinación de condiciones óptimas para biopelícula

a. Curva de biopelículas

- Se mezclaron 100 µL de caldo de 24 h de *K. pneumoniae* con 5 mL de caldo LB en un tubo cónico de 15 mL.
- Los tubos se colocaron en posición inclinada e incubaron a 37 °C a 120 rpm por 4 h en incubadora con agitación.
- Tras 4 h de incubación, se adicionaron 250 µL de caldo LB en pozos de microplaca de 96 pocillos.
- Se agregó una secuencia de cultivo de bacteria con los siguientes volúmenes: 20, 40, 60 y 80 µL en cuadruplicado de forma descendente en la microplaca. Se realizó un mapa de carga.
- Se colocó la tapadera de la microplaca y se selló con Parafilm. Se incubó a 37 °C por 24 h inmovilizada.
- Tras incubación, se invirtió microplaca y realizaron lavados con poca presión de agua, y se verificó la formación de biopelícula a contraluz.
- El procedimiento se repitió para la obtención de aislamiento de bacteriófagos de *M. morganii*.

b. Ensayo Cristal Violeta

- Se preparó una solución de cristal violeta al 5% (v/v) y ácido acético 0.1% (v/v)
- Se adicionaron 270 µL de solución cristal violeta a cada pozo contenido de muestra. Se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se colocaron a 37 °C para secado por 15 min.

- Se adicionaron 270 μ L de solución ácido acético al 0.1% por 10 min a temperatura ambiente.
 - Se realizaron lecturas de pozos en lector de microplacas de 96 pocillos a longitud de onda 600 nm empleando software Gen 5 para análisis de cuantificación.
 - Se retiró la placa y se descartó en el recipiente de desechos biológicos.
 - Se repitió procedimiento con condiciones de medio LB variable.
- c. Pruebas cruzadas de biopelícula vs fagos
- Se agregó cantidad óptima establecida de *K. pneumoniae* de la fase logarítmica a 250 μ L de caldo LB en pozos de microplaca de 96 pocillos.
 - Se adicionó el volumen de cultivo de bacteriófagos aislados en cuádruplicado según mapa diseñado de pozos.
 - Se colocó la tapadera de microplaca y se selló con Parafilm. Se incubó a 37°C por 24h inmovilizada.
 - Tras incubación, se invirtió microplaca y realizó lavados con poca presión de agua. Se verificó la formación de biopelícula a contraluz.
 - Se repitió el procedimiento completo para cócteles establecidos.
 - El procedimiento se repitió para la obtención de aislamiento de bacteriófagos de *M. organii*.
- d. Ensayo Cristal Violeta
- Se preparó solución de cristal violeta al 5% (v/v) y ácido acético 0.1% (v/v).
 - Se adicionaron 270 μ L de solución cristal violeta a cada pozo contenido de muestra. Se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se colocó a 38 °C para secado por 15 min.
 - Se adicionaron 270 μ L de solución ácido acético al 0.1% (v/v) por 10 min a temperatura ambiente.
 - Se realizó la lectura de pozos en lector de microplacas de 96 pocillos a longitud de onda 600 nm utilizando el software Gen 5 para análisis de cuantificación.
 - Se retiró la placa y descartó en recipiente de desechos biológicos.
 - Se repitió el procedimiento completo para cócteles establecidos.

- e. Pruebas cruzadas de biopelícula vs fagos con antisépticos
- Se agregó cantidad óptima establecida de *K. pneumoniae* de la fase logarítmica a 250µL de caldo LB en pozos de microplaca de 96 pocillos con antiséptico Betadine y Betasept a 5ppm, por separado.
 - Se adicionó cantidad de cultivo de bacteriófagos aislados en cuadruplicado según mapa diseñado de pozos.
 - Se colocó la tapadera de microplaca y selló con Parafilm. Se incubó a 37°C por 24h inmovilizada.
 - Tras incubación, se invirtió microplaca y realizó lavados con poca presión de agua. Se verificó la formación de biopelícula a contraluz.
 - Se repitió el procedimiento completo para cócteles establecidos.
 - El procedimiento se repitió para la obtención de aislamiento de bacteriófagos de *M. morgani*.
- f. Ensayo Cristal Violeta
- Se preparó solución de cristal violeta al 5% (v/v) y ácido acético 0.1% (v/v).
 - Se adicionaron 270µL de solución cristal violeta a cada pozo contenido de muestra. Se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se colocó a 38°C para secado por 15 min.
 - Se adicionaron 270µL de solución ácido acético al 0.1% por 10 min a temperatura ambiente.
 - Se realizó la lectura de pozos en lector de microplacas de 96 pocillos a longitud de onda 600 nm utilizando el software Gen 5 para análisis de cuantificación.
 - Se retiró la placa y descartó en recipiente de desechos biológicos.
 - Se repitió el procedimiento completo para cócteles establecidos.
4. Selección de bacteriófagos
- Según lecturas de microplacas de 96 pocillos en pruebas de infectividad, se seleccionaron los bacteriófagos más efectivos.
 - Se comparó la acción efectiva de bacteriófagos individuales y en cócteles.

Evaluación y análisis de bacteriófagos silvestres para la inhibición de formación de biofilm de *Klebsiella pneumoniae* y *Morganella morganii*

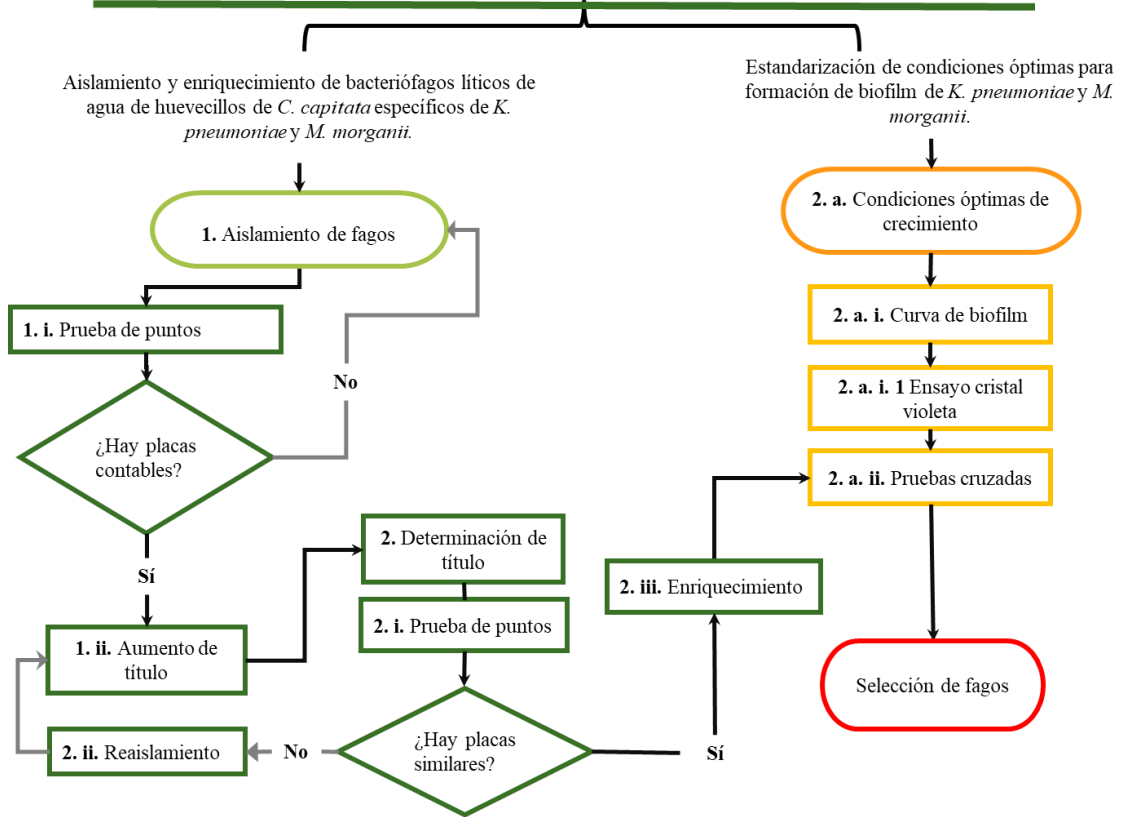


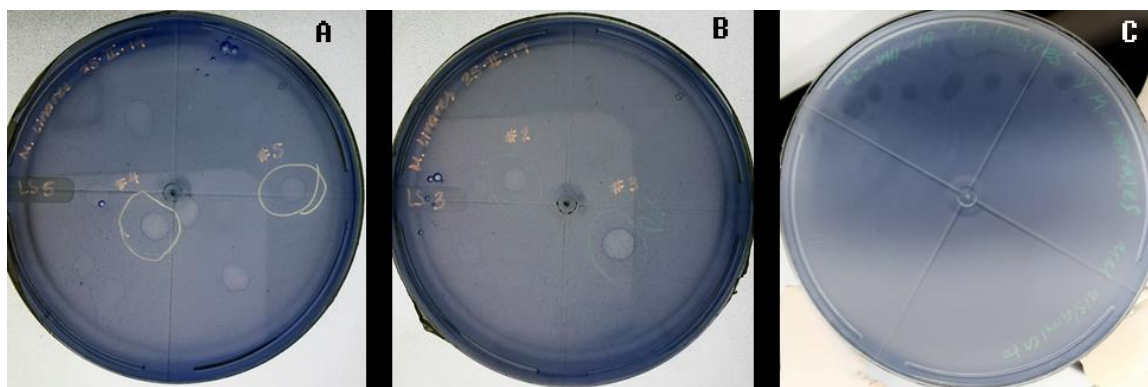
Figura 6. Flujo de procesos de métodos descrito para el estudio.

VI. RESULTADOS

A. Aislamiento de fagos

Se diferenciaron placas de fagos a partir de su morfología mediante una prueba de puntos con el objetivo de seleccionar los fagos a purificar y enriquecer. Se obtuvo formación de placas inhibitorias de formación de biopelículas de diversas morfologías para cada una de las bacterias. Se muestra en la Figura 7(A) la presencia de placas delineadas por fagos lisogénicos e inhibición en placas simétricas de fagos líticos para *K. pneumoniae* referidos como LS5φ4 y LS5φ5. El diámetro para ambos se encuentra entre (4.4, 4.6) mm. Para (B) se muestra una placa circular con bordes definidos identificada como LS5φ3 de fagos líticos para *K. pneumoniae* que presenta un diámetro 4.6mm. Se presenta placas muy diversas en morfología y diámetro de fagos líticos de *M. morganii* aislados de humedal artificial MMφ con diámetro variable entre 3.7 a 4.8 mm (C).

Figura 7. Visualización de placas de fagos líticos en césped bacteriano.



Prueba de puntos en agarosa suave. Siendo, (A) fagos líticos de *K. pneumoniae* aislados de suspensión de huevo de *C. capitata* nombrados como LS5φ4 y LS5φ5 con diámetro 4.4 a 4.6 mm, respectivamente; (B) fagos líticos de *K. pneumoniae* en suspensión de huevo nombrado LS5φ3 presentando un diámetro de 4.6 mm; y (C) fagos líticos de *M. morganii* en humedal artificial identificado como MMφ con un diámetro 3.7 a 4.8 mm.

B. Título viral

Se realizaron pruebas de puntos para determinar el título viral de las muestras de fagos aislados enriquecidos. Se evaluó un total de seis fagos para *M. morganii* y doce para *K. pneumoniae* para alcanzar un mínimo de título viral que permitiera emplearlo en pruebas de infección según las Unidades Formadoras de Placas (UFP). Tras el enriquecimiento y purificación de los fagos, se seleccionaron los fagos líticos aislados del lisado original LS5φ5 de *K. pneumoniae* identificados como KPφ1, KPφ2, KPφ3, KPφ4, KPφ6 y KPφ5. Así también, se nombraron los aislados de MMφ

como MMφ1, MMφ2, MMφ3, MMφ4, MMφ5, MMφ6. Se muestran los resultados con mayor relevancia en la sección de anexos así como los UFP determinados para cada aislado de fago en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Valores en log UFP/mL de fagos aislados según número de placas de lisis formadas.

Fago	Dilución	No. placas	Log UFP /mL	\bar{x} Log UFP/mL
KPφ1	1.00E-04	8	5.903	7.009
	1.00E-06	13	8.114	
KPφ2	1.00E-04	9	5.954	6.954
	1.00E-06	9	7.954	
KPφ3	1.00E-06	11	8.041	8.041*
MMφ1	1.00E-02	15	4.176	5.760
	1.00E-03	7	4.845	
	1.00E-04	8	5.903	
	1.00E-06	13	8.114	
MMφ2	1.00E-02	3	3.477	4.628
	1.00E-04	6	5.778	
MMφ3	1.00E-03	6	4.778	9.017
	1.00E-11	18	13.255	
MMφ4	1.00E-02	5	3.699	4.625
	1.00E-03	5	4.699	
	1.00E-04	3	5.477	
MMφ5	1.00E-04	2	5.301	5.301*

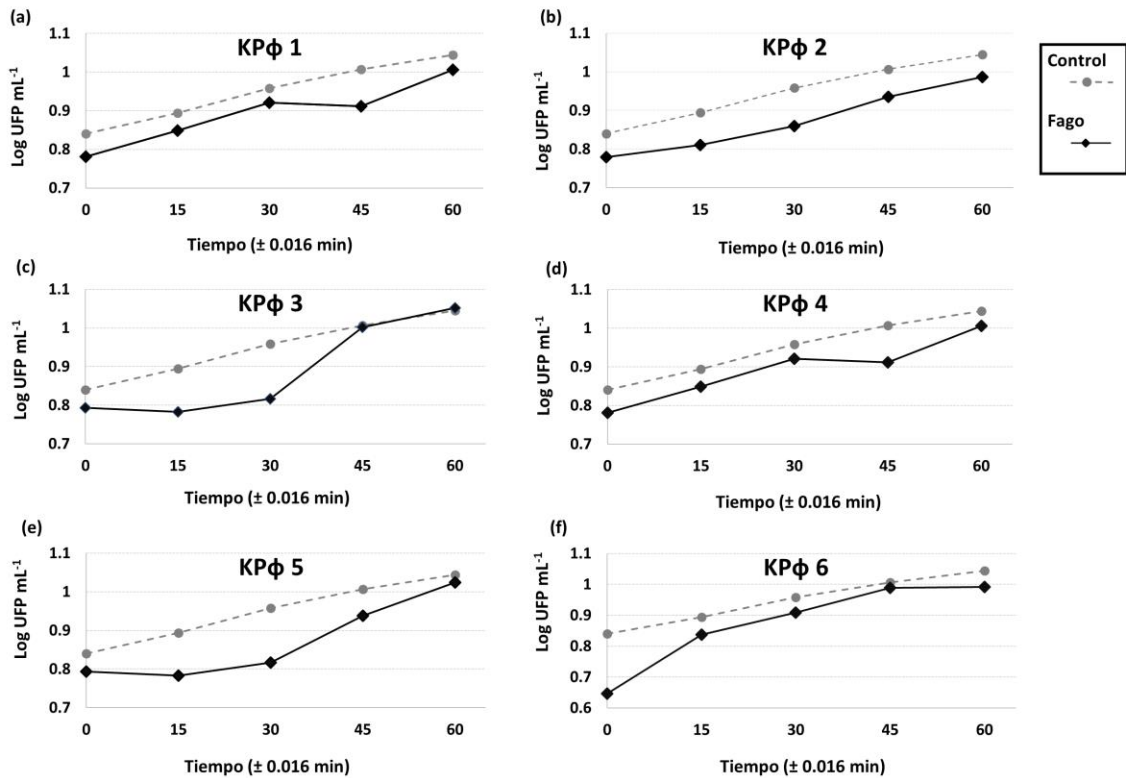
Conteo de placas de lisis en prueba de puntos en agarosa suave empleando diluciones seriadas hasta 1.0E-11. Se muestran los valores de Unidades Formadoras de Placas (UFP) en log para cada uno y los valores medios para cada aislado de fagos empleando el cálculo en página 17. (*) valores individuales por falta de datos. Con número de placas de lisis ≥ 10 se considera $\pm 10\%$ de error.

C. Velocidad lítica

Para la selección de los fagos con mejor capacidad lítica se realizaron curvas de muerte mediante su exposición al tratamiento con fagos por 60 minutos. Se evaluó el crecimiento celular bacteriano por medición de la densidad óptica a 600 nm. Se aplicó la relación entre densidad óptica y conteo celular descrito en Zhang *et al.* (2014) y se transformaron los valores a base logarítmico. Se aprecia en la figura 8 los resultados del tratamiento con fagos para *K. pneumoniae*. El cultivo bacteriano tratado con KPφ1 y KPφ2 presentó conteo celular menor al control representado en línea punteada gris; sin embargo, presenta un comportamiento lineal en el tiempo evaluado. Para el tratamiento con KPφ3 se observa una disminución en el OD600 en los primeros 45 minutos, sin embargo, logra alcanzar un conteo mayor al control a los 60 minutos. Para los tratamientos con KPφ4, KPφ6 y KPφ5 se

observa la disminución de la densidad óptica que permanece por debajo de los niveles del control sugiriendo una disminución en la proliferación celular. Para KPφ4 es más evidente el retraso en su efectividad mientras que para KPφ5 desde un inicio muestra una disminución en la proliferación celular. Para KPφ6 la disminución de OD600 después de los 45 minutos sugiere que la infección tiene un tiempo más retardado que en los anteriores.

Figura 8. Efectos de tratamiento con fagos en células bacterianas de *K. pneumoniae* conforme al tiempo

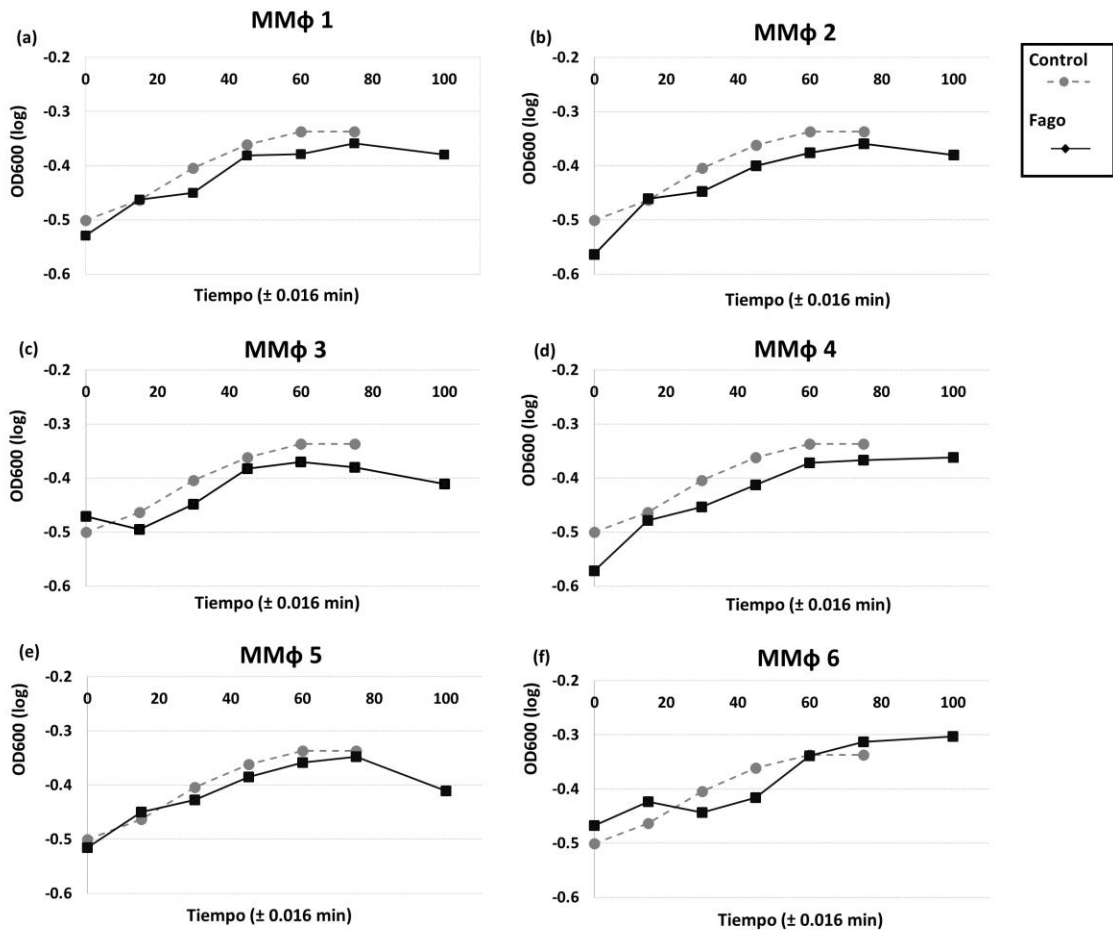


Curva de muerte a partir de conteo celular. Se muestra los valores en log de UFP/mL de muestra adicionada con 250 μ L de tratamiento con fagos lítico aislado y 25 mL de bacteria en inicios de fase logarítmica. Control (círculos grises): cultivo de bacteria en inicios de fase logarítmica sin tratamiento de fagos. Efectos en conteo celular (rombos negros) del tratamiento con fagos: (a) de fago KPφ1 (b) de fago KPφ2 (c) de fago KPφ3 (d) de fago KPφ4 (e) de fago KPφ5 (f) de fago KPφ6.

Para los fagos seleccionados de *M. morgani* se realizó la curva descrita en Figura 9. Se transformaron los valores a base logarítmico. Se muestra un crecimiento lineal en los primeros 60 minutos para el control (líneas punteadas; gris) mientras que el cultivo bacteriano con tratamiento de fagos MMφ1, MMφ2, MMφ3, MMφ4 y MMφ5 muestra una disrupción en la linealidad, así

como un descenso de OD₆₀₀ al final del período de evaluación. El tratamiento con el fago MMφ6 presentó una medición de OD₆₀₀ poco estable y cercano a los niveles de crecimiento del control representados en el conteo celular de la Figura 9. Por lo cual, el último fue descartado para pruebas de infección posteriores. No se realizó una relación entre densidad óptica (OD₆₀₀) y conteo celular (UFP/mL) para *M. morganii*.

Figura 9. Efectos en la densidad óptica conforme al tiempo en curva de muerte para *M.morganii* con tratamiento de fagos.

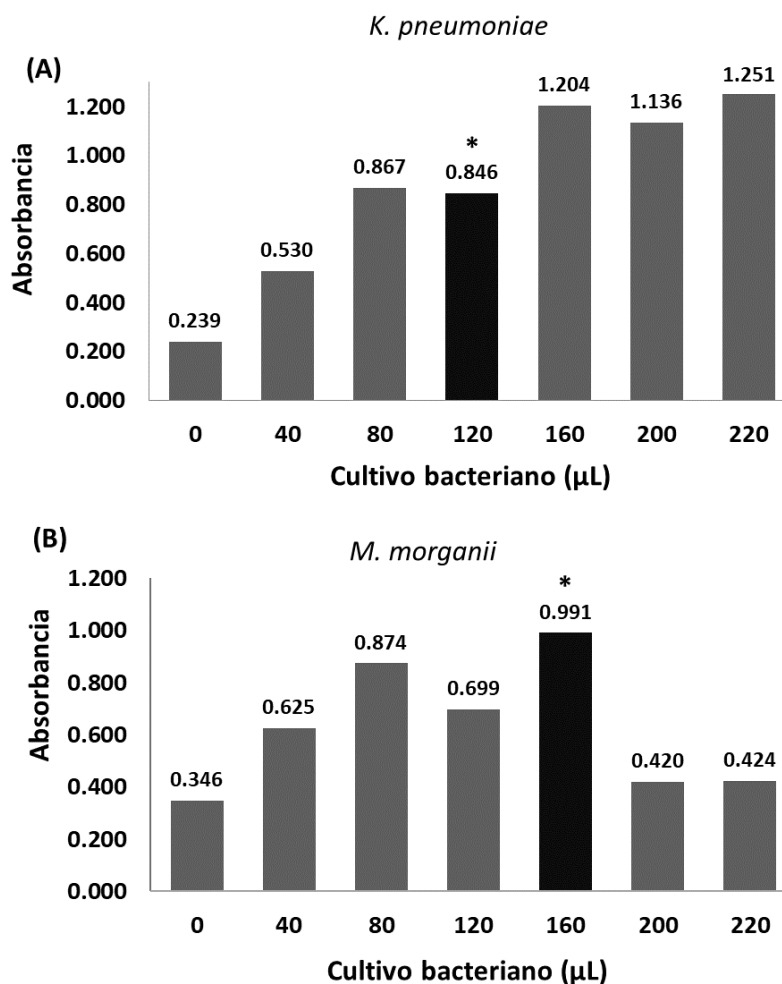


Curva de muerte a partir de densidad óptica (OD₆₀₀). Se muestra los valores en log de OD₆₀₀ de muestra adicionada con 250 μL de tratamiento con fagos lítico aislado y 25 mL de bacteria en inicios de fase logarítmica. Control (círculos grises): cultivo de bacteria en inicios de fase logarítmica sin tratamiento de fagos. Efectos en densidad óptica (rombos negros) del tratamiento con fagos: (a) de fago MMφ1 (b) de fago MMφ2 (c) de fago MMφ3 (d) de fago MMφ4 (e) de fago MMφ5 (f) de fago MMφ6.

D. Optimización

a. Biopelículas

Figura 10. Comparación de formación de biopelículas totales por volumen de cultivo bacteriano añadido.



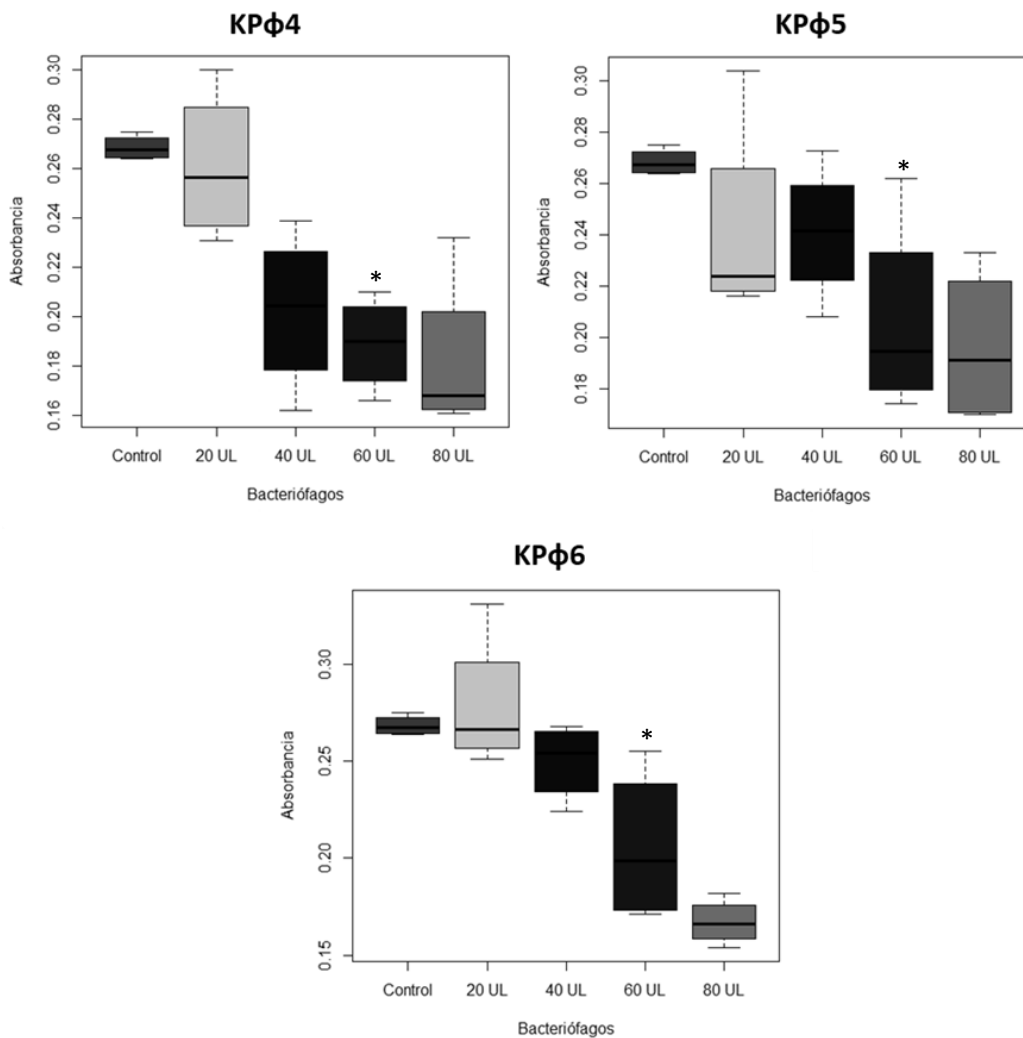
Medición de absorbancia según volumen de cultivo bacteriano realizado a 600nm. Se muestra el valor máximo (*) seleccionado en 120 μL de cultivo bacteriano para la formación de biopelícula de *K. pneumoniae* y 160 μL para *M. morganii*.

La optimización de biopelículas permitió la determinación de valores mínimos de volumen requeridos de bacteria y medio para una formación de biopelículas en microplacas de 96 pocillos. Se construyeron curvas de formación de biopelículas a partir de los niveles de biopelículas totales según el volumen añadido de cultivo bacteriano en fase logarítmica (0.4 OD₆₀₀), mostradas en la

Figura 10. Se consideraron confiables los niveles de biopelículas totales < 1.0 , considerando el rango del equipo Biotek Elx800. En la Figura 10, es posible observar mayor crecimiento de biopelícula por debajo de los límites de medición con 120 μL de cultivo de bacteria y 120 μL de medio fresco para *K. pneumoniae* mientras que valores de 160 μL de cultivo de bacteria y 80 μL de medio fresco para *M. morgani*.

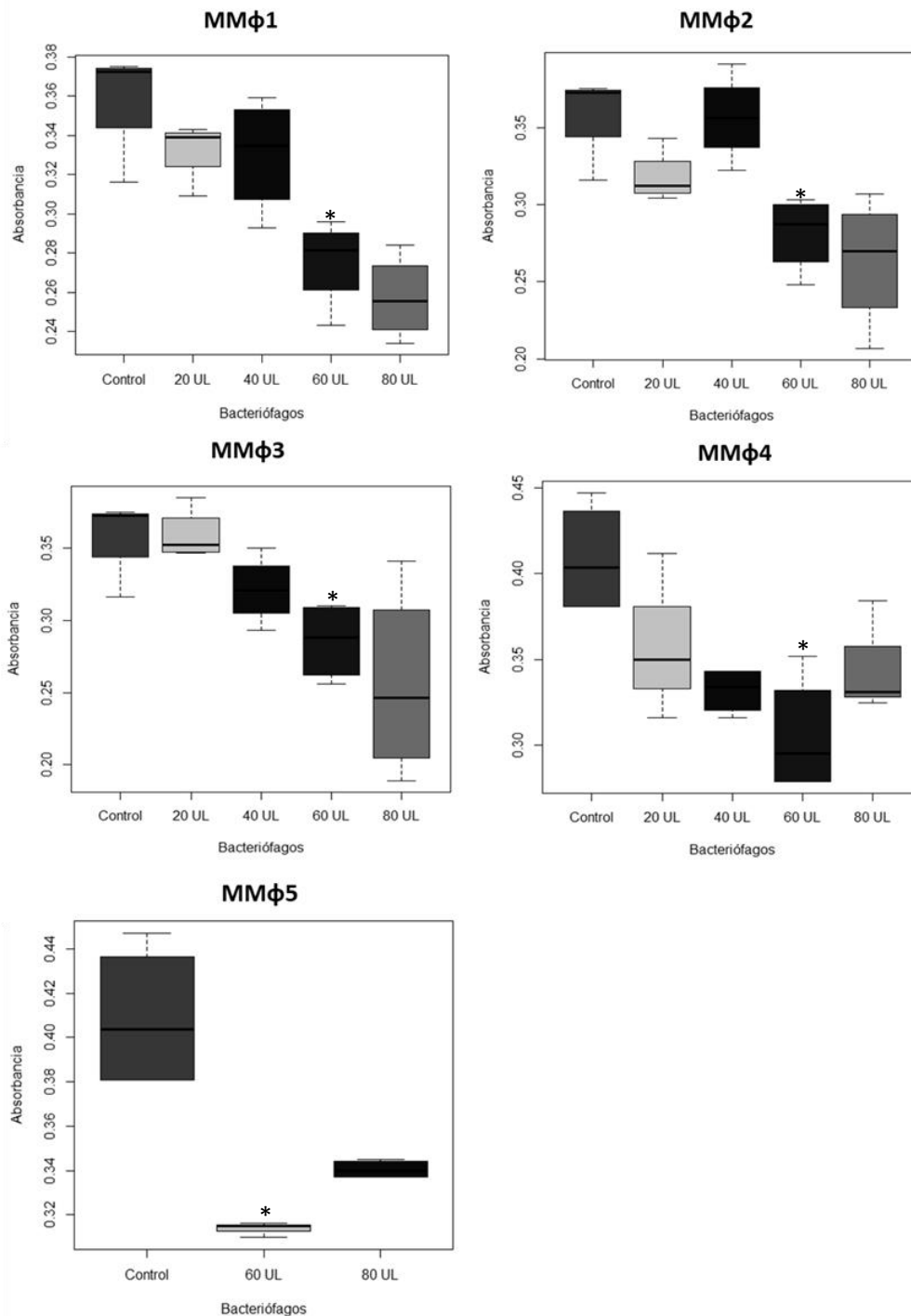
b. Fagos

Figura 11. Comparación de formación de biopelículas totales conforme a volúmenes tratamiento con fagos de *K. pneumoniae*



Representación gráfica de medianas para tratamiento con fagos. Se empleó cuatro variantes en volumen de 20-80 μL de tratamiento para fagos KPφ4, KPφ5 y KPφ6, de izquierda a derecha. Se obtuvo disminución constante en la absorbancia con 60 μL (*) del tratamiento.

Figura 12. Comparación de formación de biopelículas totales conforme a volúmenes tratamiento con fagos de *M. morgani*.



Representación gráficas de medianas para tratamiento con fagos. Se empleó cuatro variantes en volumen de 20-80 μ L de tratamiento para fagos MMφ1, MMφ2, MMφ3, MMφ4 y MMφ5, de izquierda a derecha. Se obtuvo disminución constante en la absorbancia con 60 μ L (*) del tratamiento.

Se realizaron pruebas en microplacas de 96 pocillos con variación de cuatro volúmenes de fagos añadidos a cultivo de bacteria en medio fresco ara determinar el valor mínimo de volumen de infección. El tratamiento para *K. pneumoniae* con 20 μ L para todos los fagos KP ϕ 4, KP ϕ 5 KP ϕ 6 presentó alta dispersión entre sus valores y poca diferencia con la media del control. Asimismo, se obtuvo una diferencia aparente con el valor medio de volumen de 60 μ L como se muestra en la Figura 11. Por otro lado, se indica poca variación entre las medias entre los volúmenes 60 – 80 μ L. Para *M. morgani* se muestran las medias de los tratamientos en la Figura 12. La adición de 20-40 μ L en los fagos MM ϕ 1, MM ϕ 2 y MM ϕ 3 no presentaron diferencia aparente con la media del control. En cambio, sí se observa para los volúmenes 60-80 μ L exceptuando los fagos MM ϕ 4 y MM ϕ 5 que presentaron mayor inhibición solamente con 60 μ L.

E. Pruebas de infección

Se evaluó la formación de biopelículas mediante la cuantificación por ensayo de cristal violeta para comparar fagos con mayor efectividad de inhibición. Se preparó una microplaca de 96 pocillos con los distintos tratamientos compuestos por cada fago aislado y enriquecido. Se realizaron tratamientos con fagos individuales y mezclas entre cada uno. Las pruebas con tratamiento de fagos de *K. pneumoniae* mostraron una mayor disminución en los niveles de biopelícula formados para el fago KP ϕ 6, seguido de KP ϕ 4 y por último KP ϕ 5. La mezcla que mostró resultados con mayor diferencia conforme al control fue Mc que corresponde a la mezcla KP ϕ 4+ KP ϕ 6 asimismo una menor dispersión. La mezcla de fagos Me (KP ϕ 1+ KP ϕ 5+ KP ϕ 6) presenta mayor dispersión conforme a la media con una desviación estándar de 0.037 descrita en sección de anexos.

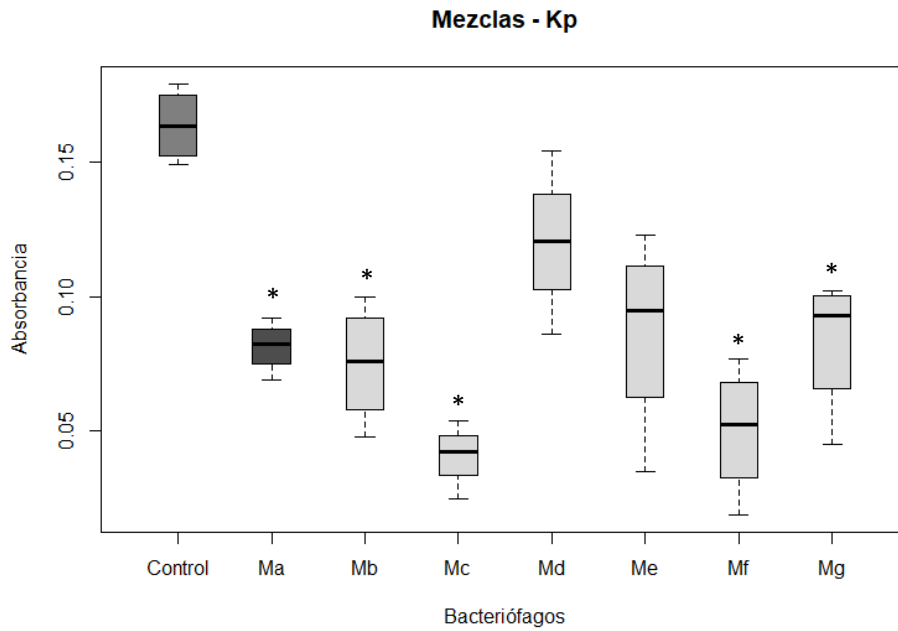
Las mezclas de tratamiento con fagos para *M. morgani* presentaron alta variación. Las mezclas con diferencias aparentes exitosas se tienen MH, MI, MJ, MK, MK, MN, MÑ, MO y MQ con valores de absorbancia menores a la mitad del control. Se presentó alta variación conforme a las medias para MB, MG y MR. El fago MN presentó una formación de biopelícula mayor al control de forma atípica, así como es el caso de MG, MB y MD.

Cuadro 4. Identificación de mezclas de cócteles para tratamiento con fagos.

Bacteria	Cóctel	Composición
<i>K. pneumoniae</i>	Ma	KPφ4
	Mb	KPφ4+ KPφ5
	Mc	KPφ4+ KPφ6
	Md	KPφ5
	Me	KPφ4+ KPφ5+ KPφ6
	Mf	KPφ6
	Mg	KPφ4+ KPφ5+ KPφ6
<i>M. morgani</i>	MA	MMφ1+ MMφ2
	MB	MMφ1+ MMφ3
	MC	MMφ1+ MMφ4
	MD	MMφ1+ MMφ5
	ME	MMφ2+ MMφ3
	MF	MMφ2+MMφ4
	MG	MMφ2+ MMφ5
	MH	MMφ3+ MMφ4
	MI	MMφ3+ MMφ5
	MJ	MMφ4+ MMφ5
	MK	MMφ1+MMφ2+MMφ3
	ML	MMφ1+MMφ4+MMφ5
	MM	MMφ2+MMφ4+MMφ5
	MN	MMφ2+MMφ3+MMφ4
	MÑ	MMφ3+MMφ1+MMφ5
	MO	MMφ2+MMφ4+MMφ1
	MP	MMφ4+MMφ5+MMφ1
MQ	MMφ2+MMφ3+MMφ4+MMφ5	
MR	MMφ1+MMφ2+MMφ3+MMφ5	
MS	MMφ1+MMφ2+MMφ3+MMφ4+MMφ5	

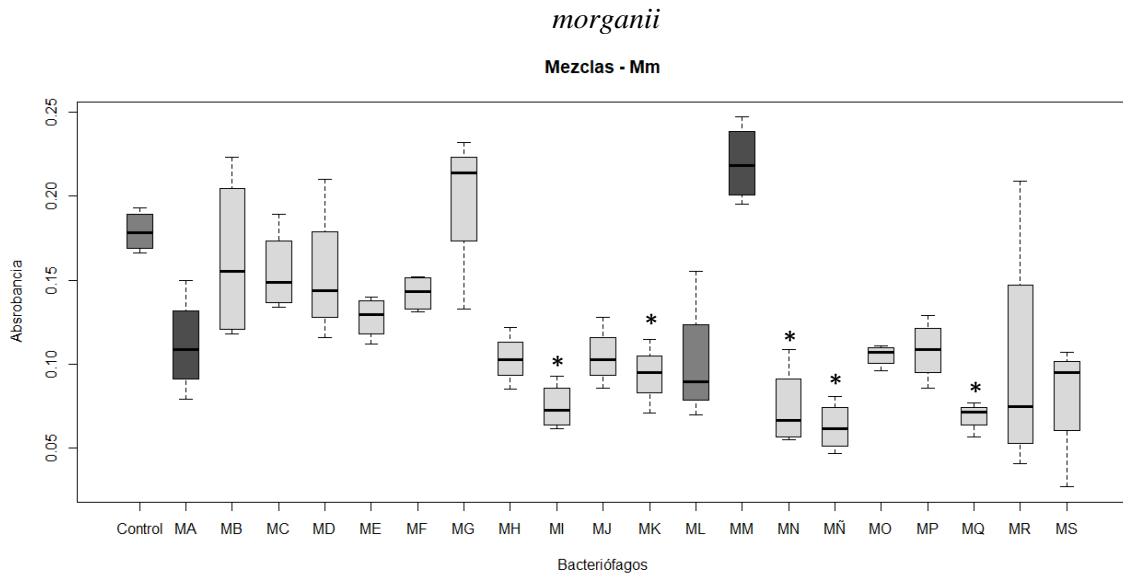
La composición de cócteles se seleccionó de forma aleatoria según la capacidad máxima de pozos en microplacas. M corresponde a la identificación de mezclas siendo a-g para *K. pneumoniae* y A-S para *M. morgani*.

Figura 13. Comparación de formación de biopelículas totales según cóctel de fagos de *K. pneumoniae*.



Representación gráficas de medianas para tratamiento con mezcla de fagos. Con un control de bacteria en cultivo fresco, presentando una absorbancia de 0.16 ± 0.014 correspondiente a formación de biopelículas. Composición e identificación de mezclas en cuadro 4. Se muestra los niveles de disminución presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$): Ma con 0.083 ± 0.014 (valor $p = 9.861E-4$), Mb con 0.076 ± 0.010 (valor $p = 3.762E-4$), Mc con 0.043 ± 0.022 (valor $p = 2.9E-6$) y Mf con 0.053 ± 0.024 (valor $p = 1.04E-5$) de absorbancia de películas totales.

Figura 14. Comparación de formación de biopelículas totales según coctel de fagos de *M.*

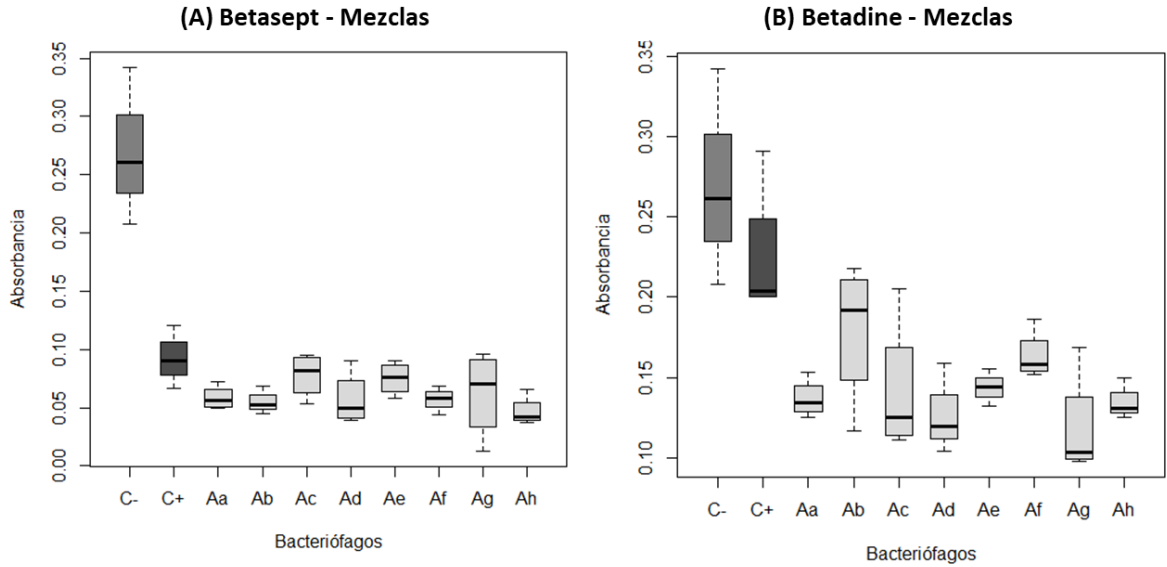


Con un control con absorbancia de 0.179 ± 0.010 correspondiente a formación de biofilm. Composición e identificación de mezclas en cuadro 4. Se muestra los niveles de disminución presentando diferencia significativa ($p \leq 0.05$): MI con 0.073 ± 0.014 (valor $p = 1.3702E-3$, MK con 0.094 ± 0.018 (valor $p = 2.46528E-2$), MN con 0.074 ± 0.025 (valor $p = 1.2118E-3$), MÑ con 0.063 ± 0.015 (valor $p = 1.812 E-4$) y MQ con 0.069 ± 0.009 (valor $p = 3.5846 E-3$) de absorbancia de películas totales.

F. Pruebas de infección con antisépticos

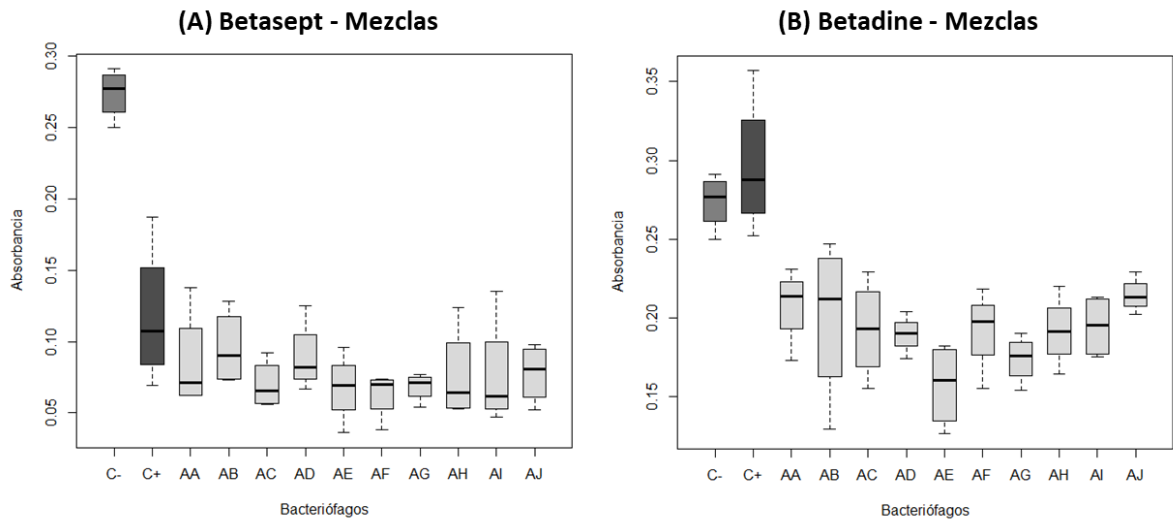
Se evaluó la interacción de los tratamientos de fagos con antisépticos para la inhibición de la formación de biopelículas mediante la cuantificación por ensayo de cristal violeta. En el caso de *K. pneumoniae*, el uso del tratamiento con fagos en presencia de los antisépticos presenta bajas absorbancias indistintamente de la mezcla empleada. Se muestra mayor dispersión para la mezcla de fagos Ab, Ac y Ag con el antiséptico Betadine mientras que Ae, Ah y Aa presentan menor variación conforme a la media. Asimismo, se resalta una media de 0.22 ± 0.055 de absorbancia para el control con antiséptico Betadine en comparación con la media de 0.26 ± 0.044 . Los tratamientos con *M. morganii* presentó un comportamiento similar con el antiséptico Betasept mientras que hubo mayor dispersión entre cada tratamiento con el antiséptico B. Asimismo, se obtuvo un alto valor de absorbancia para el antiséptico Betadine.

Figura 15. Comparación de formación de biopelículas totales en presencia de antisépticos según coctel de fagos de *K. pneumoniae*.



Con un control de bacteria fresca (C-), control de bacteria fresca más antiséptico (C+) y los tratamientos con fagos indicados de Aa a Ah correspondientes a *K. pneumoniae*. Siendo Antiséptico A: Betasept y Antiséptico B: Betadine. La composición de las mezclas se indican en el Cuadro 4.

Figura 16. Absorbancia de biopelículas totales en presencia de antisépticos según coctel de fagos de *M. morgani*.



Con un control de bacteria fresca (C-), control de bacteria fresca más antiséptico (C+) y los tratamientos con fagos indicados de AA a AJ correspondientes a *M. morgani*. Siendo Antiséptico A: Betasept y Antiséptico B: Betadine. La composición de las mezclas se indican en el Cuadro 4.

G. Valores estadísticos

Se analizó los valores medios obtenidos para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa mediante pruebas de ANOVA y Kruskal Wallis. Los valores de las mezclas para ambas bacterias presentaron normalidad, varianza constante e independencia evaluados por estadística descriptiva, gráficos de histogramas, gráfica de residuos y prueba de Shapiro. Por consiguiente, se realizó las pruebas de ANOVA para cada uno y una serie de pruebas Tukey para determinar diferencias con el control. Las matrices se detallan en sección de anexos. En contraste, las agrupaciones para los tratamientos de antisépticos no cumplieron con los supuestos de normalidad por lo cual se realizó pruebas Kruskal Wallis para comparación de medias de datos no paramétricos.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La supervivencia de las bacterias se ha asegurado mediante la evolución de diversos mecanismos. Entre estos, la formación de biopelículas les confiere gran capacidad de resistencia a antimicrobianos. Añadido a esto, la selección de cepas resistentes por su uso desmedido ha generado una necesidad de métodos alternativos para desinfección (Ashurst & Dawson, 2019). Así, el objetivo de este estudio fue la evaluación y análisis del uso de bacteriófagos líticos silvestres específicos para inhibir la formación de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae* y *Morganella morganii*. Se aislaron un total de seis fagos para *K. pneumoniae* de suspensión de huevo previo a la siembra de *Ceratitis capitata* de la Planta de cría masiva del Programa Moscamed, El Pino, Guatemala; y seis fagos específicos de *M. morganii*, provenientes de humedal artificial. De los cuales, un total de tres y cinco fagos para cada bacteria, respectivamente, fueron evaluados en cuanto a capacidad de infectividad como tratamientos individuales y en mezclas del mismo hospedero. Para cada uno, el criterio de selección se basó en su actividad lítica y capacidad infectiva aparente.

La diversidad en la morfología de las placas obtenidas en los aislamientos iniciales dependió de la fuente de su obtención. En los aislamientos iniciales se encontraron mezclas de placas lisogénicas, así como líticas. Para *K. pneumoniae* las placas de lisis obtenidas presentaron un halo definido, siendo simétricas y con un tamaño aproximado de 3.6mm. Se esperaba una alta especificidad de los fagos considerando que se asimilaron las condiciones al emplear un enriquecimiento con cultivo bacteriano de la misma procedencia. En el caso de fagos para *M. morganii*, las placas obtenidas del aislamiento de humedal artificial presentaron alta variabilidad en cuanto a morfología y tamaño. Como se muestra en la Figura 7 (C), se presentaron algunas placas ovaladas y otras circulares, todas con borde difuso. Esto sugiere que las placas son un resultado del trabajo sinérgico de una mezcla de fagos (Nabergoj, Modic, & Podgornik, 2018). Por lo cual, se prosiguió al re-aislamiento de fagos desde las placas líticas seleccionadas para cada bacteria. Los criterios de selección se basaron en el diámetro de las placas generadas tomando en cuenta que el tamaño de las placas, según Gallet, Kanno, & Wang (2011) estudios han sugerido que el tamaño de la placa formada por los fagos sea proporcional a la eficiencia de la adsorción afectando su productividad.

La preparación de los tratamientos con fagos requirió el enriquecimiento individual con cultivo bacteriano de la fase logarítmica según su respectivo hospedero para obtener una alta carga viral. Esto permitió la visualización de la formación de placas de lisis en la prueba de puntos. Según

Nabergoj, Modic, & Podgornik, 2018, el estado fisiológico del hospedero puede afectar directamente la propagación de los fagos. Mientras que Lourenço, De Sordi, & Debarbieux (2018) sugieren que la tasa de ensamblaje de fagos nuevos en una célula depende de la maquinaria para síntesis de proteínas disponible de la célula hospedera. El inicio de la fase estacionaria le permite a la bacteria activar mecanismos de defensa que alteran las células permitiendo mayor supervivencia en respuesta a estrés (Bryan, El-Shibiny, Hobbs, Porter, & Kutter, 2016). Por tanto, se seleccionó el uso de cultivo bacteriano en fase logarítmica para asegurar la producción de fagos durante el crecimiento exponencial de la bacteria. Se realizaron múltiples pruebas de puntos variando factores como el medio de nutrición, aeración, y temperatura. A partir de esto, se determinó que el factor de temperatura juega un papel relevante en la eficiencia de la generación de placas lo cual coincide con las observaciones realizadas en fagos de *Listeria monocytogenes* (Tokman, Kent, Wiedmann, & Denes, 2016). Por tal, una temperatura de 40°C se utilizó para generar placas con mayor diámetro que serían accesibles a simple vista.

Las altas tasas de mutación pueden ser ventajosas para asegurar la diversidad como sucede en bacteriófagos (Lourenco *et al.*, 2018). No obstante, para la bacteria la baja tasa de mutación puede ser ventajosa conforme a su sistema de defensa adaptativa que le permite eliminar material genético invasivo empleando los sistemas CRISPR (Watson, Staals, & Fineran, 2018). La disminución en el diámetro y la proporción presente de las placas formadas sugiere uno de ambos casos. Pruebas de halos de inhibición en Anexo 1 muestran la formación de césped bacteriano por encima de halos de inhibición delineados. Esto sugiere que el tiempo es un factor limitante para la efectividad de su infección por su capacidad de seleccionar resistencia. De esta manera, se presenta menor ocurrencia de placas formadas de los enriquecimientos para los re-aislamientos. En el Anexo 2, se ejemplifica el crecimiento anormal de césped bacteriano en cajas Petri asemejando a remolinos. Algunos autores recomiendan la dilución de los enriquecimientos para obtener una concentración más baja permitiendo la determinación más precisa de fagos libres con tasas de adsorción altas (Gallet *et al.*, 2011; Shende, Hirpurkar, Sannat, Rawat, & Pandey, 2017). Por esta razón se realizaron diluciones seriadas para cada fago enriquecido. De tal forma que se viera favorecida su adsorción a las células bacterianas permitiendo la fase inicial para la infección.

El rendimiento evaluado con la curva de muerte permitió definir los fagos con mayor capacidad lítica capaces de disminuir el OD₆₀₀ para las pruebas de biopelículas. La prueba fue medida por un total de 60 minutos considerando el tiempo mínimo esperado para la replicación de los fagos a una temperatura de 42°C. Para los fagos de *K. pneumoniae* se seleccionaron KPφ4, KPφ5 y KPφ6, que mostraron un comportamiento poco lineal conforme al control. Adicionalmente tuvieron una lectura

de absorbancia menor a la que alcanzó el control al final de la prueba sugiriendo que la infección permitió una menor proliferación bacteriana. En cambio, para los fagos de *M. morganii* se seleccionaron MMφ1, MMφ2, MMφ3, MMφ4 y MMφ5, de acuerdo con la interrupción en el crecimiento exponencial de la bacteria sin tratamiento. Los datos sugirieron que el fago MMφ1 y MMφ3 son los mejores prospectos para la infección de *M. morganii*.

Con los fagos seleccionados, se determinó mediante pruebas en microplacas de 96 pocillos que el volumen de 120μL y 160μL en pocillo de 250 μL totales permite la formación adecuada de biopelículas *K. pneumoniae* y *M. morganii*, respectivamente. Cabe resaltar el pico de absorción a 600nm de 0.991 cercano al límite de detección del equipo siendo dicha longitud de onda la cual proporcionó lecturas más consistentes y apropiadas para el estudio. Se aprecia además que los volúmenes mayores a 160μL presentaban una absorción menor al 0.500. Los datos sugieren que a un volumen mayor de medio la formación de biopelícula tiene menor rendimiento, lo cual puede deberse a que hay menor densidad de biomasa que se logra adherir a las paredes del pocillo formando la biopelícula.

El volumen para el tratamiento en las microplacas se determinó mediante la evaluación de cuatro volúmenes siendo 20, 40, 60 y 80 μL de los fagos enriquecidos con UFP medios descritas en Cuadro 4. Se buscaba hallar el volumen mínimo de fagos requerido para lograr resultados aparentes en la disminución de las biopelículas por sus valores de absorción con ensayos de cristal violeta. A partir de las figuras 8 y 9, se determinó para ambas bacterias que el volumen 60-80 μL no presentaba alta variación aparente entre sus medias y que disminuían sus valores de biopelícula total formada conforme al control. Por ello, se seleccionó el volumen de 60 μL para una formación adecuada de biopelículas manteniendo el menor gasto de recursos.

El tratamiento con fagos de *K. pneumoniae* descrito en la Figura 13 presentó mayor efectividad con el cóctel de fagos Mc, compuesto por KPφ4 y KPφ6, con una media de biopelícula total formada de 0.041 ± 0.012 seguido por el fago individual KPφ6 con un valor de 0.050 ± 0.024 . En cambio, el fago KPφ5 presentó la media más alta de 0.120 ± 0.028 muy cercano al control de 0.164 ± 0.014 . En comparación con la curva de muerte, los resultados de biopelícula total formada el fago KPφ5 sugieren que el tiempo de infección efectiva es corta, lo cual se ve relacionado, según Lorenzo *et al.* (2018), a las dimensiones celulares. En cambio, el cóctel Mc de los fagos KPφ4 y KPφ6 lograron mantener un total de biopelícula formada menor tanto en la curva de muerte como en la prueba de infectividad para inhibición de biopelículas.

Para *M. morganii*, los cócteles preparados presentaron alta variación entre ellos. Se sugiere que dicha diferencia se debe a que la interacción entre los fagos potencia la competencia para lograr adsorberse a la pared celular previo a la infección viral. De presentarse una tasa de replicación e infección baja, es poco probable que los fagos puedan sobrevivir y, por consiguiente, se permite la formación de la biopelícula. A partir de la Figura 14, se considera que el cóctel compuesto por los fagos MMφ1, MMφ3 y MMφ5 (MÑ) presenta mayor efectividad y poca variación en sus réplicas en la inhibición de formación de biopelícula para *M. morganii*; le siguen, por su baja capacidad, el cóctel de MMφ3 y MMφ5 (MI). No obstante, el cóctel, con menor potencial de inhibición, fue el compuesto por MMφ2, MMφ4 y MMφ5 (MM). Éste potenció el crecimiento de la bacteria, lo cual sugiere que la competencia en infección entre los fagos de la mezcla no permitió la adsorción correcta eliminando las partículas virales durante el tiempo de incubación.

La interacción de los cócteles con los antisépticos Betasept y Betadine se evaluaron por separado para cada mezcla. En *K. pneumoniae*, fue posible notar valores de biopelícula total formada bajas en comparación del control sin antiséptico. No obstante, con Betasept, Figura 15 (A), las medias con tratamiento de fagos tuvieron una diferencia poco significativa con el control tratado solo con antiséptico. Sin embargo, no se detectó bloqueo en la interacción con ambos tratamientos. Se consideraron como los más efectivos a: KPφ4 individual (Aa), KPφ4+ KPφ5 (Ab), KPφ6 individual (Af) y KPφ4+ KPφ5+ KPφ6 (Ah). De acuerdo con los datos estadísticos en Anexo 3, se resalta la poca variación de los tratamientos mencionados conforme a su media respectiva que suplementa la selección a los fagos y mezclas más efectivas con posibles aplicaciones en conjunto al antiséptico.

Por otro lado, es posible notar, en la Figura 15 (B), que el comportamiento de la media del control con antiséptico Betadine no concordó con lo esperado. La media de la biopelícula total formada no presentó una diferencia significativa por lo que su comportamiento en la formación de biopelícula es comparable con el cultivo sin tratamiento con antisépticos. Esto sugiere la selección de resistencia al antiséptico Betadine, o que las concentraciones que se utilizan no son las adecuadas. La concentración recomendada para la desinfección efectiva y completa es de 10% para el Betadine (Cichos *et al.*, 2019). En relación con esto, se determinó una alta variación conforme los valores de desviación estándar descritos en Anexo 3 tanto para los controles como para el tratamiento Ac, Ad y Ag que corresponden a KPφ4+ KPφ5; KPφ5; y KPφ4+ KPφ5+ KPφ6. Dichos concuerdan con la presencia del fago KPφ5 sugiriendo que su comportamiento no es constante y es propenso a variación conforme a las condiciones en que se encuentra. Asimismo, si

hay una alta mortalidad hacia el hospedero, no se puede asegurar la presencia constante de partículas virales requeridas para lograr la disminución de células bacterianas.

En el caso del tratamiento con Betadine, se obtuvo valores para cada tratamiento con mayor variación en la inhibición de la formación de biopelículas. Estos se muestran descritos en el anexo 7. Asimismo, se obtuvo una absorbancia de biopelículas totales mayor en el control con antiséptico Betadine que el control sin tratamiento. Los datos sugieren que la bacteria selecciona resistencia al antiséptico potenciando el crecimiento de células con buena efectividad en la producción de biopelícula bajo esas condiciones. O bien, que la concentración del tratamiento no es significativa para lograr una inhibición completa. No obstante, es posible observar en la Figura 16 que los tratamientos con cócteles de fagos sí presentaron disminución en la absorbancia de biopelículas totales. Por tanto, se considera que la interacción con el antiséptico no inactivó la capacidad de inhibición en la formación de biopelículas de los fagos aunque sí se ve disminuida con valores más altos que con el antiséptico Betasept.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se aislaron un total de tres bacteriófagos silvestres con capacidad lítica específicos para *K. pneumoniae* a partir de suspensión de huevo previo a la siembra de *C. capitata* y cinco bacteriófagos específicos para *M. morgani* a partir de humedal artificial.
2. Se estandarizaron las condiciones para la formación de biopelículas de *K. pneumoniae* y de *M. morgani* en microplacas de 96 pocillos.
3. Se identificaron tres cócteles de bacteriófagos para *K. pneumoniae* y cinco para *M. morgani* que presentan inhibición de la formación de biopelículas.
4. Se determinó que el tratamiento con cócteles de bacteriófagos en combinación con antisépticos reduce significativamente la formación de biofilm de *K. pneumoniae* mientras que solamente el antiséptico Betadine no logra reducir la producción de biofilm.
5. Se determinó que el tratamiento con cócteles de bacteriófagos en combinación con antisépticos reduce significativamente la formación de biofilm de *M. morgani* mientras que solamente el antiséptico Betadine no logra reducir la producción de biofilm.
6. Los fagos KPΦ4 y KPΦ6 presentaron mayor capacidad para inhibir la formación de biopelículas en *K. pneumoniae*, mientras que MMφ1 y MMφ3 fueron más efectivos para *M. morgani*.

IX. RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo ensayos específicos para evaluar la concentración límite que se requiere de antiséptico colaborado con tratamiento de fagos para ambas bacterias.
2. Realizar una estandarización del crecimiento de *M. morgani* para obtención de una relación entre células contables y densidad óptica en fase exponencial.
3. Realizar una caracterización completa de los bacteriófagos КРФ4, КРФ6, ММφ1 y ММφ3 mediante microscopía electrónica y secuenciación.
4. Realizar pruebas para cada fago de susceptibilidad a distintas condiciones de pH.

X. BIBILOGRAFÍA

- Abedon, S., Abedon, & T., S. (2015). Ecology of Anti-Biofilm Agents I: Antibiotics versus Bacteriophages. *Pharmaceuticals*, 8(3), 525–558.
<https://doi.org/10.3390/ph8030525>
- American Society for Biochemistry and Molecular Biology., C., Burghartz, M., Chaves-Moreno, D., Otto, A., Hentschker, C., Fuchs, S., ... Riedel, K. (2002). *Molecular & cellular proteomics*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Retrieved from <https://hzi.openrepository.com/handle/10033/621180>
- Ashurst, J. V., & Dawson, A. (2019). *Klebsiella Pneumonia*. *StatPearls*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30085546>
- Bandeira, M., Carvalho, P., Duarte, A., Jordao, L., Bandeira, M., Carvalho, P. A., ... Jordao, L. (2014). Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens*, 3(3), 720–731. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030720>
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*, 121(136), 1–58. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>
- Bryan, D., El-Shibiny, A., Hobbs, Z., Porter, J., & Kutter, E. M. (2016). Bacteriophage T4 infection of stationary phase *E. coli*: Life after log from a phage perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01391>
- Chan, B. K., & Abedon, S. T. (2015). Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 85–99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189866>
- Chen, Y.-T., Peng, H.-L., Shia, W.-C., Hsu, F.-R., Ken, C.-F., Tsao, Y.-M., ... Ku, T.-H. (2012). Whole-genome sequencing and identification of *Morganella morganii* KT

- pathogenicity-related genes. *BMC Genomics*, 13 Suppl 7(Suppl 7), S4.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-S7-S4>
- Chung, P. Y. (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(20), fnw219. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw219>
- Cichos, K. H., Andrews, R. M., Wolschendorf, F., Narmore, W., Mabry, S. E., & Ghanem, E. S. (2019). Efficacy of Intraoperative Antiseptic Techniques in the Prevention of Periprosthetic Joint Infection: Superiority of Betadine. *Journal of Arthroplasty*, 34(7), S312–S318. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2019.02.002>
- Cisek, A. A., Dąbrowska, I., Gregorczyk, K. P., & Wyżewski, Z. (2017). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current Microbiology*, 74(2), 277–283.
<https://doi.org/10.1007/s00284-016-1166-x>
- Dang, V. T., & Sullivan, M. B. (2014). Emerging methods to study bacteriophage infection at the single-cell level. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00724>
- De, A., Raj, H., Halder, J., Mukherjee, P., & Maiti, P. (2017). Biofilm colonization in chronic treatment refractory infections presenting with discharging sinuses: A study in a tertiary care hospital of Eastern India. *Journal of Laboratory Physicians*, 9(2), 125. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.199637>
- De, A., Raj, H. J., & Maiti, P. K. (2016). Biofilm in Osteomyelitis caused by a Rare Pathogen, *Morganella morganii* : A Case Report. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 10(6), DD06-8. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/18666.7990>
- de Carvalho, C. C. C. R. (2018). Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. *Frontiers in Marine Science*, 5, 126.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>
- De Rosa, F. G., Corcione, S., Cavallo, R., Di Perri, G., & Bassetti, M. (2015). Critical issues for *Klebsiella pneumoniae* KPC-carbapenemase producing *K. pneumoniae*

- infections: a critical agenda. *Future Microbiology*, *10*(2), 283–294.
<https://doi.org/10.2217/fmb.14.121>
- Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2003). Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in Microbiology*, *154*(1), 9–16. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)00004-9)
- Domingo-Calap, P., & Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *7*(3).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>
- Donlan, R. M. (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*, *33*(8), 1387–1392.
<https://doi.org/10.1086/322972>
- Enkerlin, W. R., Gutiérrez Ruelas, J. M., Pantaleon, R., Soto Litera, C., Villaseñor Cortés, A., Zavala López, J. L., ... Hendrichs, J. (2017). The Moscamed Regional Programme: review of a success story of area-wide sterile insect technique application. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *164*(3), 188–203.
<https://doi.org/10.1111/eea.12611>
- Fong, S. A., Drilling, A., Morales, S., Cornet, M. E., Woodworth, B. A., Fokkens, W. J., ... Wormald, P.-J. (2017). Activity of Bacteriophages in Removing Biofilms of Pseudomonas aeruginosa Isolates from Chronic Rhinosinusitis Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 418.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00418>
- Gallet, R., Kannoly, S., & Wang, I. N. (2011). Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-181>
- Górski, A., Międzybrodzki, R., Łobocka, M., Głowacka-Rutkowska, A., Bednarek, A., Borysowski, J., ... Scheres, J. (2018). Phage therapy: What have we learned? *Viruses*, *10*(6), 1–28. <https://doi.org/10.3390/v10060288>
- Große, J. H., & Casjens, S. R. (2014). Understanding the enormous diversity of

- bacteriophages: The tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology*, 468–470, 421–443. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.08.024>
- Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., ... Feng, X. (2012). A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031698>
- Harper, D., Parracho, H., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., ... Morales, S. (2014a). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270>
- Harper, D., Parracho, H., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., ... Morales, S. (2014b). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270>
- Harper, D., Parracho, H., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., ... Morales, S. (2014c). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270>
- Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T., & Andleeb, S. (2015). Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(3). Retrieved from <http://www.rroij.com/open-access/bacterial-biofilm-its-composition-formation-and-role-in-human-infections.php?aid=61426>
- Karumidze, N., Kusradze, I., Rigvava, S., Goderdzishvili, M., Rajakumar, K., & Alavidze, Z. (2013). Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of klebsiella pneumoniae and klebsiella oxytoca. *Current Microbiology*, 66(3), 251–258. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0264-7>
- Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2019). *Bacteriophages*. StatPearls Publishing. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29630237>
- Keen, E. C., & Dantas, G. (2018). Close Encounters of Three Kinds: Bacteriophages, Commensal Bacteria, and Host Immunity. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.05.009>

- Kęsik-Szeloch, A., Drulis-Kawa, Z., Weber-Dąbrowska, B., Kassner, J., Majkowska-Skrobek, G., Augustyniak, D., ... Kropinski, A. M. (2013). Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Virology Journal*, *10*(1), 100. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-100>
- Li, G., Niu, X., Yuan, S., Liang, L., Liu, Y., Hu, L., ... Cheng, Z. (2018). Emergence of *Morganella morganii* subsp. *morganii* in dairy calves, China. *Emerging Microbes & Infections*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0173-3>
- Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, *50*, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.006>
- Lourenço, M., De Sordi, L., & Debarbieux, L. (2018, June 15). The diversity of bacterial lifestyles hampers bacteriophage tenacity. *Viruses*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10060327>
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., ... Wakiguchi, H. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *11*(5), 211–219. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0408-9>
- Nabergoj, D., Modic, P., & Podgornik, A. (2018). Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *MicrobiologyOpen*, *7*(2), e00558. <https://doi.org/10.1002/mbo3.558>
- Parasion, S., Kwiatek, M., Gryko, R., Mizak, L., & Malm, A. (2014). Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish Journal of Microbiology*, *63*(2), 137–145. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12212>
- Pei, R., & Lamas-Samanamud, G. R. (2014). Inhibition of Biofilm Formation by T7 Bacteriophages Producing Quorum-Quenching Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(17), 5340–5348. <https://doi.org/10.1128/AEM.01434-14>

- Pires, D. P., Cleto, S., Sillankorva, S., Azeredo, J., & Lu, T. K. (2016). Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 80(3), 523–543.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00069-15>
- Programa Moscamed Guatemala. (n.d.). Retrieved March 25, 2019, from http://moscamed-guatemala.org.gt/?page_id=738&secc=Inicio
- Shende, R. K., Hirpurkar, S. D., Sannat, C., Rawat, N., & Pandey, V. (2017). Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Veterinary World*, 10(8), 973–978.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.973-978>
- Simms, E. (2018). Ara h 1 Peptide Immunotherapy in a Mouse Model of Peanut-Induced Anaphylaxis. Retrieved from <https://macsphere.mcmaster.ca/handle/11375/23044>
- Taha, O. A., Connerton, P. L., Connerton, I. F., & El-Shibiny, A. (2018). Bacteriophage ZCKP1: A Potential Treatment for *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Diabetic Foot Patients. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2127.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02127>
- Tokman, J. I., Kent, D. J., Wiedmann, M., & Denes, T. (2016). Temperature significantly affects the plaquing and adsorption efficiencies of *Listeria* phages. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00631>
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3).
<https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., ... Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1003–1018.
<https://doi.org/10.1111/jam.13533>
- Vuotto, Claudia, Longo, F., Balice, M., Donelli, G., & Varaldo, P. (2014a). Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3(3),

743–758. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>

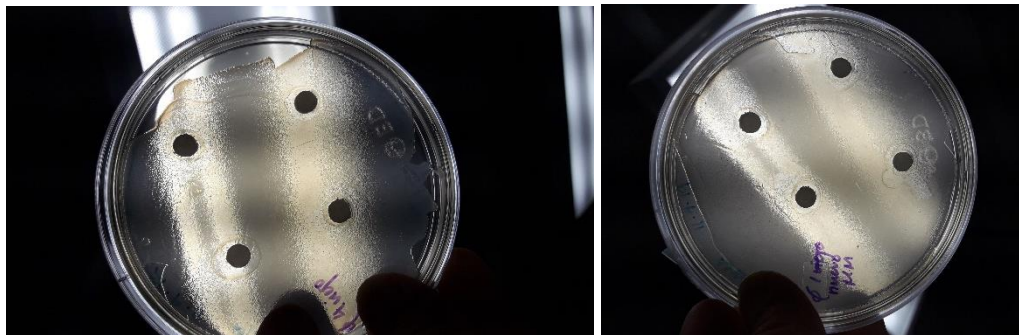
- Vuotto, Claudia, Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. (2014b). Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 3(3), 743–758. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>
- Walker, J. M., Kropinski, A. M., & Lavigne, R. (2018). *Bacteriophages volume 3* (Vol. III).
- Watson, B. N. J., Staals, R. H. J., & Fineran, P. C. (2018). crossm CRISPR-Cas-Mediated Phage Resistance Enhances Horizontal, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02406-17>
- Wilson, B., Salyers, A., Whitt, D., & Winkler, M. (2011). Bacterial Strategies for Evading or Surviving Host Defense Systems. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*, 193–222.
- Yamaki, S., Omachi, T., Kawai, Y., & Yamazaki, K. (2014). Characterization of a novel *Morganella morganii* bacteriophage FSP1 isolated from river water. *FEMS Microbiology Letters*, 359(2), 166–172. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12560>

XI. GLOSARIO

1. Bacteriófagos: virus de bacterias especializados.
2. Biopelículas: conglomeración de polímeros extracelulares
3. Profago: material genético de un bacteriófago que se ha incorporado en el genoma de su hospedero.

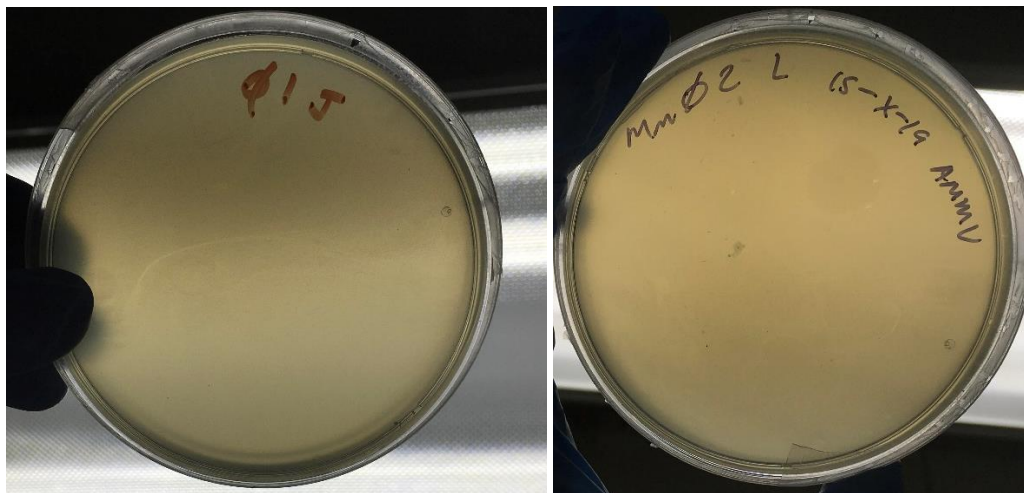
XII. ANEXOS

Anexo 1. Ensayo de inhibición con cóctel de bacteriófagos para *K. pneumoniae* (A) y *M. morganii* (B).



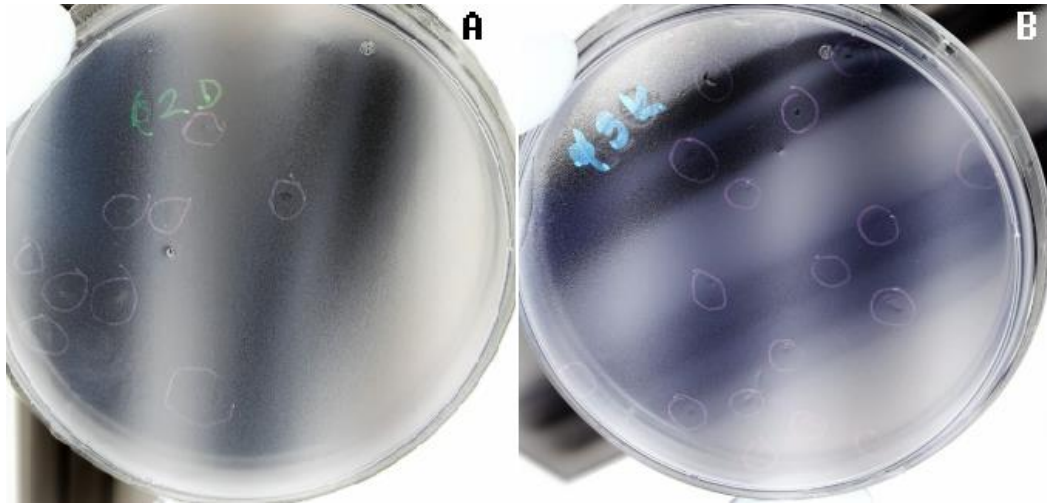
Halos de inhibición formados con 10 μ L de fagos para *K. pneumoniae* y *M. morganii* en papel filtro estéril.

Anexo 2. Sembrado de *K. pneumoniae* (A) y *M. morganii* (B) en agarosa suave.



Placas con alta densidad de fagos para *K. pneumoniae* y *M. morganii* presentando remolinos en césped bacteriano.

Anexo 3. Prueba de puntos para aislamiento y purificación de fagos.



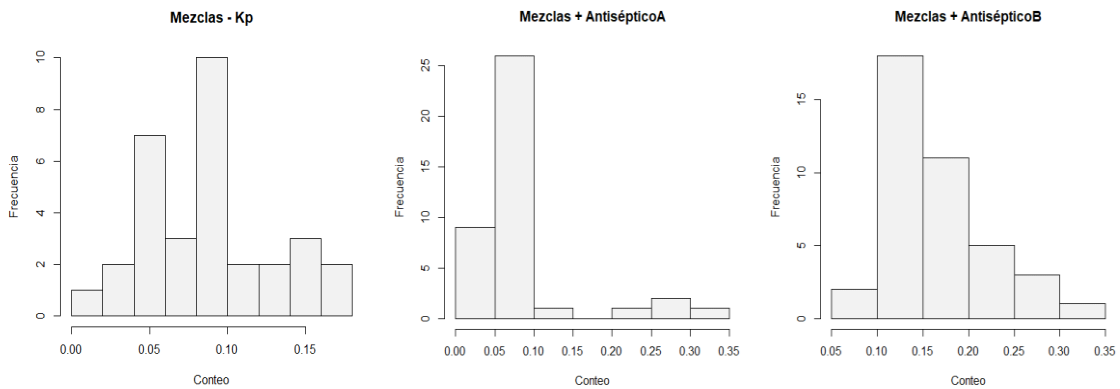
Placas aisladas de purificación de fagos para *K. pneumoniae* y *M. morganii* señalados por autor.

Anexo 3. Estadística Descriptiva para *K. pneumoniae*

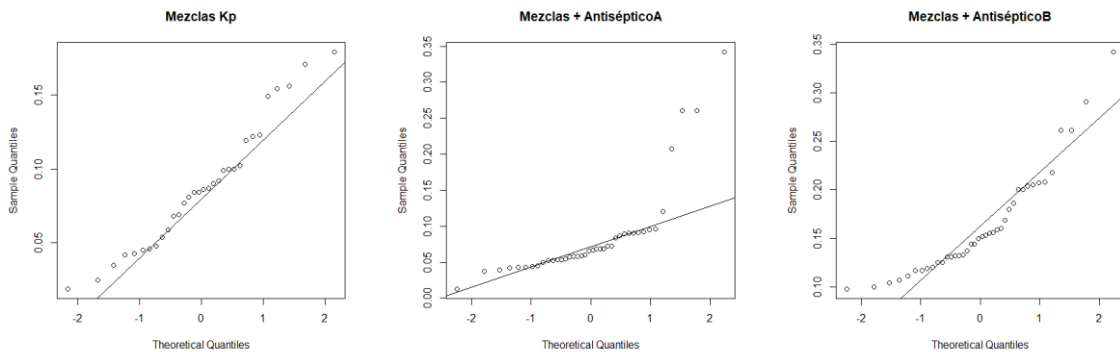
Prueba	Código	Identificación	Media	Mediana	Desv	Varianza
Mezclas	C+	C+	0.164	0.164	0.014	0.0002
	Ma	1	0.082	0.083	0.010	0.0001
	Mb	1+2	0.075	0.076	0.022	0.0005
	Mc	1+3	0.041	0.043	0.012	0.0001
	Md	2	0.120	0.121	0.028	0.0008
	Me	2+3	0.087	0.095	0.037	0.0014
	Mf	3	0.050	0.053	0.024	0.0006
	Mg	1+2+3	0.083	0.093	0.026	0.0007
Antiséptico Betasept	C+	C+	0.268	0.261	0.055	0.0031
	Bs C+	Bs C+	0.092	0.091	0.022	0.0005
	Aa	1+Bs	0.059	0.056	0.01	0.0001
	Ab	2+Bs	0.055	0.053	0.010	0.0001
	Ac	3+Bs	0.078	0.082	0.019	0.0004
	Ad	1+2+Bs	0.057	0.050	0.023	0.0005
	Ae	1+3+Bs	0.075	0.077	0.015	0.0002
	Af	2+3+Bs	0.058	0.059	0.010	0.0001
	Ag	1+2+3+Bs	0.063	0.071	0.038	0.0014
	Ah	1+2+3+Bs	0.047	0.043	0.013	0.0002

Prueba	Código	Identificación	Media	Mediana	Desv	Varianza
Antiséptico Betadine	C+	C+	0.268	0.261	0.055	0.0031
	Bd C+	Bd C+	0.225	0.204	0.044	0.0020
	Aa	1+Bd	0.137	0.135	0.012	0.0001
	Ab	2+Bd	0.180	0.192	0.045	0.0020
	Ac	3+Bd	0.142	0.125	0.043	0.0019
	Ad	1+2+Bd	0.126	0.120	0.024	0.0006
	Ae	1+3+Bs	0.144	0.144	0.009	0.0001
	Af	2+3+Bd	0.164	0.158	0.015	0.0002
	Ag	1+2+3+Bs	0.119	0.104	0.034	0.0011
Ah	1+2+3+Bs	0.134	0.131	0.011	0.0001	

Anexo 4. Gráfico de histogramas para evaluar normalidad de cócteles para *K. pneumoniae*



Anexo 5. Gráfico cuantil-cuantil para determinar comportamiento paramétrico para *K. pneumoniae*



Anexo 6. Pruebas de normalidad Shapiro para varianza para *K. pneumoniae*

Nombre	Valor P	Rechazo	Conclusión
Mezclas	0.234	No	Los valores se consideran normales.
Betasept	1.90E-08	Sí	Los valores no se consideran normales.
Betadine	0.0004814	Sí	Los valores no se consideran normales.

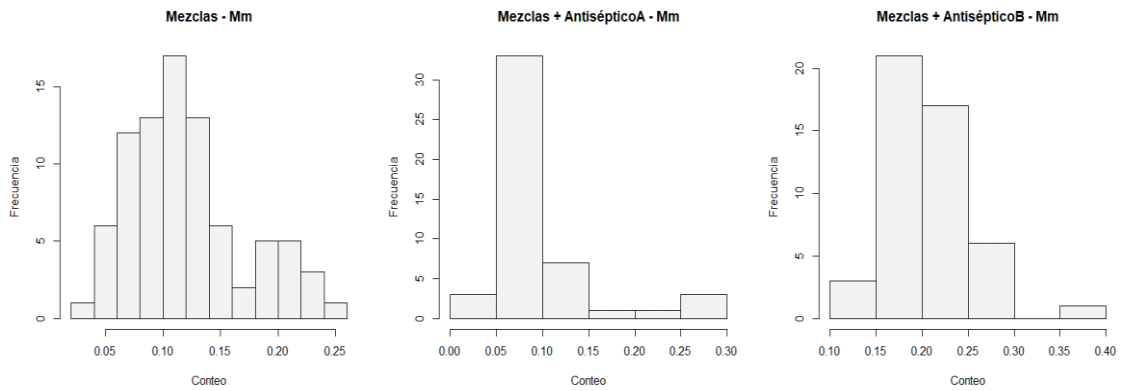
*Siendo Ho: Hay distribución normal, con alfa=0.05

Anexo 7. Estadística Descriptiva para *M. morgani*.

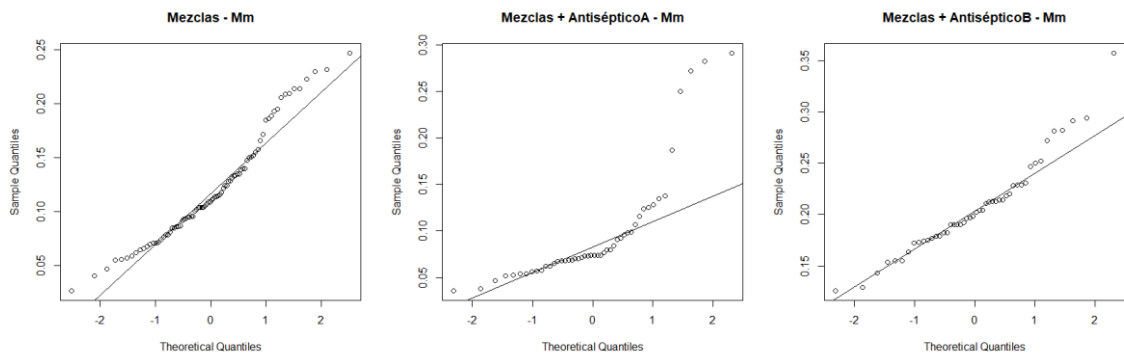
Prueba	Código	Identificación	Media	Mediana	Desv	Varianz
	C+	Control	0.179	0.179	0.012	0.0002
	MA	1+2	0.112	0.109	0.029	0.0009
	MB	1+3	0.163	0.155	0.051	0.0026
	MC	1+4	0.155	0.149	0.025	0.0006
	MD	1+5	0.154	0.144	0.040	0.0016
	ME	2+3	0.128	0.130	0.012	0.0002
	MF	2+4	0.142	0.143	0.011	0.0001
	MG	2+5	0.198	0.214	0.044	0.0020
	MH	3+4	0.103	0.103	0.015	0.0002
	MI	3+5	0.075	0.073	0.014	0.0002
Mezcla	MJ	4+5	0.105	0.103	0.017	0.0003
	MK	1+2+3	0.094	0.094	0.018	0.0003
	ML	1+4+5	0.101	0.101	0.037	0.0014
	MM	2+4+5	0.220	0.220	0.023	0.0005
	MN	2+3+4	0.074	0.074	0.025	0.0006
	MÑ	3+1+5	0.063	0.063	0.015	0.0002
	MO	2+4+1	0.105	0.105	0.007	0.0000
	MP	4+5+1	0.108	0.108	0.018	0.0003
	MQ	4+5+3+2	0.069	0.069	0.009	0.0001
	MR	5+1+3+2	0.100	0.100	0.075	0.0056
	MS	5+1+2+3+4	0.081	0.081	0.036	0.0013
	C+	C+	0.274	0.277	0.018	0.0003

Prueba	Código	Identificación	Media	Mediana	Desv	Varianz
Antiséptico Betadine	C+Bs	C+Bs	0.118	0.108	0.050	0.0025
	AA	1+Bs	0.086	0.071	0.036	0.0013
	AB	2+Bs	0.096	0.091	0.027	0.0007
	AC	3+Bs	0.070	0.066	0.017	0.0003
	AD	4+Bs	0.089	0.082	0.025	0.0006
	AE	5+Bs	0.068	0.069	0.025	0.0006
	AF	1+2+Bs	0.063	0.070	0.017	0.0003
	AG	2+3+Bs	0.068	0.071	0.010	0.0001
	AH	3+4+Bs	0.076	0.064	0.033	0.0011
	AI	3+5+Bs	0.076	0.062	0.040	0.0016
	AJ	1+2+3+4+5+Bs	0.078	0.081	0.021	0.0004
Antiséptico Betadine	C+	C+	0.274	0.277	0.018	0.0003
	C+Bd	C+Bs	0.296	0.288	0.044	0.0020
	AA	1+Bd	0.208	0.214	0.025	0.0006
	AB	2+Bd	0.200	0.212	0.052	0.0027
	AC	3+Bd	0.193	0.193	0.032	0.0010
	AD	4+Bd	0.190	0.190	0.012	0.0002
	AE	5+Bd	0.157	0.160	0.027	0.0007
	AF	1+2+Bd	0.192	0.198	0.026	0.0007
	AG	2+3+Bd	0.174	0.176	0.015	0.0002
	AH	3+4+Bd	0.192	0.191	0.023	0.0005
	AI	3+5+Bd	0.195	0.195	0.020	0.0004
AJ	1+2+3+4+5+Bd	0.214	0.213	0.011	0.0001	

Anexo 8. Gráfico de histogramas para evaluar normalidad de cócteles para *M. morganii*.



Anexo 9. Gráfico cuantil-cuantil para determinar comportamiento paramétrico para *M. morganii*



Anexo 10. Pruebas de normalidad Shapiro para varianza para *M. morganii*.

Nombre	Valor P	Rechazo	Conclusión
Mezclas	0.234	No	Los valores se consideran normales.
Betasept	1.85e-08	Sí	Los valores no se consideran normales.
Betadine	0.0268	Sí	Los valores no se consideran normales.

*Siendo Ho: Hay distribución normal, con alfa=0.05

Anexo 11. Datos ANOVA para *K. pneumoniae*

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	4	0.655	0.16375	0.000187583
1	4	0.326	0.0815	9.1E-05
1+2	4	0.3	0.075	0.000494667
1+3	4	0.164	0.041	0.000143333
2	4	0.481	0.12025	0.00077225
2+3	4	0.348	0.087	0.001392667
3	4	0.201	0.05025	0.000595583
1+2+3	4	0.333	0.08325	0.00069225

ANÁLISIS

DE VARIANZA

<i>Origen de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.042586	7	0.006083714	11.1	3.29676E-06	2.422628533
Dentro de los grupos	0.013108	24	0.000546167			
Total	0.055694	31				

Anexo 12. Despliegue de prueba Tukey HSD para verificación de diferencias significativas entre parejas de datos para cócteles de *K. pneumoniae*.

```

> TukeyHSD(AOV)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = frecuencia ~ Nombre, data = aovkp)

$Nombre
      diff      lwr      upr    p adj
1+2-1   -0.00650 -0.061230132  0.04823013 0.9999090
1+2+3-1  0.00175 -0.052980132  0.05648013 1.0000000
1+3-1   -0.04050 -0.095230132  0.01423013 0.2630465
2-1     0.03875 -0.015980132  0.09348013 0.3114148
2+3-1   0.00550 -0.049230132  0.06023013 0.9999706
3-1    -0.03125 -0.085980132  0.02348013 0.5693220
Control-1 0.08225  0.027519868  0.13698013 0.0009861
1+2+3-1+2 0.00825 -0.046480132  0.06298013 0.9995573
1+3-1+2  -0.03400 -0.088730132  0.02073013 0.4675455
2-1+2    0.04525 -0.009480132  0.09998013 0.1590941
2+3-1+2  0.01200 -0.042730132  0.06673013 0.9952377
3-1+2   -0.02475 -0.079480132  0.02998013 0.8012248
Control-1+2 0.08875  0.034019868  0.14348013 0.0003762
1+3-1+2+3 -0.04225 -0.096980132  0.01248013 0.2201477
2-1+2+3  0.03700 -0.017730132  0.09173013 0.3650450
2+3-1+2+3 0.00375 -0.050980132  0.05848013 0.9999979
3-1+2+3  -0.03300 -0.087730132  0.02173013 0.5039857
Control-1+2+3 0.08050  0.025769868  0.13523013 0.0012780
2-1+3    0.07925  0.024519868  0.13398013 0.0015378
2+3-1+3  0.04600 -0.008730132  0.10073013 0.1461643
3-1+3    0.00925 -0.045480132  0.06398013 0.9990693
Control-1+3 0.12275  0.068019868  0.17748013 0.0000029
2+3-2   -0.03325 -0.087980132  0.02148013 0.4947966
3-2     -0.07000 -0.124730132 -0.01526987 0.0059791
Control-2 0.04350 -0.011230132  0.09823013 0.1928365
3-2+3   -0.03675 -0.091480132  0.01798013 0.3731100
Control-2+3 0.07675  0.022019868  0.13148013 0.0022250
Control-3 0.11350  0.058769868  0.16823013 0.0000104

```

Anexo 15. Prueba Kruskal Wallis para tratamiento con antisépticos y fagos de *K.pneumoniae*.

Nombre	Valor P	Rechazo	Conclusión
Betasept	0.008808	Sí	Las medias no son iguales.
Betadine	0.003813	Sí	Las medias no son iguales.

*Siendo Ho: Las medias de la población son iguales, con alfa=0.05

Anexo 13. Datos ANOVA para cócteles de *M. morgani*

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Control	4	0.716	0.179	0.00015
1+2	4	0.447	0.11175	0.00086692
1+3	4	0.651	0.16275	0.00255825
1+4	4	0.62	0.155	0.00062067
1+5	4	0.614	0.1535	0.00160367
2+3	4	0.511	0.12775	0.00015492
2+4	4	0.569	0.14225	0.00011692
2+5	4	0.793	0.19825	0.00196425
3+4	4	0.413	0.10325	0.00022892
3+5	4	0.3	0.075	0.00019667
4+5	4	0.419	0.10475	0.00030225
1+2+3	4	0.376	0.094	0.000324
1+4+5	4	0.404	0.101	0.00138467
2+4+5	4	0.878	0.2195	0.00054967
2+3+4	4	0.297	0.07425	0.00060358
3+1+5	4	0.252	0.063	0.000218
2+4+1	4	0.421	0.10525	4.425E-05
4+5+1	4	0.433	0.10825	0.00032558
4+5+3+2	4	0.277	0.06925	7.3583E-05
5+1+3+2	4	0.4	0.1	0.005604
5+1+2+3+4	4	0.324	0.081	0.00132867

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de variaciones	Suma de cuadrados	Grados libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.15227217	20	0.00761361	8.31897127	4.0275E-11	1.7394173
Dentro de los grupos	0.05765825	63	0.00091521			
Total	0.20993042	83				

Anexo 14. Despliegue de prueba Tukey HSD para verificación de diferencias significativas entre parejas de datos para *M. morganii*.

```

1 > TukeyHSD(AOVMM)
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = Frecuencia ~ Nombre, data = aovMM)

$Nombre
      diff      lwr      upr      p adj
1+2+3-1+2 -0.01775 -0.0974634001  0.0619634001  0.9999991
1+3-1+2    0.05100 -0.0287134001  0.1307134001  0.6922643
1+4-1+2    0.04325 -0.0364634001  0.1229634001  0.8948807
1+4+5-1+2 -0.01075 -0.0904634001  0.0689634001  1.0000000
1+5-1+2    0.04175 -0.0379634001  0.1214634001  0.9207626
2+3-1+2    0.01600 -0.0637134001  0.0957134001  0.9999999
2+3+4-1+2 -0.03750 -0.1172134001  0.0422134001  0.9699873
2+4-1+2    0.03050 -0.0492134001  0.1102134001  0.9970123
2+4+1-1+2 -0.00650 -0.0862134001  0.0732134001  1.0000000
2+4+5-1+2  0.10775  0.0280365999  0.1874634001  0.0007376
2+5-1+2    0.08650  0.0067865999  0.1662134001  0.0199901
3+1+5-1+2 -0.04875 -0.1284634001  0.0309634001  0.7612325
3+4-1+2    -0.00850 -0.0882134001  0.0712134001  1.0000000
3+5-1+2    -0.03675 -0.1164634001  0.0429634001  0.9754495
4+5-1+2    -0.00700 -0.0867134001  0.0727134001  1.0000000
4+5+1-1+2 -0.00350 -0.0832134001  0.0762134001  1.0000000
4+5+3+2-1+2 -0.04250 -0.1222134001  0.0372134001  0.9084104
5+1+2+3+4-1+2 -0.03075 -0.1104634001  0.0489634001  0.9966940
5+1+3+2-1+2 -0.01175 -0.0914634001  0.0679634001  1.0000000
C+-1+2     0.06725 -0.0124634001  0.1469634001  0.2090929
1+3-1+2+3  0.06875 -0.0109634001  0.1484634001  0.1796396
1+4-1+2+3  0.06100 -0.0187134001  0.1407134001  0.3669008
1+4+5-1+2+3  0.00700 -0.0727134001  0.0867134001  1.0000000
1+5-1+2+3  0.05950 -0.0202134001  0.1392134001  0.4123921
2+3-1+2+3  0.03375 -0.0459634001  0.1134634001  0.9900907
2+3+4-1+2+3 -0.01975 -0.0994634001  0.0599634001  0.9999947
2+4-1+2+3  0.04825 -0.0314634001  0.1279634001  0.7756364
2+4+1-1+2+3  0.01125 -0.0684634001  0.0909634001  1.0000000

```

2+4+1-1+2+3	0.01125	-0.0684634001	0.0909634001	1.0000000
2+4+5-1+2+3	0.12550	0.0457865999	0.2052134001	0.0000340
2+5-1+2+3	0.10425	0.0245365999	0.1839634001	0.0013153
3+1+5-1+2+3	-0.03100	-0.1107134001	0.0487134001	0.9963475
3+4-1+2+3	0.00925	-0.0704634001	0.0889634001	1.0000000
3+5-1+2+3	-0.01900	-0.0987134001	0.0607134001	0.9999972
4+5-1+2+3	0.01075	-0.0689634001	0.0904634001	1.0000000
4+5+1-1+2+3	0.01425	-0.0654634001	0.0939634001	1.0000000
4+5+3+2-1+2+3	-0.02475	-0.1044634001	0.0549634001	0.9998246
5+1+2+3+4-1+2+3	-0.01300	-0.0927134001	0.0667134001	1.0000000
5+1+3+2-1+2+3	0.00600	-0.0737134001	0.0857134001	1.0000000
C+-1+2+3	0.08500	0.0052865999	0.1647134001	0.0246528
1+4-1+3	-0.00775	-0.0874634001	0.0719634001	1.0000000
1+4+5-1+3	-0.06175	-0.1414634001	0.0179634001	0.3451322
1+5-1+3	-0.00925	-0.0889634001	0.0704634001	1.0000000
2+3-1+3	-0.03500	-0.1147134001	0.0447134001	0.9852288
2+3+4-1+3	-0.08850	-0.1682134001	-0.0087865999	0.0150293
2+4-1+3	-0.02050	-0.1002134001	0.0592134001	0.9999903
2+4+1-1+3	-0.05750	-0.1372134001	0.0222134001	0.4763926
2+4+5-1+3	0.05675	-0.0229634001	0.1364634001	0.5011260
2+5-1+3	0.03550	-0.0442134001	0.1152134001	0.9828212
3+1+5-1+3	-0.09975	-0.1794634001	-0.0200365999	0.0027188
3+4-1+3	-0.05950	-0.1392134001	0.0202134001	0.4123921
3+5-1+3	-0.08775	-0.1674634001	-0.0080365999	0.0167384
4+5-1+3	-0.05800	-0.1377134001	0.0217134001	0.4600961
4+5+1-1+3	-0.05450	-0.1342134001	0.0252134001	0.5765525
4+5+3+2-1+3	-0.09350	-0.1732134001	-0.0137865999	0.0071757
5+1+2+3+4-1+3	-0.08175	-0.1614634001	-0.0020365999	0.0383112
5+1+3+2-1+3	-0.06275	-0.1424634001	0.0169634001	0.3172247
C+-1+3	0.01625	-0.0634634001	0.0959634001	0.9999998
1+4+5-1+4	-0.05400	-0.1337134001	0.0257134001	0.5933764
1+5-1+4	-0.00150	-0.0812134001	0.0782134001	1.0000000
2+3-1+4	-0.02725	-0.1069634001	0.0524634001	0.9993155
2+3+4-1+4	-0.08075	-0.1604634001	-0.0010365999	0.0437062
2+4-1+4	-0.01275	-0.0924634001	0.0669634001	1.0000000
2+4+1-1+4	-0.04975	-0.1294634001	0.0299634001	0.7313483

2+4+5-1+4	0.06450	-0.0152134001	0.1442134001	0.2716822
2+5-1+4	0.04325	-0.0364634001	0.1229634001	0.8948807
3+1+5-1+4	-0.09200	-0.1717134001	-0.0122865999	0.0089909
3+4-1+4	-0.05175	-0.1314634001	0.0279634001	0.6680724
3+5-1+4	-0.08000	-0.1597134001	-0.0002865999	0.0481845
4+5-1+4	-0.05025	-0.1299634001	0.0294634001	0.7159232
4+5+1-1+4	-0.04675	-0.1264634001	0.0329634001	0.8163973
4+5+3+2-1+4	-0.08575	-0.1654634001	-0.0060365999	0.0222098
5+1+2+3+4-1+4	-0.07400	-0.1537134001	0.0057134001	0.1008297
5+1+3+2-1+4	-0.05500	-0.1347134001	0.0247134001	0.5597159
C+-1+4	0.02400	-0.0557134001	0.1037134001	0.9998886
1+5-1+4+5	0.05250	-0.0272134001	0.1322134001	0.6434544
2+3-1+4+5	0.02675	-0.0529634001	0.1064634001	0.9994696
2+3+4-1+4+5	-0.02675	-0.1064634001	0.0529634001	0.9994696
2+4-1+4+5	0.04125	-0.0384634001	0.1209634001	0.9283513
2+4+1-1+4+5	0.00425	-0.0754634001	0.0839634001	1.0000000
2+4+5-1+4+5	0.11850	0.0387865999	0.1982134001	0.0001173
2+5-1+4+5	0.09725	0.0175365999	0.1769634001	0.0040312
3+1+5-1+4+5	-0.03800	-0.1177134001	0.0417134001	0.9658673
3+4-1+4+5	0.00225	-0.0774634001	0.0819634001	1.0000000
3+5-1+4+5	-0.02600	-0.1057134001	0.0537134001	0.9996439
4+5-1+4+5	0.00375	-0.0759634001	0.0834634001	1.0000000
4+5+1-1+4+5	0.00725	-0.0724634001	0.0869634001	1.0000000
4+5+3+2-1+4+5	-0.03175	-0.1114634001	0.0479634001	0.9951204
5+1+2+3+4-1+4+5	-0.02000	-0.0997134001	0.0597134001	0.9999935
5+1+3+2-1+4+5	-0.00100	-0.0807134001	0.0787134001	1.0000000
C+-1+4+5	0.07800	-0.0017134001	0.1577134001	0.0621581
2+3-1+5	-0.02575	-0.1054634001	0.0539634001	0.9996895
2+3+4-1+5	-0.07925	-0.1589634001	0.0004634001	0.0530629
2+4-1+5	-0.01125	-0.0909634001	0.0684634001	1.0000000
2+4+1-1+5	-0.04825	-0.1279634001	0.0314634001	0.7756364
2+4+5-1+5	0.06600	-0.0137134001	0.1457134001	0.2361599
2+5-1+5	0.04475	-0.0349634001	0.1244634001	0.8642840
3+1+5-1+5	-0.09050	-0.1702134001	-0.0107865999	0.0112302
3+4-1+5	-0.05025	-0.1299634001	0.0294634001	0.7159232

3+5-1+5	-0.07850	-0.1582134001	0.0012134001	0.0583689
4+5-1+5	-0.04875	-0.1284634001	0.0309634001	0.7612325
4+5+1-1+5	-0.04525	-0.1249634001	0.0344634001	0.8530525
4+5+3+2-1+5	-0.08425	-0.1639634001	-0.0045365999	0.0273383
5+1+2+3+4-1+5	-0.07250	-0.1522134001	0.0072134001	0.1197523
5+1+3+2-1+5	-0.05350	-0.1332134001	0.0262134001	0.6101561
C+-1+5	0.02550	-0.0542134001	0.1052134001	0.9997299
2+3+4-2+3	-0.05350	-0.1332134001	0.0262134001	0.6101561
2+4-2+3	0.01450	-0.0652134001	0.0942134001	1.0000000
2+4+1-2+3	-0.02250	-0.1022134001	0.0572134001	0.9999581
2+4+5-2+3	0.09175	0.0120365999	0.1714634001	0.0093325
2+5-2+3	0.07050	-0.0092134001	0.1502134001	0.1493350
3+1+5-2+3	-0.06475	-0.1444634001	0.0149634001	0.2655330
3+4-2+3	-0.02450	-0.1042134001	0.0552134001	0.9998489
3+5-2+3	-0.05275	-0.1324634001	0.0269634001	0.6351726
4+5-2+3	-0.02300	-0.1027134001	0.0567134001	0.9999413
4+5+1-2+3	-0.01950	-0.0992134001	0.0602134001	0.9999957
4+5+3+2-2+3	-0.05850	-0.1382134001	0.0212134001	0.4439822
5+1+2+3+4-2+3	-0.04675	-0.1264634001	0.0329634001	0.8163973
5+1+3+2-2+3	-0.02775	-0.1074634001	0.0519634001	0.9991237
C+-2+3	0.05125	-0.0284634001	0.1309634001	0.6842543
2+4-2+3+4	0.06800	-0.0117134001	0.1477134001	0.1939570
2+4+1-2+3+4	0.03100	-0.0487134001	0.1107134001	0.9963475
2+4+5-2+3+4	0.14525	0.0655365999	0.2249634001	0.0000009
2+5-2+3+4	0.12400	0.0442865999	0.2037134001	0.0000444
3+1+5-2+3+4	-0.01125	-0.0909634001	0.0684634001	1.0000000
3+4-2+3+4	0.02900	-0.0507134001	0.1087134001	0.9984283
3+5-2+3+4	0.00075	-0.0789634001	0.0804634001	1.0000000
4+5-2+3+4	0.03050	-0.0492134001	0.1102134001	0.9970123
4+5+1-2+3+4	0.03400	-0.0457134001	0.1137134001	0.9892396
4+5+3+2-2+3+4	-0.00500	-0.0847134001	0.0747134001	1.0000000
5+1+2+3+4-2+3+4	0.00675	-0.0729634001	0.0864634001	1.0000000
5+1+3+2-2+3+4	0.02575	-0.0539634001	0.1054634001	0.9996895
C+-2+3+4	0.10475	0.0250365999	0.1844634001	0.0012118

2+4+1-2+4	-0.03700	-0.1167134001	0.0427134001	0.9737209
2+4+5-2+4	0.07725	-0.0024634001	0.1569634001	0.0682409
2+5-2+4	0.05600	-0.0237134001	0.1357134001	0.5261273
3+1+5-2+4	-0.07925	-0.1589634001	0.0004634001	0.0530629
3+4-2+4	-0.03900	-0.1187134001	0.0407134001	0.9563861
3+5-2+4	-0.06725	-0.1469634001	0.0124634001	0.2090929
4+5-2+4	-0.03750	-0.1172134001	0.0422134001	0.9699873
4+5+1-2+4	-0.03400	-0.1137134001	0.0457134001	0.9892396
4+5+3+2-2+4	-0.07300	-0.1527134001	0.0067134001	0.1131475
5+1+2+3+4-2+4	-0.06125	-0.1409634001	0.0184634001	0.3595679
5+1+3+2-2+4	-0.04225	-0.1219634001	0.0374634001	0.9126580
C+-2+4	0.03675	-0.0429634001	0.1164634001	0.9754495
2+4+5-2+4+1	0.11425	0.0345365999	0.1939634001	0.0002451
2+5-2+4+1	0.09300	0.0132865999	0.1727134001	0.0077385
3+1+5-2+4+1	-0.04225	-0.1219634001	0.0374634001	0.9126580
3+4-2+4+1	-0.00200	-0.0817134001	0.0777134001	1.0000000
3+5-2+4+1	-0.03025	-0.1099634001	0.0494634001	0.9973043
4+5-2+4+1	-0.00050	-0.0802134001	0.0792134001	1.0000000
4+5+1-2+4+1	0.00300	-0.0767134001	0.0827134001	1.0000000
4+5+3+2-2+4+1	-0.03600	-0.1157134001	0.0437134001	0.9801156
5+1+2+3+4-2+4+1	-0.02425	-0.1039634001	0.0554634001	0.9998701
5+1+3+2-2+4+1	-0.00525	-0.0849634001	0.0744634001	1.0000000
C+-2+4+1	0.07375	-0.0059634001	0.1534634001	0.1038004
2+5-2+4+5	-0.02125	-0.1009634001	0.0584634001	0.9999828
3+1+5-2+4+5	-0.15650	-0.2362134001	-0.0767865999	0.0000001
3+4-2+4+5	-0.11625	-0.1959634001	-0.0365365999	0.0001735
3+5-2+4+5	-0.14450	-0.2242134001	-0.0647865999	0.0000011
4+5-2+4+5	-0.11475	-0.1944634001	-0.0350365999	0.0002248
4+5+1-2+4+5	-0.11125	-0.1909634001	-0.0315365999	0.0004092
4+5+3+2-2+4+5	-0.15025	-0.2299634001	-0.0705365999	0.0000004
5+1+2+3+4-2+4+5	-0.13850	-0.2182134001	-0.0587865999	0.0000032
5+1+3+2-2+4+5	-0.11950	-0.1992134001	-0.0397865999	0.0000984
C+-2+4+5	-0.04050	-0.1202134001	0.0392134001	0.9387854
3+1+5-2+5	-0.13525	-0.2149634001	-0.0555365999	0.0000058

3+4-2+5	-0.09500	-0.1747134001	-0.0152865999	0.0057097
3+5-2+5	-0.12325	-0.2029634001	-0.0435365999	0.0000508
4+5-2+5	-0.09350	-0.1732134001	-0.0137865999	0.0071757
4+5+1-2+5	-0.09000	-0.1697134001	-0.0102865999	0.0120856
4+5+3+2-2+5	-0.12900	-0.2087134001	-0.0492865999	0.0000181
5+1+2+3+4-2+5	-0.11725	-0.1969634001	-0.0375365999	0.0001458
5+1+3+2-2+5	-0.09825	-0.1779634001	-0.0185365999	0.0034465
C+-2+5	-0.01925	-0.0989634001	0.0604634001	0.9999965
3+4-3+1+5	0.04025	-0.0394634001	0.1199634001	0.9420158
3+5-3+1+5	0.01200	-0.0677134001	0.0917134001	1.0000000
4+5-3+1+5	0.04175	-0.0379634001	0.1214634001	0.9207626
4+5+1-3+1+5	0.04525	-0.0344634001	0.1249634001	0.8530525
4+5+3+2-3+1+5	0.00625	-0.0734634001	0.0859634001	1.0000000
5+1+2+3+4-3+1+5	0.01800	-0.0617134001	0.0977134001	0.9999989
5+1+3+2-3+1+5	0.03700	-0.0427134001	0.1167134001	0.9737209
C+-3+1+5	0.11600	0.0362865999	0.1957134001	0.0001812
3+5-3+4	-0.02825	-0.1079634001	0.0514634001	0.9988868
4+5-3+4	0.00150	-0.0782134001	0.0812134001	1.0000000
4+5+1-3+4	0.00500	-0.0747134001	0.0847134001	1.0000000
4+5+3+2-3+4	-0.03400	-0.1137134001	0.0457134001	0.9892396
5+1+2+3+4-3+4	-0.02225	-0.1019634001	0.0574634001	0.9999647
5+1+3+2-3+4	-0.00325	-0.0829634001	0.0764634001	1.0000000
C+-3+4	0.07575	-0.0039634001	0.1554634001	0.0819533
4+5-3+5	0.02975	-0.0499634001	0.1094634001	0.9978164
4+5+1-3+5	0.03325	-0.0464634001	0.1129634001	0.9916296
4+5+3+2-3+5	-0.00575	-0.0854634001	0.0739634001	1.0000000
5+1+2+3+4-3+5	0.00600	-0.0737134001	0.0857134001	1.0000000
5+1+3+2-3+5	0.02500	-0.0547134001	0.1047134001	0.9997970
C+-3+5	0.10400	0.0242865999	0.1837134001	0.0013702
4+5+1-4+5	0.00350	-0.0762134001	0.0832134001	1.0000000
4+5+3+2-4+5	-0.03550	-0.1152134001	0.0442134001	0.9828212
5+1+2+3+4-4+5	-0.02375	-0.1034634001	0.0559634001	0.9999047
5+1+3+2-4+5	-0.00475	-0.0844634001	0.0749634001	1.0000000
C+ 4+5	0.07425	-0.0054634001	0.1539634001	0.0979298
<hr/>				
4+5+3+2-4+5+1	-0.03900	-0.1187134001	0.0407134001	0.9563861
5+1+2+3+4-4+5+1	-0.02725	-0.1069634001	0.0524634001	0.9993155
5+1+3+2-4+5+1	-0.00825	-0.0879634001	0.0714634001	1.0000000
C+-4+5+1	0.07075	-0.0089634001	0.1504634001	0.1453503
5+1+2+3+4-4+5+3+2	0.01175	-0.0679634001	0.0914634001	1.0000000
5+1+3+2-4+5+3+2	0.03075	-0.0489634001	0.1104634001	0.9966940
C+-4+5+3+2	0.10975	0.0300365999	0.1894634001	0.0005274
5+1+3+2-5+1+2+3+4	0.01900	-0.0607134001	0.0987134001	0.9999972
C+-5+1+2+3+4	0.09800	0.0182865999	0.1777134001	0.0035846
C+-5+1+3+2	0.07900	-0.0007134001	0.1587134001	0.0547826

Anexo 15. Prueba Kruskal Wallis para tratamiento con antisépticos y fagos de *M. morgani*.

Nombre	Valor P	Rechazo	Conclusión
Betasept	0.0666	No	La distribución de las medias es igual.
Betadine	0.0114	Sí	Las distribución de las medias no es igual

*Siendo Ho: Las medias de la población son iguales, con $\alpha=0.05$

Evaluación y análisis de bacteriófagos silvestres para la
inhibición de formación de biopelículas de *Klebsiella*
pneumoniae y *Morganella morganii*