



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Programa de Posgrado Integral en Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en
Biotecnología Ambiental

**Caracterización y evaluación de dos
bacteriófagos como agentes de control biológico
contra cepas de *Escherichia coli* aisladas de
muestras ambientales**

T E S I S

Que presenta

L.B.G Jorge Alejandro Padilla Medina

Como requisito para obtener
el grado de

**Maestría en Ciencias
en Biotecnología Ambiental**

Directores de Tesis

Dra. Maribel Jiménez Edeza

Dra. Mitzi Dayanira Estrada Acosta

Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

Noviembre de 2024



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



PRESENTACIÓN

La presente investigación, titulada “**Caracterización y evaluación de dos bacteriófagos como agentes de control biológico contra cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras ambientales**”, se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas y en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Los C. Dra. Gloria Marisol Castañeda Ruelas, Dr. Luis Alfonso Amarillas Bueno, Dra. Mitzi Dayanira Estrada Acosta (Directora de Tesis) y Dra. Maribel Jiménez Edeza (Directora de Tesis) participaron como Asesores Académicos.

El C. L.B.G Jorge Alejandro Padilla Medina recibió “Beca Nacional para Estudios de Posgrado (Maestría)” otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) durante sus estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca que me fue otorgada para la realización de este programa de posgrado y por los recursos asignados para la realización de esta investigación a través del fondo otorgado en la convocatoria de **“Ciencia de Frontera 2019” al proyecto titulado “Biología sintética aplicada al diseño y construcción de partículas virales artificiales para el control de bacterias patógenas multirresistentes”**, con número de identificación: **1043168**.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por brindarme la oportunidad de seguir con mi crecimiento tanto académico como personal. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todo el personal académico y administrativo de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, así como a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa por ser fundamentales en mi formación y, con ello, en el desarrollo de esta investigación, así como las facilidades que me fueron brindadas para realizarla.

Agradezco a todos los integrantes de mi comité de tesis por el apoyo brindado durante el tiempo de mi investigación, que siempre estuvieron ahí para transmitir conocimiento y consejo que ha sido de gran importancia para el mejoramiento continuo del proyecto y mi aprendizaje.

De manera especial, quiero expresar mi más profundo agradecimiento y reconocimiento a la Dra. Mitzi Dayanira Estrada Acosta, cuya contribución fue esencial para la realización de este trabajo de tesis. Pues no sólo aportó la idea original que dio

origen a esta investigación, sino que también desempeñó un papel clave en el diseño del proyecto, ofreciendo asesoría técnica de alto nivel. Además, facilitó todos los recursos necesarios para que este trabajo pudiera llevarse a cabo en las mejores condiciones. Su compromiso y conocimiento fueron fundamentales en cada etapa de esta investigación, y su influencia permea de manera significativa en todos los aspectos de este trabajo.

De igual forma, agradezco a todos los compañeros de trabajo que estuvieron conmigo a lo largo de este proyecto, y hoy los considero no solo compañeros, si no, amigos.

A mi familia por apoyarme siempre y ser una de mis principales motivaciones a superarme, especialmente a mi madre Irma Medina, quien ha sido uno de mis grandes ejemplos a seguir preparándome y uno de los pilares de mayor importancia en mi vida.

A mi prometida, Lizbeth Avilez, que se ha convertido en mi inspiración para seguir esforzándome, no solo a lo largo de este proyecto sino en todos los aspectos, así como brindarme ese apoyo incondicional cuando el trabajo se torna complicado, en cuestiones tanto personales como relacionadas a mi formación académica, por todo eso y más, gracias.

ÍNDICE GENERAL

		Pag
	ÍNDICE DE FIGURAS	IX
	ÍNDICE DE CUADROS	XI
I	RESUMEN	1
	ABSTRACT	2
II	INTRODUCCIÓN	3
III	REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
	A RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	5
	B ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS	9
	C <i>Escherichia coli</i> COMO AGENTE PATÓGENO	12
	D MÉTODOS DE CONTROL DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS	16
	E GENERALIDADES DE LOS BACTERIÓFAGOS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS	20
	1 Bacteriófagos como alternativa para el control biológico	21
	2 Bacteriófagos como conservantes, desinfectantes e inhibidores de biopelículas	22
	3 Bacteriófagos como herramienta para disminuir la resistencia a los antibióticos y virulencia bacteriana.	23
	F LOS CICLOS DE REPLICACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS Y SU IMPORTANCIA	26
	G VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL USO DE BACTERIÓFAGOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO	29
	H CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS	33
IV	JUSTIFICACIÓN	37
V	HIPÓTESIS	38
VI	OBJETIVOS	39
	A OBJETIVO GENERAL	39

	B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
VII		MATERIALES Y MÉTODOS	40
	A	MATERIALES	40
	1	Material experimental	40
	B	MÉTODOS	41
	1	Esquema de la estrategia experimental para llevar a cabo esta investigación	41
	2	Diálisis de los bacteriófagos para micrografías electrónicas	41
	3	Caracterización morfológica y clasificación taxonómica de los bacteriófagos	43
	4	Multiplicidad de infección óptima	43
	5	Curva de replicación de un solo paso de los bacteriófagos	44
	6	Control de <i>Escherichia coli</i> en agua de riego	45
	7	Ensayo de estabilidad en condiciones de almacenamiento	45
	8	Ensayo de estabilidad a distintas condiciones de pH	45
	9	Ensayo de estabilidad en condiciones de tracto gastrointestinal simulado	46
	10	Tratamiento de datos y análisis estadístico	49
	11	Secuenciación del material genético de los bacteriófagos y análisis bioinformático	49
VIII		RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
	A	MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN ÓPTIMA	51
	B	CURVA DE REPLICACIÓN DE UN SOLO PASO DE LOS BACTERIÓFAGOS	55
	C	INHIBICIÓN DE <i>Escherichia coli</i> EN AGUA DE USO AGRÍCOLA	58
	D	ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LOS BACTERIÓFAGOS	61
	E	ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS A DISTINTOS NIVELES DE PH	65

	F ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS EN CONDICIONES DE TRACTO GASTROINTESTINAL SIMULADO	69
	G SECUENCIACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO DE LOS BACTERIÓFAGOS Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	73
	1 Análisis bioinformático del genoma de FEco-32	73
s	2 Análisis bioinformático del genoma de FEco-59	76
	H MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS BACTERIÓFAGOS	79
IX	CONCLUSIONES	81
X	BIBLIOGRAFÍA	82
XI	ABREVIATURAS	105
XII	ANEXOS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pag.
1	Ciclos lítico y lisogénico de un bacteriófago	27
2	Estrategia experimental para la caracterización de los bacteriófagos	42
3	Curva de inhibición bacteriana inducida por el bacteriófago FEco-32	52
4	Curva de inhibición bacteriana inducida por el bacteriófago FEco-59	53
5	Curva de replicación de un solo paso del bacteriófago FEco-32	56
6	Curva de replicación de un solo paso del bacteriófago FEco-59	57
7	Control de <i>E. coli</i> en agua de riego en condiciones <i>in vitro</i>	59
8	Concentración del bacteriófago FEco-32 (UFP/ml) después de exposición a temperaturas de 4 °C y 40 °C	63
9	Concentración del bacteriófago FEco-59 (UFP/ml) después de exposición a temperaturas de 4 °C y 40 °C	64
10	Concentración del bacteriófago FEco-32 después de ser expuesto a los distintos niveles de pH	66
11	Concentración del bacteriófago FEco-59 después de ser expuesto a los distintos niveles de pH	68
12	Concentración del bacteriófago FEco-32 al ser expuesto a las distintas fases del tracto gastrointestinal simulado	70
13	Concentración del bacteriófago FEco-59 al ser expuesto a las distintas fases del tracto gastrointestinal simulado	72

14	Representación gráfica del genoma del bacteriófago FEco-32	75
15	Representación gráfica del genoma del bacteriófago FEco-59	78
16	Micrografías electrónicas del bacteriófago FEco-59	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pag.
1	Reactivos y las concentraciones de estos utilizados para la formulación de los fluidos del tracto gastrointestinal simulado	47
2	Concentraciones de las enzimas, así como sales biliares y CaCl ₂ utilizados en la formulación de los fluidos del tracto gastrointestinal simulado	48
3	Generalidades del genoma del bacteriófago FEco-32	74
4	Genes identificados en el genoma de FEco-32 con ayuda de BLAST de NCBI	75

I. RESUMEN

Las infecciones de origen bacteriano constituyen una de las principales amenazas para la salud pública global. Esto se agrava con el surgimiento de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos, siendo *Escherichia coli* uno de los patógenos con la tasa de morbimortalidad más alta. Entre las estrategias emergentes contra estas bacterias, destaca el uso de bacteriófagos. Por ello, la presente investigación tiene como objetivo la caracterización biológica, taxonómica y genómica de dos bacteriófagos para determinar su potencial como agentes de control biológico de *E. coli*. Para ello, se realizaron ensayos de exposición de estos ante distintas condiciones (pH, temperatura, tracto gastrointestinal simulado), así como secuenciación de genoma completo. Con ello, se logró determinar que los bacteriófagos presentan estabilidad a diferentes condiciones de pH, temperatura, así como a condiciones de tracto gastrointestinal simulado. Además, exhiben capacidad bacteriolítica en medio de cultivo y agua de riego sobre las cepas de *E. coli* hospederas. El análisis bioinformático, determinó que ambos fagos pertenecen a la clase *Caudoviricetes*. FEco-32 pertenece a la familia *Drexlerviridae* y con un tamaño de genoma de 40.2 kb, que codifica para 64 genes, mientras que FEco-59 pertenece a la familia *Straboviridae*, tiene un genoma de 169.4 kb y codifica para 166 genes. FEco-32 no presenta genes que potencialmente representen un riesgo de bioseguridad, mientras que en FEco-59 se identificó un posible gen de alergenicidad, por lo que se sugiere el uso de biología sintética para eliminarlo en el futuro, para hacer uso del potencial biológico como agentes de control de *E. coli* que estos bacteriófagos demostraron.

Palabras clave: *Escherichia coli*, bacteriófagos, multirresistencia, factores de virulencia.

ABSTRACT

Bacterial infections pose a significant threat to global public health, exacerbated by the rise of antimicrobial-resistant bacteria, with *Escherichia coli* being one of the pathogens associated with the highest rates of morbidity and mortality. Among the emerging strategies to combat these bacteria, the use of bacteriophages has garnered considerable attention. This study focuses on the biological, taxonomic, and genomic characterization of two bacteriophages to evaluate their potential as biological control agents against *E. coli*. Phage stability tests were conducted under various conditions, including pH, temperature, and simulated gastrointestinal tract environments, along with whole genome sequencing. Results revealed that the bacteriophages exhibited stability across diverse pH and temperature ranges, as well as resilience under simulated gastrointestinal conditions. Additionally, both phages demonstrated bacteriolytic activity in culture media and irrigation water when applied to *E. coli* strains. Bioinformatic analyses identified both phages as members of the Caudoviricetes class. Phage FEco-32 belongs to the *Drexlerviridae* family, with a genome size of 40.2 kb, encoding 64 genes, while FEco-59 is part of the *Straboviridae* family, possessing a genome of 169.4 kb and encoding 166 genes. Notably, FEco-32 does not carry genes that pose biosecurity risks, whereas FEco-59 contains a putative allergenicity gene. The potential for synthetic biology to remove this gene in the future is suggested, enhancing the potential utility of these bacteriophages as effective biological control agents against *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*, bacteriophages, multi-resistance, virulence factors.

II. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas se encuentran entre las diez principales causas de morbimortalidad a nivel global, representando un grave problema de salud pública. Esta situación se ve agravada por el rápido incremento en el surgimiento de cepas multirresistentes a los antibióticos, y por la capacidad de ciertas variantes para inducir distintas patologías. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado una lista de los patógenos bacterianos prioritarios para los que se necesita el desarrollo urgente de nuevos agentes terapéuticos. El grupo de prioridad crítica incluye enterobacterias como *Escherichia coli* (OMS, 2024).

Además, estudios recientes han asociado a ciertos patotipos de *E. coli* con la inducción de algunas lesiones precancerosas en el tracto gastrointestinal, ha exacerbado aún más la preocupación por este tipo de bacterias (Arthur y col., 2014; Mármol y col., 2017). Este panorama destaca la necesidad por desarrollar agentes antimicrobianos más eficaces, que permitan reforzar los esquemas sanitarios y de salud pública. En este contexto, se han explorado distintas alternativas, tales como nanopartículas de óxido metálico, sistemas para la entrega dirigida de fármacos, antibióticos basados en nanocompuestos, entre otros (Gontsarik y col., 2016; Logeswari y col., 2015; Magdalane y col., 2016).

Entre las alternativas más promisorias, el uso de bacteriófagos como agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones de etiología bacteriana ha mostrado gran potencial (Sillankorva y col., 2011). Entre las ventajas más destacadas se encuentran las siguientes: (a) Los bacteriófagos son agentes inoos, por lo que no han sido reportados

efectos adversos en su uso. (b) Son altamente específicos. (c) Son efectivos incluso contra bacterias resistentes a los antibióticos. (d) Debido a su necesidad de la maquinaria bacteriana para replicarse, pueden controlar una alta concentración de bacteria y después se autolimita su propagación. (e) No afectan células eucariotas, por lo tanto, no afectan negativamente la salud humana. Estas ventajas han motivado a diversas instituciones, en otros países, a establecer líneas de investigación enfocadas a aislar y caracterizar bacteriófagos para determinar su potencial como agentes terapéuticos (Harshitha y col., 2022).

La gran diversidad de bacteriófagos, en términos de tamaños, morfotipos, organización estructural, simetría y especificidad de reconocimiento al hospedero, hacen que el éxito de su aplicación dependa en gran medida de su correcta selección. En este contexto, el desarrollo de aplicaciones bionanotecnológicas, basadas en bacteriófagos, debe ser impulsado por los avances en la secuenciación genómica, el análisis bioinformático y otras técnicas moleculares, que permiten seleccionar al bacteriófago con el mayor potencial como agente de control de bacterias patógenas (Rogovski y col., 2021).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es la caracterización biológica, genómica y taxonómica de dos bacteriófagos aislados a partir de muestras ambientales.

III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

A RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son un tipo de fármacos que se utilizan para tratar y prevenir infecciones ocasionadas por bacterias. La resistencia a los antibióticos ocurre cuando las bacterias cambian la respuesta al uso de estos medicamentos (gracias a la transferencia genética horizontal o mutaciones genéticas). Estas bacterias resistentes pueden infectar tanto humanos como animales, y las infecciones que causan son cada vez más difíciles de tratar, debido a que no se les puede controlar de manera efectiva (OMS, 2024).

La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias evolucionan para evadir el efecto de los antibióticos a través de múltiples mecanismos diferentes. La diseminación de genes de resistencia a los antibióticos es un problema ecológico y de salud pública. Algunas bacterias son capaces de neutralizar un antibiótico alterando su componente para hacerlo ineficaz. Otras pueden ser capaces de exportar los antibióticos fuera de las bacterias, y algunas pueden modificar su estructura externa y sus receptores para que los antibióticos no puedan adherirse a ellos. Estos mecanismos pueden hacer que algunas bacterias sobrevivan al uso del antibiótico específico y desarrollen una resistencia que puede transmitirse a otras bacterias a medida que se multiplican. Las bacterias también pueden volverse resistentes a través de la mutación de su material genético.

El mecanismo de resistencia a los antibióticos se clasifica comúnmente en los siguientes cuatro grupos:

Resistencia intrínseca: las bacterias pueden sobrevivir a un antibiótico gracias a la resistencia que adquieren a través de la evolución, modificando su estructura o sus componentes. Por ejemplo, un antibiótico que afecta el mecanismo de construcción de la pared de las bacterias, como la penicilina, no puede afectar a las bacterias que no tienen pared celular (Habboush y Guzman, 2023).

Resistencia adquirida: las bacterias pueden generar la capacidad de resistir la actividad de un agente antimicrobiano particular al que anteriormente eran susceptibles. Las bacterias pueden adquirir esta resistencia a través de una nueva mutación genética que ayuda a la bacteria a sobrevivir o bien, al obtener ADN de una bacteria que ya es resistente. Un ejemplo es la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* a la rifamicina (Arzanlou y col., 2017).

Cambio genético: el ADN de las bacterias puede alterar la producción de proteínas, lo que genera diferentes componentes y receptores bacterianos que hacen que los antibióticos no las reconozcan y, por ende, sea incapaz de cumplir su función. Las bacterias que comparten el entorno pueden albergar determinantes genéticos de resistencia que alterarían la genómica de las bacterias de dicho entorno. Un ejemplo es la resistencia de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Haemophilus influenza* a la trimetoprima.

Transferencia de ADN: Las bacterias pueden compartir componentes genéticos con otras bacterias y transferir el ADN resistente mediante una transferencia horizontal de genes. Por lo general, las bacterias adquieren material genético externo a través de alguno de los tres mecanismos principales (Virolle y col., 2020; Walsh y Johnson, 1996):

- Transformación: Se trata de la incorporación de ADN libre al interior de la célula bacteriana
- Transducción: El ADN bacteriano es transferido de una bacteria a otra mediante un virus (bacteriófago).
- Conjugación: Transferencia del ADN mediante plásmidos de una célula donante a una célula receptora.

Varios organismos son resistentes a múltiples antibióticos. Por ejemplo, las bacterias *E. coli* y *Enterococcus* aisladas que son inhibidas por cefoxitina, ciprofloxacino o eritromicina suelen ser resistentes a al menos un antibiótico y, a veces, a varios tipos de antibióticos, incluidos macrólidos, tetraciclinas, betalactámicos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y rifamicina (Habboush y Guzman, 2023).

En particular, las cepas emergentes de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos representan un desafío terapéutico importante, ya que confieren un riesgo elevado de muerte. Aunque actualmente se están desarrollando vacunas que pueden prevenir infecciones invasivas por *E. coli*, no hay vacunas disponibles en la práctica clínica (Xing y col., 2023).

Es por estas razones que se ha considerado por parte de la Organización Mundial de la Salud como prioridad crítica (Nivel 1) a *E. coli*, ya que es una bacteria que presenta gran capacidad de generar resistencia, es de alta incidencia, así como el alto índice de mortalidad entre las personas infectadas (OMS, 2024). Además, esta se encuentra dentro de las 5 bacterias patógenas causantes de más muertes alrededor del mundo según

reportes recientes (*Staphylococcus aureus*, ***Escherichia coli***, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*), lo cual es un motivo más para enfatizar la necesidad del desarrollo de herramientas que ayuden al combate de estos patógenos que pueden convertirse en una de las principales causas de muerte a nivel mundial en los próximos años (Ikuta y col., 2022) superando incluso a las causadas por enfermedades como el cáncer o problemas cardíacos.

Es imperativo que el mundo adopte cambios urgentes en la forma en que prescribe y usa los antibióticos, ya que incluso si se desarrollan nuevos medicamentos, sin un cambio de comportamiento, la resistencia a los antibióticos seguirá siendo una amenaza cada vez más incontrolable. Entre los cambios de comportamiento también deben incluir acciones para reducir la propagación de infecciones mediante la vacunación, el lavado de manos, la práctica de relaciones sexuales con mayor seguridad, así como una buena higiene alimentaria (Cuevas y col., 2021; Muteeb y col., 2023).

En el sector alimentario, particularmente en la agricultura y la ganadería, el uso de antibióticos es mucho mayor, razón por la que es de suma importancia brindar una alternativa como lo son los bacteriófagos para el control de bacterias patógenas. Además, es crucial concientizar a los productores para que utilicen de una manera responsable los antibióticos, ya que, gracias a la transferencia horizontal de genes, poco o nada serviría un buen comportamiento en cuanto al uso de estos productos en la medicina si en el sector agrícola y ganadero se sigue utilizando de forma descomunal y viceversa (Manyi-Loh y col., 2018). En los últimos años, incluso se ha informado de la aparición y amplia distribución de cepas de *E. coli* que muestran resistencia a agentes antimicrobianos de

amplio espectro, por lo que la importancia de desarrollar nuevas alternativas antimicrobianas es una emergencia para la salud pública mundial (Wang y col., 2023).

B ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS

Cada año, los alimentos insalubres causan alrededor de 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos y 420.000 muertes a nivel mundial. De estas muertes, el 30% ocurren entre niños menores de 5 años (Lee y Yoon, 2021). Estas enfermedades, comúnmente conocidas como intoxicación alimentaria, suelen ser causadas por el consumo de alimentos contaminados por bacterias y/o sus toxinas, parásitos, virus, sustancias químicas u otros agentes (Lee y Yoon, 2021).

Diversos factores, como un sistema inmunológico debilitado y la edad, pueden influir en la gravedad de los síntomas de la intoxicación alimentaria. Cuando la FDA se entera de un brote, la Red de Respuesta y Evaluación Coordinadas ante Brotes (CORE) de la agencia trabaja en estrecha colaboración con socios estatales y locales para identificar la causa y prevenir enfermedades adicionales (FDA, 2024).

En casos necesarios, instituciones encargadas de la seguridad alimentaria, como lo es la FDA y COFEPRIS, pueden colaborar con los productores de alimentos para facilitar el retiro voluntario de productos potencialmente contaminados (FDA, 2023).

Dentro de los principales agentes patógenos transmitidos por alimentos, se encuentran *E. coli* patógena, *Campylobacter*, *Salmonella*, y *L. monocytogenes*, que generalmente se aíslan de animales destinados a la producción de alimentos, están asociados con enfermedades transmitidas por los alimentos y brotes en el mundo (Lee y

Yoon, 2021). Por ejemplo, el brote de *Escherichia coli* O104:H4 de 2011 en Alemania, que se extendió a otros países como Francia, Dinamarca, Suecia, Suiza, Países Bajos, Reino Unido, Canadá, República Checa, Grecia, Luxemburgo, Noruega, Austria, Polonia, España y Estados Unidos, causando 2.987 casos de síndrome urémico no hemolítico (SHU), 855 casos de SHU y 53 muertes (Tahden y col., 2016). Y es que, aunque cada país tiene ciertas regulaciones de seguridad alimentaria y control de enfermedades transmitidas por alimentos, este control varía según las condiciones económicas, y es por ello por lo que los más afectados por estas enfermedades son los países en desarrollo.

Además, *E. coli* patógena, no solo tiende a causar infecciones que generalmente provocan diarrea desde leve a grave; y no solo eso, también es la causa más común de infecciones agudas, así como de sepsis del tracto urinario. Por ello, salvaguardar la salud pública durante las reuniones masivas es un gran desafío. A pesar de los recientes avances en las técnicas de conservación de alimentos y la seguridad alimentaria, siguen ocurriendo brotes significativos de enfermedades vinculadas a patógenos transmitidos por estos agentes, lo que indica que aún constituyen riesgos significativos para la salud pública. Ya que, en la actualidad, el método convencional para la detección de *E. coli* requiere varios días, especialmente en casos en los que las concentraciones de *E. coli* son bajas. Es por ello por lo que los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real combinados con enfoques de secuenciación se utilizan más ampliamente que los enfoques basados en inmunoensayos y métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) para la detección de estos patógenos (Malabadi y col., 2024).

Dentro de la nano biotecnología se encuentra uno de los enfoques más recientes para la detección de patógenos, los bacteriófagos, los cuales son utilizados activamente con este propósito gracias a su alta especificidad (Malabadi y col., 2024).

Esto, sumado a que los antibióticos son cada vez menos eficaces contra *E. coli* patógena, así como otros agentes bacterianos, ha causado una necesidad de encontrar y desarrollar otras formas de tratar o prevenir la contaminación por *E. coli*, como los probióticos, las nanopartículas antimicrobianas, y uno de los más prometedores es el uso de bacteriófagos con este propósito, ya que estos son capaces de eliminar incluso a las bacterias que no responden a los antibióticos (Furfaro y col., 2018).

De hecho, múltiples investigadores proponen a estos agentes para el control de cepas bacterianas incluso en alimentos listos para consumo. Por ejemplo, contra *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) que son patógenos transmitidos por los alimentos responsables de importantes brotes en todo el mundo. (Zhou y col., 2022) evaluaron la capacidad del bacteriófago lítico vB_EcoM_SQ17 de Mosigvirus para controlar la EHEC y la ETEC O157:H7 en leche, carne de res y lechuga. Este fago demostró una alta capacidad para reducir los niveles de contaminación por *E. coli* a temperaturas de refrigeración en estas tres matrices.

Por ello, los bacteriófagos son considerados una herramienta auxiliar prometedora para ayudar a combatir las infecciones transmitidas por los alimentos, en particular las que afectan a poblaciones vulnerables como los niños, los ancianos y las mujeres embarazadas. Son autor replicantes saqueadores de especies bacterianas, lo que los hace valiosos para la mitigación de enfermedades, la desinfección a nivel de granja y la

conservación de alimentos. Cada vez se los reconoce más como GRAS (generalmente reconocidos como seguros para su uso en productos alimenticios) y se los considera orgánicos y legítimos. El uso de cócteles de fagos, en particular, han demostrado una actividad notable para contrarrestar las especies resistentes a múltiples fármacos (MDR) y se pueden combinar con otros antimicrobianos seguros, como las bacteriocinas, para aumentar la eficacia y la selectividad (Amjad y col., 2024).

C *Escherichia coli* COMO AGENTE PATÓGENO

Pocos microorganismos son tan versátiles como *Escherichia coli*. No solo es un miembro importante de la microbiota intestinal normal de los seres humanos y otros mamíferos, también se ha utilizado ampliamente como hospedador de clonación en la tecnología del ADN recombinante. Sin embargo, *E. coli* es mucho más que un simple animal de carga de laboratorio o un inofensivo habitante intestinal; también puede ser un patógeno muy versátil y, con frecuencia, mortal. Varias cepas diferentes de *E. coli* causan diversas enfermedades extraintestinales e intestinales mediante la expresión de factores de virulencia que afectan a una amplia gama de procesos celulares (Ducarmon y col., 2019).

E. coli es la bacteria aeróbica predominante de la microbiota intestinal, aunque es superada en número por bacterias anaeróbicas 100:1-10,000:1. En seres humanos, su prevalencia es más del 90% con una concentración por gramo de heces de 1×10^7 a 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo. Algunas cepas de *E. coli* pueden causar patologías tanto extraintestinales (infecciones del tracto urinario (ITU), diversas infecciones pulmonares, intraabdominales, de piel y tejidos blandos, meningitis del recién

nacido (NBM)) como intestinales (diversas formas de diarrea, incluyendo síndrome hemolítico y urémico (SHU)). Estas infecciones pueden ser frecuentes, como en el caso de la ITU, se asocian a una elevada morbilidad y mortalidad. Además, la incidencia de infecciones extraintestinales ha ido en aumento en humanos, y regularmente experimentamos importantes brotes de SHU, como los ocurridos en 2011 en Europa (Denamur y col., 2021).

Existen múltiples cepas de *E. coli* altamente adaptadas que han adquirido atributos de virulencia específicos, lo que les confiere una mayor capacidad para adaptarse a nuevos nichos y causar un amplio espectro de enfermedades. Estos atributos de virulencia se codifican con frecuencia en elementos genéticos que pueden movilizarse entre diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia, o en elementos genéticos que alguna vez pudieron haber sido móviles, pero que ahora han evolucionado para quedar "bloqueados" en el genoma. Solo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido para convertirse en los denominados "PATOTIPOS" específicos de *E. coli* que son capaces de causar enfermedades en individuos sanos (Pakbin y col., 2021)

Existen seis patotipos intestinales bien estudiados de *E. coli*, que incluyen la *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la *E. coli* enteroagregativa (EAEC), la *E. coli* difusamente adherente y la *E. coli* enteroinvasiva (Shin y col., 2024). Estas cepas se clasifican por sus propiedades de virulencia y mecanismos de patogenicidad que causan enfermedades gastrointestinales como la diarrea. La *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) es un tipo de

STEC que puede causar enfermedades entéricas graves, como el síndrome hemolítico urémico y la colitis hemorrágica que conducen a insuficiencia renal aguda y, a menudo, a la muerte. *Escherichia coli* O157:H7, el serotipo más conocido de EHEC, ha causado numerosos brotes de enfermedades transmitidas por el agua y los alimentos en muchos países. La incidencia de STEC no O157 ha aumentado en los últimos años, incluidas las causadas por los serotipos O26, O45, O103, O111, O121 y O145 (Farrokh y col., 2013).

Los diversos patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos clonales que se caracterizan por compartir antígenos O (lipopolisacárido, LPS) y H (flagelar) que definen SEROGRUPOS (antígeno O únicamente) o SEROTIPOS (antígenos O y H)^{2,4}. Las cepas patógenas de *E. coli* utilizan un esquema de patogénesis de varios pasos similar al utilizado por otros patógenos de las mucosas, que consiste en la colonización de un sitio de la mucosa, la evasión de las defensas del huésped, la multiplicación y el daño al huésped. La mayoría de las cepas patógenas de *E. coli* permanecen extracelulares, pero la EIEC es un verdadero patógeno intracelular que es capaz de invadir y replicarse dentro de las células epiteliales y los macrófagos. Otras cepas de *E. coli* pueden ser internalizadas por las células epiteliales en niveles bajos, pero no parecen replicarse intracelularmente (Kaper y col., 2004).

Algunas cepas de *E. coli* también pueden causar enfermedades extraintestinales y se denominan *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). Las ExPEC, que se definieron por asociación con enfermedades, incluyen *E. coli* uropatógena, *E. coli* asociada a meningitis neonatal y *E. coli* causante de sepsis (Sora y col., 2021).

Los ExPEC también están implicados en infecciones que se originan en fuentes abdominales y pélvicas, que incluyen, entre otras, infecciones biliares, peritonitis infecciosa y enfermedad inflamatoria pélvica (Sharma y col., 2014). La invasión hematogena de ExPEC desde el foco infeccioso inicial da como resultado el síndrome de sepsis, que puede provocar la muerte en ausencia de un tratamiento oportuno (Dale y Woodford, 2015).

Las cepas patógenas de *E. coli* están implicadas en muchos brotes transmitidos por el agua, y se ha informado con frecuencia que STEC y EPEC son responsables de brotes transmitidos por el agua en todo el mundo. La contaminación del medio ambiente por *E. coli* patógena puede ocurrir a través del estiércol y otros desechos animales, efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y aguas residuales de mataderos. Aunque se han realizado estudios extensos sobre los aspectos clínicos de las cepas patógenas de *E. coli*, incluido el diagnóstico, el modo de patogénesis y las fuentes, así como su prevalencia en el medio ambiente, no ha sido examinada a profundidad. Esto enfatiza la necesidad de estudios adicionales para comprender la ecología de estas bacterias en entornos extraintestinales (Jang y col., 2017).

Lo anterior, sumado a la creciente aparición de cepas resistentes de *E. coli* constituye en un problema de suma importancia, ya que es algo que se da tanto en el sector humano como en el animal desde una perspectiva de “Una Salud”. En los animales, la resistencia a múltiples fármacos de *E. coli* puede provocar infecciones difíciles de tratar, pero lo que es aún más importante, constituye un reservorio importante y compartido de determinantes de resistencia a la mayoría de las familias de agentes

antimicrobianos en un gran número de especies animales, incluidos los humanos (Karim y col., 2001).

Aunque aún quedan por esclarecer las diferentes vías de transmisión de los aislados resistentes de *E. coli* de los animales a los humanos y por cuantificar su importancia relativa, algunos datos pueden respaldar el papel de la cadena alimentaria, ya que se ha demostrado que esas bacterias son colonizadores comunes de los productos alimenticios en los comercios minoristas de muchos países y continentes. Otras vías de transmisión pueden incluir contactos directos con animales o transferencias indirectas a través del medio ambiente. Dado que *E. coli* es una bacteria que está ampliamente distribuida en todos los sectores, la resistencia a los antimicrobianos de *E. coli* en animales ha dado lugar a numerosas iniciativas intersectoriales y conjuntas, que abarcan la investigación traslacional, la epidemiología y la vigilancia tanto en medicina humana como veterinaria (Poirel y col., 2018).

D MÉTODOS DE CONTROL DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

Incluso en el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por los alimentos siguen siendo uno de los problemas de salud más graves en todo el mundo. El número de brotes de los patógenos más comunes, como *Campylobacter* y *Salmonella*, se ha mantenido estable en los últimos 5 años. Sin embargo, otros como *Listeria monocytogenes* o *Escherichia coli* productora de toxina Shiga han ido en aumento. Esto sugiere que el control de los patógenos alimentarios sigue siendo un desafío importante para nuestra sociedad (Rendueles y col., 2022)

Estos microorganismos indeseables pueden estar presentes en productos alimenticios, entornos de fabricación o instalaciones de procesamiento y podrían transmitirse a lo largo de toda la cadena de producción de alimentos, lo cual ha motivado a dirigir esfuerzos para reducir la carga microbiana en estos productos utilizando distintas técnicas (Ríos-Tobón y col., 2017).

Los métodos actuales para el control de microorganismos patógenos en alimentos presentan limitaciones significativas. Tratamientos físicos como el vapor, calor seco y luz ultravioleta no pueden ser utilizados en todos los productos alimenticios, debido a que pueden provocar deterioro de las propiedades organolépticas de los alimentos (Munir y col., 2023). Por otro lado, los tratamientos químicos como el cloro, el ácido peroxiacético, entre otros pueden generar subproductos nocivos para la salud, ya que el consumo de alimentos con altos niveles de limpiadores o desinfectantes químicos puede causar una variedad de problemas de salud, desde molestias leves hasta vómitos severos, diarrea o incluso la muerte por intoxicación en casos extremos (Rather y col., 2017); así mismo, el uso generalizado de estos productos ha originado el desarrollo de bacterias resistentes.

Otras estrategias que resaltan para el control de estas bacterias son: recubrimientos activos, este tipo de envase puede limitar o prevenir el crecimiento de bacterias que pueden estropear los alimentos. También puede prolongar la vida útil de los alimentos y mejorar la seguridad alimentaria (Deepika y col., 2023; Yuvaraj y col., 2021).

Los productos alimenticios que se han sometido a un adecuado proceso de desinfección generalmente están libres de patógenos y son considerados como seguros. Sin embargo, investigaciones epidemiológicas exhaustivas han revelado que la presencia

de patógenos como *E. coli* en productos alimenticios se debe con frecuencia a la recontaminación posterior al proceso de desinfección (García-Robles y col., 2017).

Por lo tanto, a pesar de los avances recientes para evitar la transmisión de agentes patógenos bacterianos a través de los alimentos, aún se requieren nuevas herramientas para cumplir con las demandas del consumidor y sobre todo que garanticen la preservación de la salud (Navarro, 2018).

Los bacteriófagos y los péptidos antimicrobianos sintetizados por las bacterias para el control de las cepas patógenas en alimentos contaminados, se han convertido en alternativas viables en años recientes e incluso existen productos comerciales a base de estos (Martínez y col., 2019; Mills y col., 2017). Por ejemplo, EcoShield™ de la empresa Intralytix Inc. que demostró poder disminuir la concentración de *E. coli* productora de toxina shiga hasta en un 80% en ocho tipos de alimentos distintos: asado de carne, carne picada, pechuga de pollo, pollo cocido, salmón, queso, melón y hojas de mostaza (Vikram y col., 2020).

Se han producido avances significativos en la creación de nuevas terapias con fagos aprobadas por la FDA para una variedad de trastornos críticos. Estos incluyen *E. coli* O157:H7, *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Se puede encontrar más evidencia a favor del uso de fagos para la seguridad alimentaria en la siguiente lista de estudios recientes. Los científicos descubrieron un fago anti-*Listeria* SH3-3 en una planta de procesamiento de alimentos y evaluaron la eficiencia como control biológico contra *L. monocytogenes* tanto en salmón como en jugo de naranja (Zhou y col., 2020). Los investigadores demostraron la capacidad de control biológico del fago anti-*Salmonella enteritidis* SE07 en una variedad de productos minoristas, como jugo de

frutas, huevos frescos, carne de res y aves de corral. También descubrieron que el jugo de frutas y los huevos frescos tenían una disminución de 2 logaritmos en los gérmenes después de una prueba de 48h a 4 °C. Toda la investigación mencionada anteriormente respalda firmemente la creación continua de productos a base de fagos con una amplia gama de huéspedes a la luz de las diferentes aplicaciones potenciales (Thung y col., 2017).

El uso de bacteriófagos puede ser beneficioso en varias etapas de la cadena de producción de alimentos. Diversas investigaciones demuestran que el control biológico con bacteriófagos es una herramienta complementaria viable en una estrategia de múltiples frentes para detener la propagación de infecciones transmitidas por los alimentos. Esta estrategia además muestra otra característica deseable, y es que los procesadores de alimentos intentan mantener la comunidad bacteriana normal, y a menudo favorable de nutrientes, eliminando únicamente los patógenos que podrían causar infecciones en las personas (Imran y col., 2023).

Con el exponencial aumento de la población mundial, es necesaria una mejor producción alimentaria, no únicamente en el ámbito de cantidad, sino de calidad de estos, en la actualidad, el desperdicio de alimentos desde la granja hasta la mesa tiene un impacto económico y ambiental significativo (Rawat, 2015). Las pérdidas postcosecha de frutas y verduras pueden variar entre el 30% - 40% a nivel mundial, y pueden ser significativamente mayores en los países subdesarrollados. Además, se prevé que el 20% del producto en los EE. UU. se desperdicia cada año. Es esencial tener en cuenta estrategias para aumentar la productividad y reducir el desperdicio. La necesidad de métodos no químicos de protección de los alimentos sigue existiendo debido al aumento

de la producción de alimentos orgánicos y la creciente conciencia de la salud en años recientes. Para mantener la seguridad a través de la biosaneización y la bioconservación, se han utilizado bacteriófagos como agentes biorreguladores que se han investigado y puesto en práctica en las empresas de alimentación (Imran y col., 2023).

E GENERALIDADES DE LOS BACTERIÓFAGOS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son las entidades biológicas más abundantes del planeta. Estos virus representan un grupo de virus que de manera natural infectan y se replican únicamente dentro de células bacterianas. Aunque son extremadamente diversos en tamaño, morfología y organización genómica, todos consisten en genoma compuesto ya sea por ADN o ARN protegido por una estructura llamada cápside, la cual a su vez se encarga de mediar la entrega de este a la célula huésped. Gracias a herramientas como la microscopía electrónica, ha sido posible visualizar cientos de tipos de fagos, algunos de los cuales parecen tener “cabeza”, “colas” y “patas”, sin embargo, a pesar de tener esta apariencia, los fagos no son móviles y dependen del movimiento browniano para llegar a sus objetivos (Kasman Porter, 2022).

Estos virus tienen un papel fundamental en la ecología bacteriana, la salud animal y vegetal, y en los ciclos biogeoquímicos. Aunque, en principio, los fagos son entidades simples que se replican a expensas de sus huéspedes bacterianos, debido a la importancia de las bacterias en todos los aspectos de la naturaleza, tienen el potencial para influir y modificar diversos procesos, ya sea de forma sutil o profunda, y esto es justamente lo que se busca utilizar a nuestro favor para tratar diversas problemáticas (García-Cruz y col., 2023).

1 Bacteriófagos como alternativa para el control biológico

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes, se encuentran distribuidos en prácticamente cualquier ecosistema; inclusive pueden estar presentes en la cavidad oral, intestinos, orina y suero plasmático del ser humano (Naureen y col., 2020).

Debido a que los bacteriófagos son “depredadores” naturales de las bacterias, han sido propuestos como una alternativa para el control biológico de bacterias patógenas para el humano (Reina y Reina, 2018). Sin embargo, no todos los bacteriófagos poseen características apropiadas como agentes para el control de bacterias; sólo aquellos que presenten las siguientes características: (a) Poseer actividad lítica sobre la bacteria que se desee controlar, (b) ser estrictamente líticos, es decir, siempre que establezcan un proceso de infección deben conducir a la lisis de la bacteria hospedera, (c) se sugieren que deben propagarse en cepas bacterianas no patogénicas, (d) no deben poseer genes que codifiquen factores de virulencia o resistencia a agentes antimicrobianos y (e) la secuencia nucleotídica de su genoma debe ser conocida (Loc-Carrillo y Abedon, 2011).

El cumplimiento de estos minimiza los riesgos asociados con el uso de fagos como alternativa para el control de bacterias patógenas. Uno de los posibles inconvenientes que puede presentar el uso de bacteriófagos como herramienta de control biológico es el hecho de que estos virus pueden codificar en su genoma algunos factores de virulencia que pueden ser transferidos a la bacteria hospedera, confiriendo a las bacterias la capacidad de invadir el hospedero, facilitar procesos patológicos, evadir la respuesta inmunológica y/o inhibir la acción de fármacos antimicrobianos (Reina y Reina, 2018).

2 Bacteriófagos como conservantes, desinfectantes e inhibidores de biopelículas

Los productos empacados, como ensaladas, verduras y champiñones, representan entornos adecuados para el crecimiento bacteriano, y la contaminación ha provocado varios brotes, como los brotes de *Listeria monocytogenes* de 2022 en EE. UU. Entre los patógenos más comunes que contaminan y deterioran los alimentos, se encuentran *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, patógenos menos comunes, como *Borrelia* spp. y *Yersinia enterocolitica*, también son motivo de preocupación. La aplicación de los fagos después de la cosecha de vegetales o antes del envasado de alimentos debe evaluarse más a fondo. Existen varios productos comerciales a base de bacteriófagos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) como Intralytix, Micros Food Safety, FINK TEC GmbH, Passport Food Safety Solutions y Phagelux (Arienzo y col., 2020; Endersen y Coffey, 2020). Además, el uso de fagos en la industria alimentaria puede ser útil para prevenir la contaminación por *Cronobacter sakazakii* en las fórmulas para bebés y *Clostridium botulinum* en la miel. Ambos patógenos afectan a los niños y presentan presentaciones clínicas engañosas (García-Cruz y col., 2023).

Las preparaciones de fagos también podrían ser útiles como desinfectantes autorreplicantes, descontaminar o limpiar superficies, como en los hospitales. Son especialmente eficaces contra bacterias formadoras de biopelículas, ya que usualmente las biopelículas suelen ser resistentes a los desinfectantes químicos. Hasta la fecha, se ha demostrado que, para algunas bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, los

desinfectantes químicos como el hipoclorito de sodio y el cloruro de benzalconio tienen efectos sinérgicos con algunos fagos, mejorando la eliminación de biopelículas en superficies contaminadas. De manera similar, se ha documentado que los fagos pueden eliminar biopelículas de otros patógenos bacterianos importantes como *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, etcétera (Liu y col., 2022; Song y col., 2021).

3 Bacteriófagos como herramienta para disminuir la resistencia a los antibióticos y virulencia bacteriana.

La ingeniería de fagos les confiere la capacidad de hospedar y expresar proteínas funcionales, aumentando así su estatus como instrumentos biotecnológicos versátiles. La personalización de fagos con proteínas específicas los convierte en agentes flexibles y robustos que están bien equipados para abordar desafíos multifacéticos en los dominios biomédicos y biotecnológicos. La capacidad inherente de los fagos para entregar ADN a huéspedes bacterianos es un rasgo fundamental que subraya su adaptabilidad y eficacia en aplicaciones biotecnológicas. Basándose en este mecanismo, varios estudios han sido pioneros en estrategias innovadoras para la intervención terapéutica (Yehl y col., 2019).

(Edgar y col., 2012a) introdujeron un enfoque genético ejemplar que utiliza el fago lambda templado para restablecer la sensibilidad a los fármacos de los patógenos resistentes a los fármacos que residen en las superficies de los hospitales. Logrando sensibilizar eficazmente a las cepas de *E. coli* resistentes a los fármacos a la estreptomicina y al ácido nalidíxico mediante la integración de genomas de fagos diseñados que llevan los genes de tipo salvaje (*rpsL* o *gyrA*, respectivamente). El estudio

destaca el potencial de los fagos como vectores de administración para aumentar la eficiencia de la complementación genética y mejorar la eficacia general del sistema.

Un enfoque fascinante implica la utilización de fagos modificados que llevan un mecanismo de defensa bacteriano natural, el módulo CRISPR-Cas, que puede actuar como una "contramedida" al dirigirse específicamente a los genes de resistencia a los antibióticos.

Yosef y col. (2015) integraron el sistema CRISPR-Cas en el genoma del fago templado lambda para dirigirse específicamente a los genes de resistencia a los antibióticos, en particular a las β -lactamasas, como *ndm* y *ctx*. El sistema CRISPR-Cas diseñado demostró la capacidad de identificar y eliminar eficazmente los plásmidos resistentes a los antibióticos en las poblaciones bacterianas. Esta innovadora estrategia no solo vinculó la sensibilización a los antibióticos y la defensa contra los fagos líticos, sino que también mostró la prevención dirigida de la transferencia horizontal de genes. Al incorporar protoespaciadores en fagos líticos que coinciden con los sitios objetivo del sistema CRISPR-Cas transferido, los investigadores lograron una doble focalización de genes y fagos resistentes a antibióticos. Este enfoque resultó en protección contra fagos líticos específicos, impedimento selectivo de la transformación de plásmidos y la posterior pérdida de plásmidos resistentes a antibióticos dentro de las bacterias infectadas con fagos.

La capacidad de las bacterias para desarrollar resistencia contra los fagos es un arma de doble filo para los patógenos bacterianos. Uno de los mecanismos bacterianos más comunes para desarrollar resistencia a los fagos es mutar los receptores de los fagos, frecuentemente disminuyendo o evitando su expresión. Sin embargo, algunos de

los receptores preferidos de los fagos son estructuras relacionadas con la virulencia, como los flagelos, los pilli tipo IV y el polisacárido capsular, y algunos otros, como las bombas de eflujo y los lipopolisacáridos (LPS), están involucrados en la resistencia bacteriana a los antibióticos. Por lo tanto, las bacterias que se vuelven resistentes a los fagos a menudo también reducen su virulencia o su resistencia a los antimicrobianos. Este hecho ha sido demostrado por diversos autores en patógenos bacterianos importantes, como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Gordillo Altamirano, 2020; Lai y col., 2016; León y Bastías, 2015).

Además, algunos fagos filamentosos pueden inhibir procesos bacterianos críticos que facilitan el intercambio de material genético en bacterias, como la conjugación, que promueve la propagación de la resistencia bacteriana, por ejemplo, mediante la oclusión del pilus conjugativo por partículas de fagos. Por lo tanto, esta propiedad podría usarse para disminuir la virulencia de las bacterias o para hacer sensibles nuevamente a las bacterias patógenas contra los antibióticos utilizados en diversos campos como en hospitales, granjas, acuicultura y plantas de tratamiento de aguas residuales e incluso en el medio ambiente. Su implementación debe comenzar en entornos experimentales controlados para evaluar su eficacia antes de expandirse gradualmente a mayor escala (García-Cruz y col., 2023; Lin y col., 2017).

También se ha demostrado que los fagos se pueden utilizar para inhibir el denominado “*quorum sensing*” (QS), que es un mecanismo de señalización celular de las bacterias que permite la regulación de la expresión génica en respuesta a cambios en la densidad de población celular. Muchos genes de virulencia están regulados positivamente a través de este mecanismo, por lo que la inhibición o interrupción de la

vía de señalización QS es un mecanismo de acción deseado de los compuestos anti-virulencia (Asfour, 2018). Por ejemplo, (Aqs1) ubicado en el genoma del fago DMS3 de *Pseudomonas aeruginosa* contiene dos dominios: uno que inhibe la proteína LasR, el regulador maestro de QS en esta bacteria, y otro que inhibe la actividad de la proteína ATPasa del ensamblaje del pilus tipo IV. (*PilB*). Sorprendentemente, esta proteína requiere 69 residuos para disminuir la virulencia (Shah y col., 2021). Por lo tanto, los fagos con este tipo de reguladores negativos de QS también pueden ser útiles para reducir la virulencia bacteriana (García-Cruz y col., 2023).

F LOS CICLOS DE REPLICACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS Y SU IMPORTANCIA

Los bacteriófagos, tienen numerosas características que han despertado el interés como una prometedora herramienta en múltiples aplicaciones. Sin embargo, es importante elegirlos correctamente dependiendo del uso que se le pretenda dar. Una de esas características importantes para tener en cuenta es el tipo de ciclo de replicación que presente en los bacteriófagos estudiados.

Los fagos exhiben dos ciclos de vida distintos una vez que infectan a las bacterias, un ciclo lítico y un ciclo lisogénico. Durante el ciclo lítico, los fagos se replican y las partículas de la progenie se liberan a través de la lisis. Por el contrario, durante la lisogenia, los fagos integran sus genomas en el cromosoma bacteriano y entran en un estado latente. En una etapa posterior, estos fagos latentes moderados pueden volver a entrar en un ciclo lítico y liberar progenie (Alsubhi, 2021) (Figura 1).

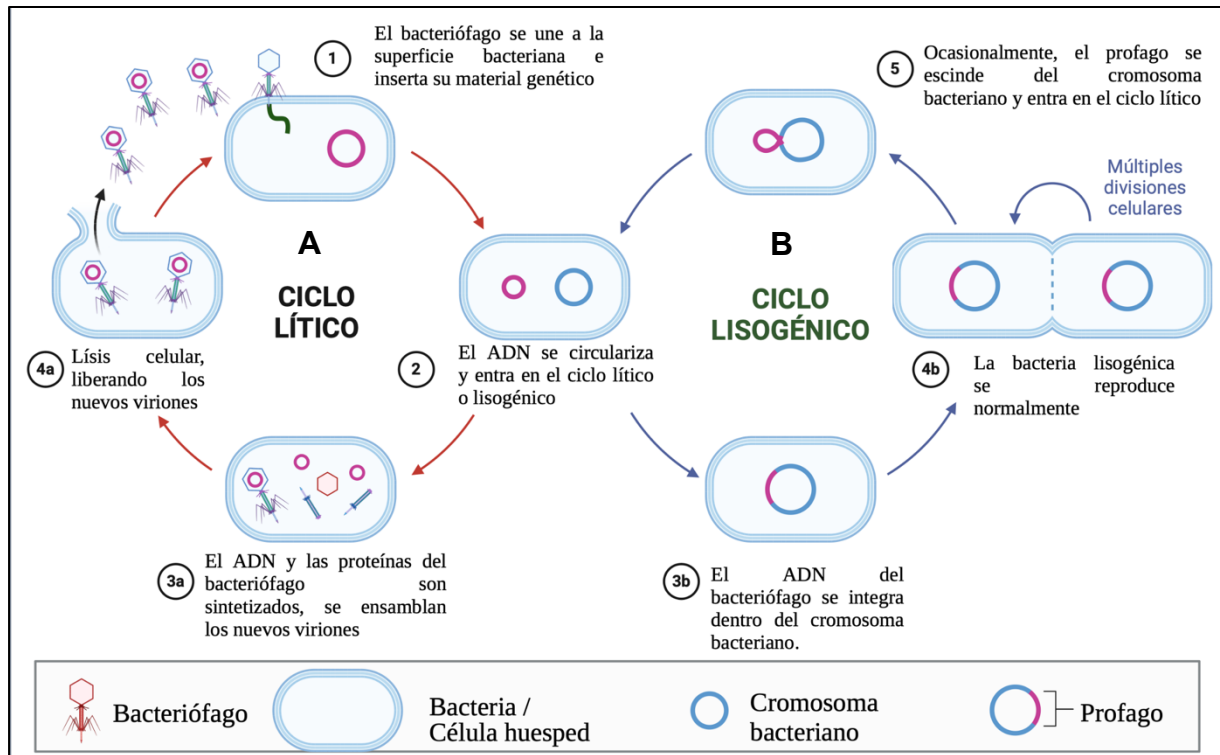


Figura 1. Ciclos lítico y lisogénico de un bacteriófago. A) Durante el ciclo lítico, los bacteriófagos son sintetizados dentro de la célula, causando la lisis y liberación de estos. B) Durante el ciclo lisogénico, el genoma del bacteriófago se integra en el cromosoma bacteriano, entrando en ciclo lisogénico, sin llegar a sintetizar la partícula viral. Adaptada de Atluri y Yang. (2023).

En este contexto, podríamos dividir a los fagos en dos grupos: bacteriófagos líticos y bacteriófagos lisogénicos.

Los fagos líticos, también conocidos como fagos virulentos, son una categoría de bacteriófagos que siguen un ciclo de vida lítico obligatorio cuando infectan células bacterianas. Dentro de este ciclo, el fago experimenta una rápida replicación dentro de la bacteria huésped, que finalmente culmina en la síntesis (ruptura) de la célula bacteriana y la posterior liberación de partículas de fago recién formadas. Este comportamiento distintivo ha impulsado a los fagos líticos a la vanguardia de la terapia con fagos (Hibstu y col., 2022), así como aplicaciones relacionadas al control biológico de distintas bacterias patógenas en alimentos listos para consumo (Moye y col., 2018).

Por el contrario, los fagos lisogénicos exhiben un patrón alternativo, absteniéndose de lisar las bacterias objetivo. En cambio, integran material genético en el genoma bacteriano para establecer la latencia dentro del huésped. En consecuencia, históricamente los fagos lisogénicos han sido excluidos de algunas aplicaciones terapéuticas.

Los avances recientes han revelado aspectos novedosos de los fagos lisogénicos y sus posibles aplicaciones. Los fagos lisogénicos, que alguna vez fueron infravalorados, han atraído una atención renovada debido a sus características únicas y beneficios potenciales en el contexto terapéutico. La capacidad para facilitar la liberación controlada de fagos, mitigar el riesgo de desarrollo de resistencia, permitir la transferencia de genes y ofrecer posibilidades para la terapia génica presenta una justificación convincente para explorar los fagos lisogénicos como herramientas valiosas en la batalla contra las

infecciones bacterianas y la resistencia a los antibióticos. Para utilizar plenamente su potencial terapéutico, es imperativo realizar más investigaciones para dilucidar sus mecanismos de acción (Jo y col., 2023).

Además, este tipo de bacteriófagos podrían ser utilizados con otros fines en otras aplicaciones, por ejemplo, como biosensores en aguas residuales o de uso agrícola para evaluar la presencia de bacterias que representen un riesgo a la salud pública (Al-Hindi y col., 2022).

G VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL USO DE BACTERIÓFAGOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO

Los bacteriófagos presentan algunas ventajas sobre los antibióticos de uso habitual, por mencionar algunas de las más importantes, tenemos:

A) Alta especificidad, al tener un espectro de actividad muy estrecho, se evita el problema más importante estrictamente relacionado con la administración de antibióticos, es decir, la influencia sobre todo el microbioma con la eliminación de bacterias comensales beneficiosas, permitiendo el sobrecrecimiento de patógenos secundarios y la aparición de bacterias resistentes (Domingo-Calap y Delgado-Martínez, 2018).

El uso de bacteriófagos sin modificación de la microbiota ha sido reportado por varios estudios tanto en animales como en humanos por diferentes autores. En ratones, la administración oral de cuatro fagos eficaces contra *E. coli* asociada a diarrea no provocó ningún daño colateral a las bacterias no patógenas de la misma especie (Chibani-Chennoufi y col., 2004).

En humanos, los datos que confirman la especificidad de la acción de los fagos se mostraron en el estudio realizado por Sarker y col. (2012). Estos autores administraron durante 2 días un cóctel oral de nueve fagos de *E. coli* similares a 15 adultos sanos. Después de un período de 5 días, aunque los fagos administrados pudieron detectarse en las heces de casi todos los sujetos tratados, no se evidenció ninguna modificación de la composición de la microbiota intestinal.

B) Efecto limitado al sitio de infección, es decir, atacan a la bacteria en el lugar donde están causando la infección, sin eliminar otras bacterias presentes en sitios sanos, manteniendo así mayores condiciones de homeostasis (Ranveer y col., 2024).

Su efecto se limita al sitio de infección al que se puede llegar, incluso cuando las bacterias están situadas en un órgano o sistema corporal en el que los antimicrobianos pueden penetrar con dificultad. Por ejemplo, se evaluó un fago lítico, EC200(PP), activo contra S242, una cepa letal de *E. coli* que causa meningitis neonatal. Aunque se detectaron títulos bajos de fagos en el sistema nervioso central, el tratamiento 1 y 7 h después de la infección rescató al 100% de las crías (Pouillot y col., 2012).

C) Mayor aceptación, al estar hablando de un agente biológico, es común que presente mejor asimilación por parte del cuerpo, en comparación a la que se podría presentar ante un fármaco sintético.

Existe evidencia de que los fagos son significativamente más seguros y mejor tolerados, ya que se replican solo en la bacteria diana pero no pueden infectar células de mamíferos. Esta información parece respaldada por todas las experiencias acumuladas

en el pasado en Europa y los estudios realizados más recientemente en animales de experimentación y humanos, que no han reportado eventos adversos significativos después de la administración de fagos (Kakasis y Panitsa, 2018).

D) Efecto monodosis, al ser capaces de replicarse al infectar las bacterias causantes de la infección, podría ser necesaria únicamente una dosis para eliminar las bacterias y detener la infección, una vez realizado eso, los fagos pasan a auto regular su concentración ya que al no haber bacteria hospedera estos agentes dejarían de replicarse (Ranveer y col., 2024).

Estas y otras características les dan el potencial de ser utilizados como alternativas de control biológico y agentes terapéuticos.

Por otro lado, el uso de bacteriófagos también puede presentar ciertas limitantes y problemas potenciales al utilizarlos con fines terapéuticos, que incluyen cuestiones fundamentales de seguridad humana. No se han observado efectos nocivos debido al tratamiento con fagos, pero la pureza de los fagos puede representar un problema. Los fagos pueden liberar lipopolisacáridos, peptidoglicano u otros componentes inflamatorios después de lisar las bacterias, los cuales pueden terminar en la preparación cruda del fago (Drulis-Kawa y col., 2015).

Actualmente se encuentran disponibles varias tecnologías, como la centrifugación en gradiente de densidad y la cromatografía en columna, para la purificación de fagos que son simples y rentables, y estos métodos han reducido los problemas relacionados con los contaminantes. La contaminación por fagos durante la fermentación proporcionó

la primera evidencia en la industria láctea, que proporcionó información crucial sobre la presencia de fagos en la industria alimentaria. Estos entornos dietéticos favorecen la coexistencia de bacterias y fagos. Muchos factores pueden limitar el uso de fagos y la creación de nuevas formulaciones terapéuticas. Es por ello la importancia de seguir investigándolos y caracterizarlos adecuadamente antes de su uso práctico (Ranveer y col., 2024).

Otro de los aspectos que hacen cuestionar el uso de bacteriófagos como agentes de control es su papel en la transferencia horizontal de genes, ya que se puede agravar aún más la problemática si hablamos de genes de resistencia a antibióticos o de virulencia; sin embargo, esto ocurriría si hablamos de bacteriófagos lisogénicos. Por ello la importancia de que los bacteriófagos utilizados con este propósito sean estrictamente líticos, para evitar este problema (Chen y col., 2022).

Además, se sigue investigando la manera de hacer uso también de estas características a nuestro favor, es decir, si bien los fagos lisogénicos no son los más apropiados como agentes de control biológico, sí han demostrado potencial para ayudar a combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos al hacer modificaciones genéticas añadiendo genes que confieren nuevamente sensibilidad ciertos antibióticos de interés, por ejemplo lo realizado por (Edgar y col., 2012), donde introdujeron en fagos lisogénicos los genes *rpsL* y *gyrA*, que confieren sensibilidad de forma dominante a dos antibióticos, estreptomicina y ácido nalidíxico, respectivamente.

Existe un gran potencial en este tipo de agentes para combatir estos patógenos desde diferentes estrategias, es por ello la importancia de seguir estudiándolos.

H CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIÓFAGOS

Para que un bacteriófago sea útil como agente de control biológico, debe ser aislado del medio ambiente y demostrar que tiene ciertas características más allá de simplemente eliminar cepas del patógeno bacteriano de interés.

Estas incluyen características deseables como, por ejemplo, una gama relativamente amplia de huéspedes y la ausencia de otras características como portar genes de toxinas y la capacidad de formar un lisógeno. Si bien los fagos normalmente se aíslan primero y posteriormente se caracterizan, es posible alterar los procedimientos de aislamiento para sesgar el aislamiento hacia fagos con características deseables. Como, por ejemplo, utilizar más de una cepa bacteriana en el procedimiento de aislamiento (Hyman, 2019). Otras características importantes que se deben determinar son:

A) Virulencia de los bacteriófagos, la capacidad de lisar completamente un cultivo bacteriano es el resultado de dos características importantes. En primer lugar, los fagos deben tener suficiente virulencia y productividad suficiente para que las bacterias no puedan simplemente crecer más rápido de lo que los fagos pueden matarlas. A menos que se pueda usar una dosis muy alta de fagos para la infección inicial, lo suficientemente alta como para infectar cada célula (una dosis asesina), será necesario que la reproducción de fagos aumente el número de fagos hasta el punto de que todos los huéspedes estén infectados (Abedon, 2009). Además, como se mencionó en la sección F, el tipo de ciclo que presente un bacteriófago será clave para las aplicaciones que se le pretenda dar.

B) Estabilidad a distintas condiciones fisicoquímicas, ya que, de poco o nada sirve un bacteriófago con gran capacidad para eliminar a la bacteria de interés, si se inactiva fácilmente al ser aplicado, por ejemplo, si se habla de un fago con propósito terapéutico, sería importante evaluar su estabilidad a las temperaturas, pH y condiciones fisiológicas del sistema gastrointestinal (Wdowiak y col., 2022).

Algunos investigadores han evaluado el impacto de los parámetros físicos y químicos, que incluyen la temperatura, la acidez y los iones, en la persistencia de los fagos. La sensibilidad de los fagos es un tema que requiere un estudio detallado de los elementos ambientales externos involucrados. Comprender las dificultades podría ser beneficioso para las personas interesadas en trabajar con ellos (Abdelsattar y col., 2022). El daño a las estructuras internas del fago, que incluyen la envoltura, la cabeza y la cola, la pérdida de lípidos y/o el daño del ADN pueden causar su inactivación. Las características de un fago y la tolerancia a las presiones externas pueden no estar determinadas por similitudes estructurales entre ellos o por ser parte de la misma familia, sino que puede deberse a otras variables (Ly-Chatain, 2014).

C) Tiempo de replicación y tamaño de explosión, es importante conocer la biología del virus y algo recomendable por diversos autores, es que se replique lo más rápido posible, así como un tamaño de explosión amplio, es decir, que liberen la mayor cantidad de partículas virales después de cada célula lisada (Amarillas y col., 2017).

Como parte de su ciclo de vida, los fagos lisan las células hospedadoras después de ensamblar los viriones de la progenie. El tamaño de la explosión, que se define como el número de viriones producidos por célula hospedadora infectada, y el tiempo de lisis, que se define como el tiempo transcurrido entre la infección y la lisis, son rasgos clave que afectan la aptitud de los fagos. En general, se cree que el tamaño de explosión está correlacionado positivamente con el tiempo de lisis: un tiempo de lisis más prolongado dará como resultado un tamaño de ráfaga mayor (Kannoly y col., 2021).

D) Ausencia de genes virulencia o resistencia en su genoma, una de las caracterizaciones más importantes en tema de bacteriófagos, es la genómica, esto debido principalmente a la gran variedad de estos agentes que podemos encontrar, y a diferencia de las bacterias que sabemos, comparten muchas características siendo de la misma especie, en el caso de los bacteriófagos no ocurre esto, y cada uno puede presentar características diversas entre sí, con la caracterización genómica podemos obtener además, información muy valiosa como la evaluación de la presencia no solo de genes indeseables sino de elementos génicos con potencial biotecnológico (tRNAs) (Dalen y col., 2020).

La transferencia horizontal de genes (THG) en el microbioma tiene profundas consecuencias para la salud y la enfermedad humanas. La propagación de genes de resistencia a los antibióticos, virulencia y determinantes de patogenicidad ocurre predominantemente por medio de la THG. Existe evidencia de una extensa transferencia horizontal en el microbioma intestinal humano, y los bacteriófagos juegan un papel importante en este mecanismo, ya que son los responsables de la transducción, que es

el método a través del cual algunos fagos transfieren ADN bacteriano de una célula a otra (Borodovich y col., 2022).

E) Tipo de ciclo de replicación del fago, esto, debido a que se debe determinar correctamente si se trabaja con un bacteriófago estrictamente lítico o un bacteriófago lisogénico, ya que para propósitos de control biológico, solo debe trabajarse con fagos líticos (Hyman, 2019). Mientras que por otro lado, los fagos lisogénicos son excelente opción para insertar genes de interés con ayuda de ingeniería genética con la intención de hacer que se expresen en las bacterias, por ejemplo, para sensibilizarlas de nuevos ante ciertos antibióticos (Edgar y col., 2012).

IV. JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto a otras autoridades sanitarias, como uno de los problemas sanitarios más urgentes a nivel global. La gravedad de este problema es tal, que los especialistas estiman que en los próximos años las infecciones causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos serán la principal causa de muerte en todo el mundo, superando las muertes causadas por enfermedades como el cáncer o enfermedades cardiovasculares. Bajo este escenario, autoridades de salud han llamado a desarrollar nuevos agentes antibacterianos. De acuerdo con la OMS, desde 1987 no hay resultados exitosos en este campo.

En respuesta a esta crisis, el Foro Económico Mundial ha instado a la sociedad, las instituciones de salud y al sector privado a dirigir esfuerzos al desarrollo de tratamientos no convencionales contra las ya denominadas “super bacterias”. Entre las bacterias que representan un mayor riesgo a la salud pública debido a su alta incidencia, su gran capacidad para generar resistencia y su índice de mortalidad, se encuentra *Escherichia coli* (prioridad crítica, según la OMS). En este contexto, el uso de bacteriófagos resalta como una alternativa en esta lucha contra bacterias que no responden satisfactoriamente a los tratamientos de uso habitual. Estos virus son una de las opciones más prometedoras debido a su eficacia, eficiencia y bajo costo. Sin embargo, es necesaria una rigurosa caracterización y estudio de los mismos para que su uso práctico sea una realidad.

V. HIPÓTESIS

Los bacteriófagos aislados de muestras ambientales mostrarán características biológicas como estabilidad a distintos niveles de pH, temperaturas de almacenamiento y a condiciones de tracto gastrointestinal simulado. Carecerán de genes asociados a riesgos de bioseguridad. Estas propiedades permitirán su uso efectivo como agentes de control biológico contra cepas patogénicas de *Escherichia coli*, bajo condiciones controladas *in vitro*.

VI. OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia y seguridad de dos bacteriófagos para el control biológico de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de muestras ambientales.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a nivel biológico a los bacteriófagos aislados mediante la evaluación de la cinética de replicación, estabilidad térmica, estabilidad a diferentes niveles de pH y capacidad de supervivencia en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
2. Evaluar la capacidad de los bacteriófagos para controlar a *E. coli* en condiciones *in vitro* y en agua de uso agrícola.
3. Analizar a través de microscopía electrónica de transmisión las características ultraestructurales de los bacteriófagos.
4. Secuenciar y decodificar la información genómica de los bacteriófagos para evaluar los posibles riesgos de bioseguridad asociados a su genoma, así como su clasificación taxonómica.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Agronomía y el laboratorio de microbiología ambiental de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, ambas pertenecientes a la Universidad Autónoma de Sinaloa, durante el periodo comprendido de abril del 2023 a julio del 2024.

A MATERIALES

1 Material experimental

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y los bacteriófagos caracterizados en el presente trabajo de investigación fueron aislados a partir de muestras ambientales obtenidas en el estado de Sinaloa durante el proyecto de tesis de licenciatura “Aislamiento y caracterización genómica de una cepa de *Escherichia coli* O129 multidrogoresistente, así como la evaluación del potencial biotecnológico de un nuevo bacteriófago como agente de control” (Padilla, 2022).

Los bacteriófagos fueron elegidos para su caracterización basados en datos previamente obtenidos, que fueron, la capacidad de FEco-32 para soportar temperaturas de hasta 60 °C durante 1 h., así como de FEco-59 de lisar la mayor cantidad de cepas de los bacteriófagos disponibles (20 de las 70 cepas).

B MÉTODOS

1 Esquema de la estrategia experimental para llevar a cabo esta investigación

La caracterización de los bacteriófagos se dividió en tres etapas: caracterización biológica, caracterización morfológica y caracterización genómica (Figura 2).

2 Diálisis de los bacteriófagos para micrografías electrónicas

Para el envío de las muestras para la toma de micrografías electrónicas se prepararon los bacteriófagos de la siguiente manera. Inicialmente se vertió el medio con bacteriófago propagado a una concentración mínima de 1×10^{10} UFP/ml en un Amicon con filtro para microcentrífuga de 50 ml (Amicon Ultra-15, Sigma Aldrich, Irlanda) y se centrifugó a $5,000 \times g$ durante 20 min para concentrar el fago en el filtro.

Posteriormente se eliminó el filtrado y se añadieron 4 ml de agua inyectable estéril al Amicon para resuspender el bacteriófago con ayuda de una micropipeta; una vez resuspendido, se tomaron 3 ml del fago con una jeringa estéril y se introdujeron al Casete de Diálisis de 20,000 MWCO (Slide-A-Lyzer, Dialysis Cassette G2, Thermo Scientific, EE. UU.), posteriormente, se dejó sumergido en buffer de diálisis durante 18 h. Una vez pasadas las 18 h se cambiaron a un buffer nuevo y se dejaron de nuevo dializando por 3 h. Terminadas las 3 h se pasaron a transferir 400 μ l del bacteriófago desde el casete de diálisis a un tubo de microcentrífuga de 600 μ l, se cubrieron con papel Parafilm y se almacenaron a 4 °C hasta su envío para la toma de micrografías electrónicas.

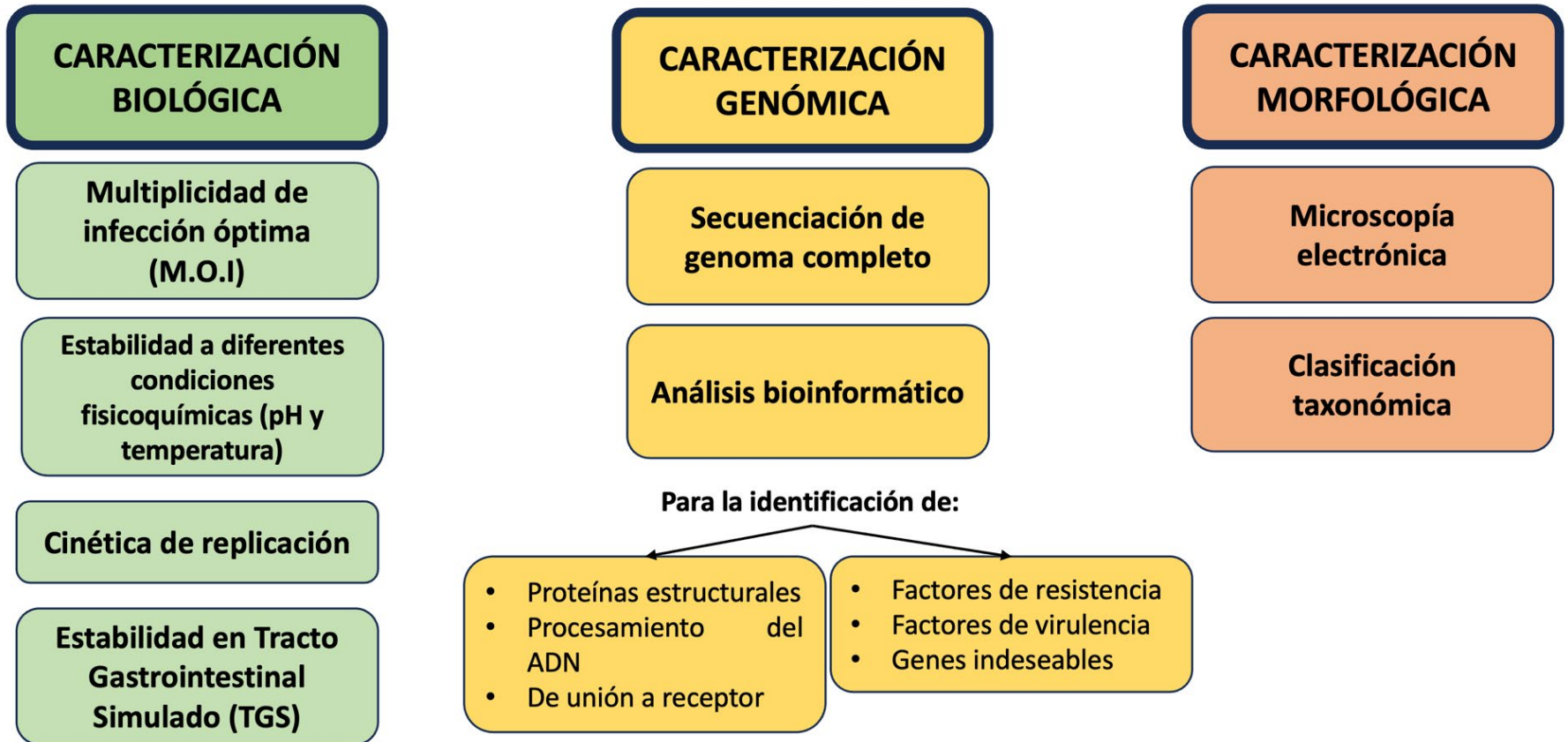


Figura 2. Estrategia experimental para la caracterización de los bacteriófagos.

3 Caracterización morfológica y clasificación taxonómica de los bacteriófagos

Para determinar las características estructurales de las partículas virales, se siguieron procedimientos estándar de microscopía electrónica de transmisión. Para ello, 30 µl de la suspensión purificada de bacteriófagos se colocaron sobre una rejilla de transmisión Formvar de cobre con 400 mallas recubiertas de carbón. Posteriormente, la rejilla se colocó en un evaporador de vacío (JEE400, JEOL Ltd. Tokio, Japón), teñidas con ácido fosfotúngstico al 2% (p/v) (pH 7.2) y secadas al aire. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEM-1011, JEOL Ltd. Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 80 kV. Este procedimiento se realizó por colaboración con el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en Madrid, España.

Por otro lado, para determinar el tamaño y tipo de placa de lisis, se realizaron doble capa de agar y mediciones con ayuda de un bernier milimetrico.

La clasificación taxonómica se realizó haciendo uso de los datos obtenidos de la secuenciación genómica, siguiendo los nuevos criterios del Comité Internacional de Taxonomía Viral. Se utilizó el programa PhaBOX (Shang y col., 2023), para dilucidar las familias y clases a las que pertenece cada uno de los bacteriófagos.

4 Multiplicidad de infección óptima

La capacidad del bacteriófago para reducir la concentración bacteriana bajo condiciones *in vitro* se determinó mediante un ensayo, en el cual se monitoreó la densidad óptica de bacteria en función del tiempo en presencia y ausencia del bacteriófago a distintas M.O.I, tal como se describe a continuación. La bacteria se cultivó en medio líquido TSB durante 24 h a 37 °C. En seguida, se tomaron 200 ul del cultivo y se inoculó

en tubos de ensayo con 30 ml de TSB. El cultivo bacteriano se incubó a 37 °C con agitación a 80 rpm. La densidad óptica se monitoreó por métodos espectrofotométricos a una longitud de onda de 600 nm (OD_{600}), teniendo un tubo de ensayo por bacteria únicamente para los monitoreos, esto para evitar contaminación del medio. Una vez alcanzada la densidad de 0.5 ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml), se añadió el bacteriófago en los tubos inoculados con bacteria a las M.O.I de 1 ($\sim 1 \times 10^8$ UFP/ml), 0.1 ($\sim 1 \times 10^7$ UFP/ml) y 0.01 ($\sim 1 \times 10^6$ UFP/ml), dejando un tubo sin bacteriófago. La densidad óptica de ambos tubos se monitoreó cada 30 min durante 5 h. Los ensayos se realizaron por triplicado (Rajnovic y col., 2019).

5 Curva de replicación de un solo paso de los bacteriófagos

La curva de replicación de un solo paso se realizó con el fin de determinar el tiempo que tardan los fagos en terminar un ciclo de replicación, así como el tamaño de explosión de ellos.

Para ello se pusieron a crecer las bacterias hospederas en tubos de 45 ml con TSB 0.5X, una vez alcanzada la DO de 0.05 se inocularon los fagos a una MOI de 0.01, se esperó 5 min para que la mayor cantidad de fago se adsorba a la membrana bacteriana, una vez pasados los 5 min se transfirió aproximadamente 1.4 ml a tubos de 1.5 ml para microcentrífuga y se centrifugó durante 1 min a 17,000 rpm, se eliminó el sobrenadante para eliminar los bacteriófagos libres en el medio y se resuspendió en un tubo con 45 ml de TSB nuevo y a partir de este punto se tomaron inóculos de 1.4 ml en tubos de microcentrífuga con y sin cloroformo, se centrifugaron a $10,000 \times g$ durante 30 segundos y con el sobrenadante se hicieron diluciones decimales seriadas en tubos de ensayo con

las que posteriormente se hicieron doble capa de agar en cajas de Petri con TSA, se incubaron a 37°C durante 24 h y se cuantificó.

6 Control de *Escherichia coli* en agua de riego

Para evaluar la capacidad de los bacteriófagos para el control de *Escherichia coli* en agua de riego se realizó el siguiente ensayo. Inicialmente se inoculó la bacteria a una concentración de $\sim 1 \times 10^6$ UFC/ml en tubos con 45 ml de agua de riego estéril, se dejó a temperatura ambiente durante 48 h y finalmente se realizó la cuantificación de la bacteria con ayuda de diluciones decimales seriadas y extensión en la caja de agar cromogénico CHROMagar™ *E. coli*.

7 Ensayo de estabilidad en condiciones de almacenamiento

Para determinar la estabilidad de los bacteriófagos bajo condiciones de almacenamiento, se realizó un ensayo en el cual se expuso la suspensión purificada de cada bacteriófago a 2 temperaturas diferentes, 4 °C y 40 °C durante 6 meses. La determinación de la concentración viral se realizó periódicamente cada mes mediante diluciones decimales seriadas y la técnica de doble capa de agar. Los ensayos se realizaron por triplicado (Montso y col., 2019)

8 Ensayo de estabilidad a distintas condiciones de pH

Para evaluar el efecto de distintos niveles de pH sobre la viabilidad de los bacteriófagos se realizó un ensayo de exposición de los mismos, a 4 soluciones con pH diferentes, 3, 5, 7, 9, buscando dilucidar su comportamiento las distintas condiciones a las cuales podrían exponerse de ser aplicados como agentes de control en aguas para uso agrícola, las cuales, según la norma oficial mexicana NOM-001-SEMAR- NAT-1996

, deben tener un pH en el rango de entre 5- 10, y a su vez, evaluar el potencial de usarlos con propósito terapéutico, los pH seleccionados para evaluar, buscan abarcar también las encontradas en el cuerpo humano al paso por el tracto gastrointestinal, pH 3 (estómago), pH 5 (intestino delgado, yeyuno), pH 7 (intestino delgado, duodeno) y pH 9 (intestino delgado) durante 5 h, posteriormente se determinará la cantidad de bacteriófagos viables a través diluciones decimales seriadas (Montso y col., 2019).

9 Ensayo de estabilidad en condiciones de tracto gastrointestinal simulado

Con el objetivo de determinar la capacidad de los bacteriófagos para mantenerse estables en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, se diseñó un experimento siguiendo la metodología de Pinto y col., 2022, con algunas modificaciones. Para simular el paso de los fagos a través de las distintas etapas del tracto gastrointestinal (fase oral, fase gástrica y fase intestinal). Inicialmente, se prepararon los fluidos mezclando las concentraciones correspondientes de soluciones madre de electrolitos (fluido salival simulado, fluido gástrico simulado, fluido intestinal simulado) (Cuadro 1), para posteriormente agregar las enzimas correspondientes a cada fase, así como las sales biliares y el CaCl_2 (Cuadro 2).

Cuadro 1. Reactivos y sus concentraciones para la formulación de los distintos fluidos del tracto gastrointestinal simulado (fase oral, fase gástrica, fase intestinal).

	Fluido salival	Fluido gástrico	Fluido intestinal
	pH 7	pH 3	pH 7
Reactivo	Concentración en fluido (mmol/L)		
Cloruro de potasio KCl	15.1	6.9	6.8
Fosfato monobásico de potasio KH₂PO₄	3.7	0.9	0.8
Bicarbonato de sodio NaHCO₃	13.6	25	85
Cloruro de sodio NaCl	-	47.2	38.4
Cloruro de magnesio MgCl₂(H₂O)₆	0.15	0.1	0.33
Carbonato de amonio (NH₄)₂CO₃	0.06	0.5	-

Cuadro 2. Concentraciones de las enzimas, sales biliares y CaCl₂ utilizados en la formulación de los fluidos de las distintas fases del tracto gastrointestinal simulado (fase oral, fase gástrica, fase intestinal).

	Fluido salival	Fluido gástrico	Fluido intestinal
	pH 7	pH 3	pH 7
Constituyente	Concentración en fluido		
α-amilasa	75 U/ml	-	-
Pepsina	-	2000 U/ml	-
Pancreatina	-	-	200 U/ml
Sales biliares	-	-	20 mM
CaCl₂	1.5mM	0.15mM	0.6 mM

Una vez preparadas las soluciones electrolíticas, se procedió a preparar los fluidos con las respectivas enzimas en tubos de 50 ml y se precalentaron durante 30 min a 37 °C, posteriormente, se añadieron los bacteriófagos a 2×10^6 UFP/ml los tubos correspondientes a la fase oral, los cuales se incubaron durante 2 min a 37 °C y 120 rpm, subsecuentemente, se transfirió la fase oral completa al tubo de fase gástrica, obteniendo una proporción de 1:1 (v/v), se incubó nuevamente a 37 °C y 120 rpm durante 2 h, una vez terminada la fase gástrica, se procedió nuevamente a transferir en una proporción 1:1 (v/v) al tubo correspondiente a la fase intestinal y se dejó durante 2 h más a 37 °C y 120 rpm. Al término de cada fase se tomó una alícuota de 1 ml de fluido con bacteriófagos para hacer las diluciones correspondientes y cuantificar el título viral.

10 Tratamiento de datos y análisis estadístico

La representación gráfica de los resultados obtenidos se realizó con ayuda de Microsoft Excel (ver 16.85). Para determinar si hay o no diferencias estadísticamente significativas, se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), una vez verificada la normalidad de los datos con la prueba Anderson-Darling así como la homogeneidad en las varianzas de estos mediante test de Bonferroni, en Minitab 18.

Las barras de error en las gráficas presentadas representan la desviación estándar de los valores medios.

11 Secuenciación del material genético de los bacteriófagos y análisis bioinformático

El concentrado de bacteriófagos ($>10^{11}$ Unidades Formadoras de Placa por ml) se sometió al proceso de extracción de material genético descrito a continuación. Para ello,

se utilizó el método de SDS-proteinasa K descrito por Sambrook y Rusell, 2001. La concentración y pureza del ADN se evaluó con un espectrofotómetro one (NanoDrop, EUA), mientras que la integridad del material genético se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. La generación de las bibliotecas genómicas se realizó con el sistema TruSeq DNA nano de Illumina siguiendo las recomendaciones del proveedor. La secuenciación nucleotídica se efectuó en la plataforma Illumina NextSeq 500 en modo de lecturas pareadas 2 x 150 utilizando el cartucho y los reactivos del kit MID Output v2 de 300 ciclos. Este procedimiento se realizó por colaboración con el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en Irapuato, México.

La calidad de las lecturas generadas se analizó con la herramienta FastQC versión 0.11.5. Subsecuentemente, Trimmomatic versión 0.36 se usó para descartar las lecturas con un índice Phred menor a 25. Las lecturas pareadas se ensamblaron empleando el algoritmo SPADES.

Se hizo una predicción de genes con ayuda de GeneMarkS (Besemer y col., 2001), para posteriormente realizar una anotación manual haciendo uso de BLAST en NCBI para la búsqueda de homólogos de los genes predichos, así como la asignación de funciones a los mismos. Así mismo, para la búsqueda de genes de alergenicidad se utilizó Allergenonline.org (v22, 2023), y para la búsqueda de RNAt se utilizaron dos programas: Aragorn (Laslett y Canback, 2004) y tRNAscan-SE (Chan yLowe, 2019). Para determinar la clasificación taxonómica de los fagos se utilizó la plataforma PhaBOX (Shang y col., 2023).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN ÓPTIMA

Los ensayos *in vitro* demostraron el rápido crecimiento de las cepas de *E. coli* en el medio de cultivo, alcanzando una absorbancia de 1.5 ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml) en 150 min para Eco-32 y 120 min para Eco-59, indicando la fase estacionaria de cada bacteria. Sin embargo, vemos como ante la presencia de los bacteriófagos, el crecimiento se detiene y la concentración se reduce significativamente. En el caso de FEco-32 a los 90 min se observa una reducción de la tasa de crecimiento normal de la bacteria a una densidad óptica de ~ 1.0 y empieza a eliminar a la bacteria hasta alcanzar niveles estadísticamente iguales a los de tiempo 0 alrededor de los 210 min (Figura 3).

Es por ello, que se puede determinar que el bacteriófago presenta potencial para ser utilizado como agente de control biológico, esto debido a que diversos autores han mencionado que los fagos que pretendan ser usados con este propósito deben ser capaces de eliminar la bacteria hasta niveles indetectables (Hosseini y col., 2024).

Por otro lado, el bacteriófago FEco-59 a partir de los 30 min afecta el crecimiento normal de la bacteria; se observa cómo alcanza una máxima concentración de 0.9 a los 180 min y, a partir de ahí, un descenso en la concentración bacteriana hasta llegar a niveles indetectables a los 240 min (Figura 4).

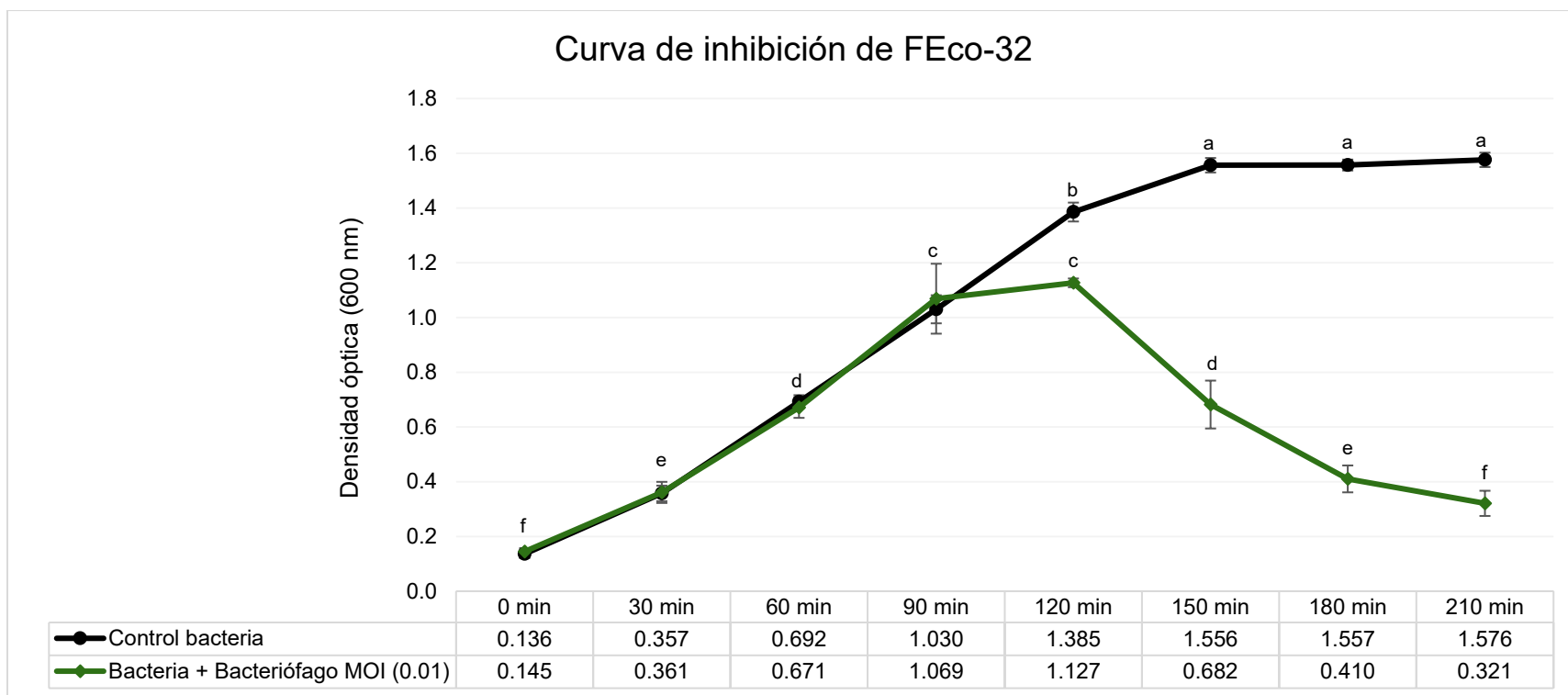


Figura 3. Curva de inhibición bacteriana inducida por el bacteriófago FEco-32. Se representan el tratamiento control (●), y el tratamiento con el bacteriófago (MOI 0.01) (◆). Las medias que comparten letras diferentes son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

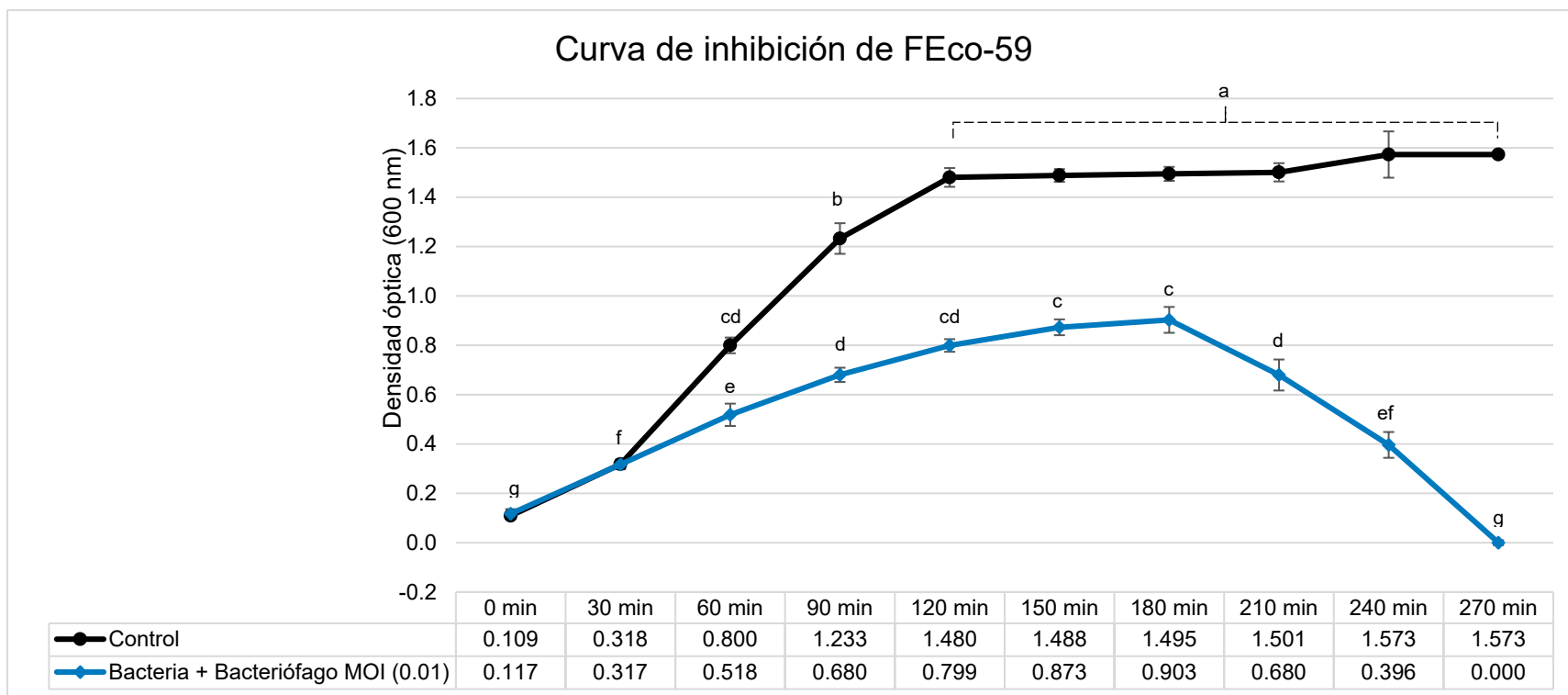


Figura 4. Curva de inhibición inducida por el bacteriófago FEco-59. Se representan el tratamiento control (●), y el tratamiento con el bacteriófago (MOI 0.01) (◆). Las medias que comparten letras diferentes son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

Además, la capacidad de reducir a niveles indetectables la concentración bacteriana utilizando una MOI baja, como lo es la de 0.01 del virus, es otra característica deseable, ya que utilizar bajas concentraciones del mismo ayuda a evitar una desestabilización de la membrana bacteriana en la primera fase de la infección viral, es decir, la adsorción, lo cual supondría un grave problema, ya que el bacteriófago no llegaría a replicarse para generar partículas virales nuevas (Abedon, 2016, 2022).

Por otro lado, en ninguna de las bacterias se observó un nuevo incremento en la concentración en el tiempo evaluado, esto es algo prometedor, ya que en algunas investigaciones con bacteriófagos (Tang y col., 2023; Xiao, 2023), es común observar un nuevo incremento del crecimiento de las bacterias, indicando la presencia de bacterias fago resistentes y la proliferación de las mismas, sin embargo, existen alternativas para evitar estas situaciones, una de ellas es la formulación de cocteles de bacteriófagos, cosa que no está descartada con los dos fagos evaluados durante esta investigación, otra de las alternativas es el uso en conjunto de bacteriófago con antibióticos de uso habitual, este tipo de tratamientos suele dar resultados muy positivos y ayuda a evitar la generación de bacterias resistentes tanto a antibióticos como fagos, lo cual sería interesante evaluar en posteriores investigaciones (Osman y col., 2023).

El análisis estadístico nos indica que ambas bacterias hospederas llegan a su fase estacionaria después de 150 y 120 min para Eco-32 y Eco-59 respectivamente, sin embargo, al agregar los bacteriófagos, estos son capaces de controlar el crecimiento bacteriano hasta niveles indetectables.

B CURVA DE REPLICACIÓN DE UN SOLO PASO DE LOS BACTERIÓFAGOS

Para determinar la dinámica de replicación viral de FEco-32 se realizó la curva de replicación de un solo paso, a través de la cual se determinó que el periodo de latencia de este fago es de 25 min, es decir, que después de ese lapso se produce la liberación de los primeros viriones. Mientras que el tamaño de explosión es de 125 ± 14 viriones por cada célula bacteriana infectada, lo que ocurre después de 30 min, de haber iniciado la absorción viral, así como una fase eclipse de 10 min (Figura 5).

Estos resultados concuerdan con las características biológicas que muestran algunos colifagos, tal como lo describe Wei y col., 2023, para el bacteriófago vB_EcoP_E212, cuya dinámica de replicación es similar a la que muestra FEco-32. El tamaño de explosión de FEco-32 se encuentra dentro de lo comúnmente reportado para fagos de *E. coli*; incluso es de mayor tamaño que los reportados por Sattar y col., 2023, para los fagos SKA49 y SKA64, que presentaron tamaños de explosión de 56 y 33 viriones por célula respectivamente.

Por otro lado, como resultado de la curva de replicación para el bacteriófago FEco-59, se determinó que su periodo de latencia es de 20 min, generando un tamaño de explosión de 81 ± 11 viriones por célula bacteriana infectada después de 35 min de haber iniciado la absorción de este, así como una fase eclipse de 18 min (Figura 6). Estos resultados, además de coincidir con algunos colifagos reportados, como el que fue caracterizado por Liao y col. en 2022 para el bacteriófago vB_EcoM-Sa45lw, nos ayudan a estimar que este bacteriófago tenga un genoma de mayor tamaño al de FEco-32, ya que le toma un poco más de tiempo completar su ciclo de replicación; esto se demostró a detalle en la sección G.

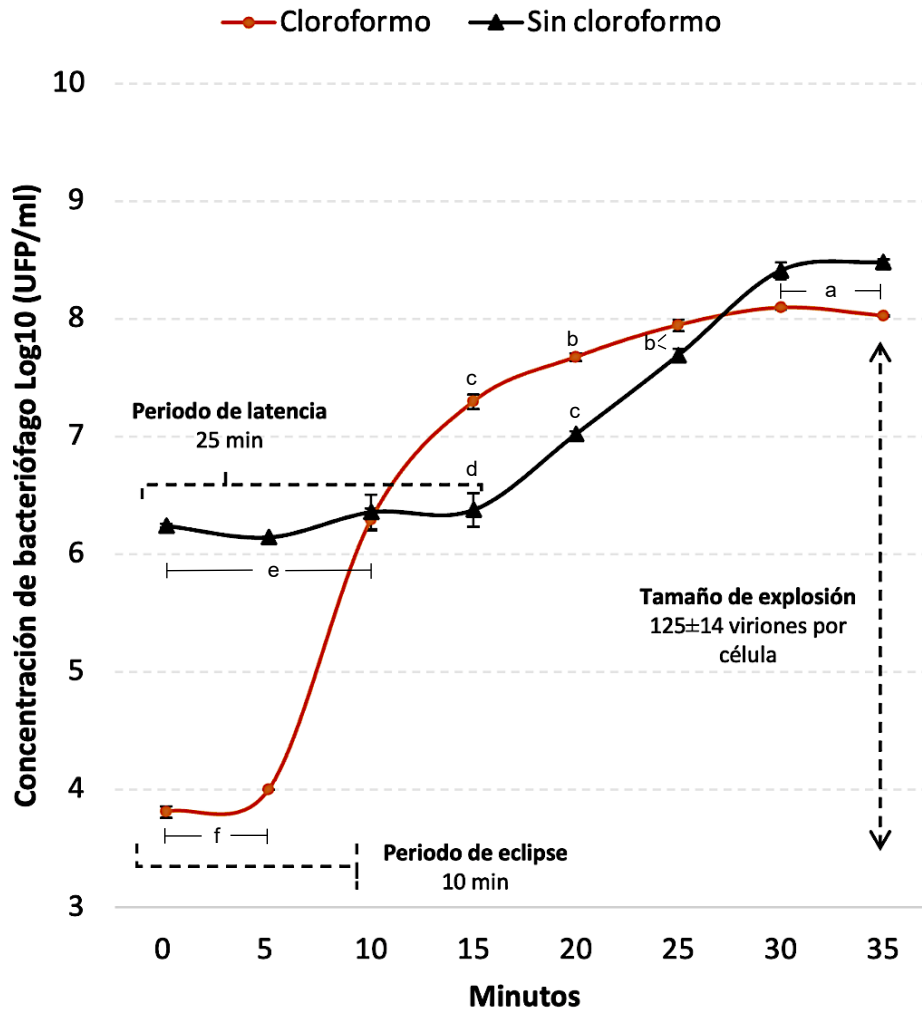


Figura 5. Curva de replicación de un solo paso del bacteriófago F_{Eco}-32. Se observan las diferentes fases y los tiempos que le toma al bacteriófago cada una (periodo de latencia = 25 min, periodo de eclipse = 10 min, el tamaño de explosión es de 125±14 viriones por célula). Las medias que comparten letras diferentes son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

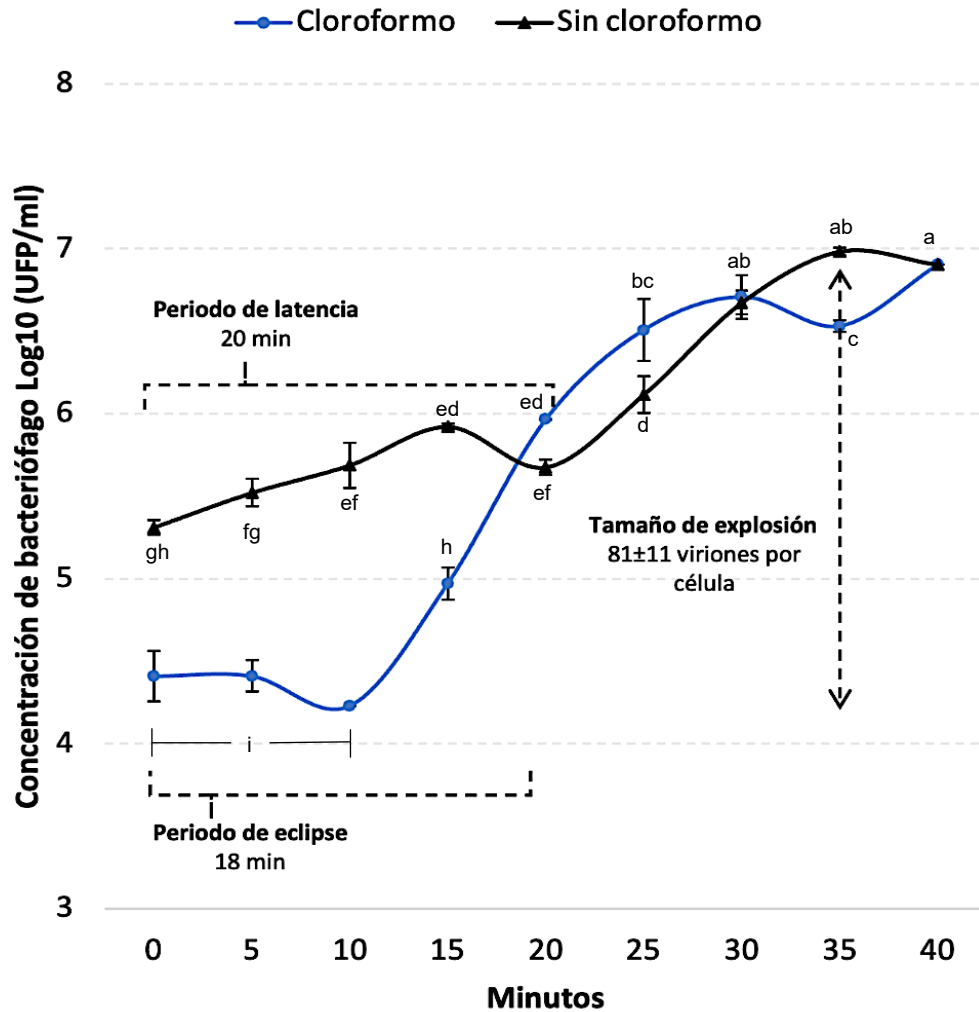


Figura 6. Curva de replicación de un solo paso del bacteriófago F Eco-59. Se observan las diferentes fases y los tiempos que le toma al bacteriófago cada una (periodo de latencia = 20 min, periodo de eclipse = 18 min, el tamaño de explosión es de 81 ± 11 viriones por célula). Las medias que comparten letras diferentes son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

C INHIBICIÓN DE *Escherichia coli* EN AGUA DE USO AGRÍCOLA

Con la intención de determinar el potencial de los bacteriófagos como alternativa para el control de las cepas hospederas en agua de uso agrícola, se realizó un ensayo simulando dichas condiciones.

Los resultados obtenidos, determinan que al aplicar los bacteriófagos a una MOI de 0.1, reduce en un 78.12% la concentración bacteriana (Figura 7), esto es algo prometedor, sin embargo, es necesario hacer ajustes en la concentración del virus o elaborar una estrategia en conjunto con otras herramientas de uso habitual para el tratamiento de este tipo de aguas, ya que la NOM-181-SSA1-1998 indica que el porcentaje de reducción bacteriana debe ser igual o mayor al 99% para considerar que el desinfectante puede ser utilizado sin embargo, se ha demostrado que estos agentes son una herramienta útil contra bacterias resistentes a otros agentes antimicrobianos, como los cuaternarios de amonio, ya que se trata de una alternativa económica, sustentable, amigable con el ambiente y con la capacidad de autolimitar su presencia una vez que las bacterias hospederas sean eliminadas, además, como se mencionó, aumentando su concentración o combinándolo con otras herramientas, se pueden alcanzar niveles de disminución de hasta el 99% (Sánchez-Rosario y col., 2024).

Durante años, la interacción entre bacterias y sus fagos en el ambiente ha sido estudiada. Desde 1991, (Kokjohn y col., 1991) concluyeron que los fagos desempeñan un papel importante en el equilibrio dinámico de las bacterias en los ecosistemas acuáticos naturales y podrían utilizarse potencialmente para controlar la densidad y la diversidad genética de la población bacteriana.

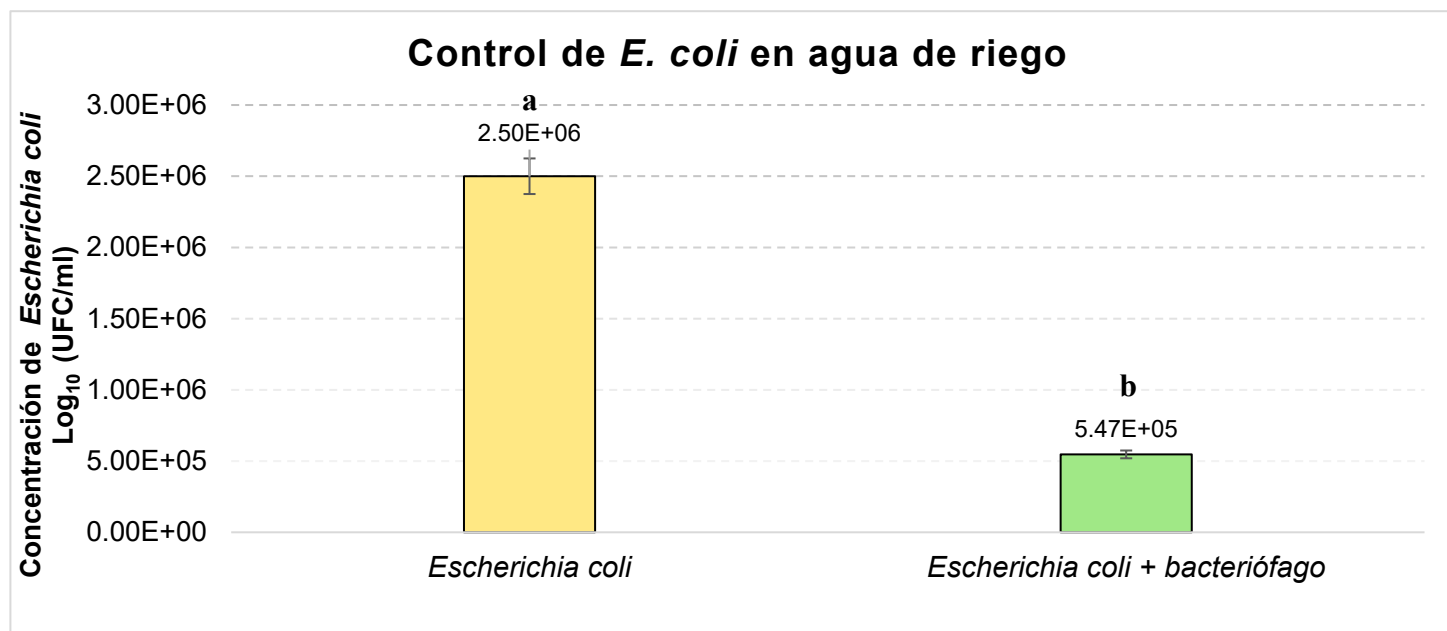


Figura 7. Control de *E. coli* en agua de riego en condiciones *in vitro*. La barra amarilla representa la bacteria en agua de riego sin bacteriófago, mientras que la verde representa la bacteria en agua de riego con el bacteriófago. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

Es por ello, que hoy en día se sigue estudiando la posibilidad de agregar estos agentes a los métodos para el tratamiento de aguas, tanto de uso agrícola como residuales. Aunque sabemos que existen métodos capaces de disminuir en mayor porcentaje la concentración de bacterias contaminantes, es importante recordar los residuos que estos producen tras su aplicación; por ejemplo, tenemos los cloratos y percloratos producto de la hipercloración o residuos de algunos desinfectantes como Bioxan. Además, esta es una alternativa mucho más económica que el uso de luz UV o la ozonización, que tienden a ser muy costosas debido a la infraestructura que requieren (Musa Yahaya y col., 2023).

Estudios anteriores han proporcionado evidencia de que el tratamiento con fagos es una herramienta para limitar la colonización bacteriana en aguas para uso agrícola, así como aguas contaminadas por residuos de hospitales donde se ha demostrado que hasta el 70% de las bacterias eran resistentes a antibióticos (Álvarez y col., 2019; Sadeqi y col., 2022). Se ha propuesto el uso de cocteles de bacteriófagos para evitar la generación de cepas fago resistentes y aumentar la eficiencia, alcanzando a eliminar hasta el 99% de la concentración bacteriana (Sánchez-Rosario y col., 2024).

Una de las transformaciones contempladas dentro de los objetivos de desarrollo sostenible es la accesibilidad al agua, que incluye la contaminación y la gestión del agua. Con un aumento esperado en la demanda de agua del 50% para fines de 2030 (Sachs y col., 2019), estudios de este tipo son necesarios para ayudar continuamente en el desarrollo de tecnologías y protocolos que satisfagan la demanda global de agua en las próximas décadas. El tratamiento de diferentes efluentes para su reutilización en la agricultura y la ganadería es el enfoque más respetuoso con el medio ambiente para la

gestión de residuos industriales. También para el tratamiento del agua producida (subproducto que sale a la superficie durante la producción de petróleo y gas), que contienen una composición química y biológica compleja, cada pequeño paso es significativo. Particularmente cuando los volúmenes globales estimados producidos son 158,900 millones de barriles diarios, siendo un área de oportunidad para el aprovechamiento de estos subproductos (Amakiri y col., 2023).

D ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LOS BACTERIÓFAGOS

Existen diferentes factores ambientales que pueden afectar la estabilidad de los bacteriófagos; uno de los más importantes es la temperatura, ya que diversas investigaciones indican que estos agentes pueden ser sensibles a temperaturas mayores a la de crecimiento óptimo de la bacteria hospedera; además, cuando se trata de un agente biológico, la vida de anaquel suele ser una desventaja; es por ello que determinar la estabilidad de estos agentes en condiciones de almacenamiento es de suma importancia.

Se evaluaron los bacteriófagos a las temperaturas de 4 °C y 40 °C, condiciones a las cuales se podría ser expuesto el bacteriófago al ser almacenado sin necesidad de utilizar equipo altamente especializado, así como al aplicarlo en el ambiente, por ejemplo para el control de *E. coli* en agua de riego o en superficies al exterior, condiciones donde fácilmente podría alcanzar o superar estas temperaturas en locaciones como lo es el estado de Sinaloa.

Los resultados del bacteriófago FEco-32, demuestran que este mantuvo mayor estabilidad durante los 5 meses de exposición. En este caso, el fago no disminuyó su concentración en ningún logaritmo a 4 °C, mientras que a 40°C sí presentó una disminución mínima de 1 logaritmo (Figura 8).

En el caso del bacteriófago FEco-59, demostró mayor sensibilidad a las condiciones evaluadas. Durante los 5 meses de exposición, el bacteriófago disminuyó su concentración en 1 logaritmo para ambos tratamientos 4 °C y 40 °C (Figura 9), sin embargo, aunque el bacteriófago disminuyó su concentración logarítmica aún en condiciones de refrigeración, estos resultados son prometedores, ya que se ha de destacar que no hubo ningún tratamiento especial a los bacteriófagos antes ni durante la exposición. Además, es importante destacar su estabilidad comparada con la de otros fagos reportados, por ejemplo, los bacteriófagos para *Salmonella* reportados por Petsong y col. (2019), los cuales solo presentaron viabilidad durante 3 meses a temperaturas de 4 °C aun siendo liofilizados; sin embargo, después de encapsularlo, observaron estabilidad durante los mismos 3 meses.

Lo que indica que, aunque los bacteriófagos FEco-32 y FEco-59 presentan estabilidad durante el tiempo evaluado aún sin tratamientos previos, utilizando herramientas como la liofilización, se podría aumentar la vida de anaquel del mismo hasta 20 meses o incluso más según otros autores como (Manohar y Ramesh, 2019), o en caso de combinar métodos como la encapsulación y liofilización para evitar la deshidratación de los fagos, aumentaría aún más su estabilidad, como lo indicaron (Śliwka y col., 2019).

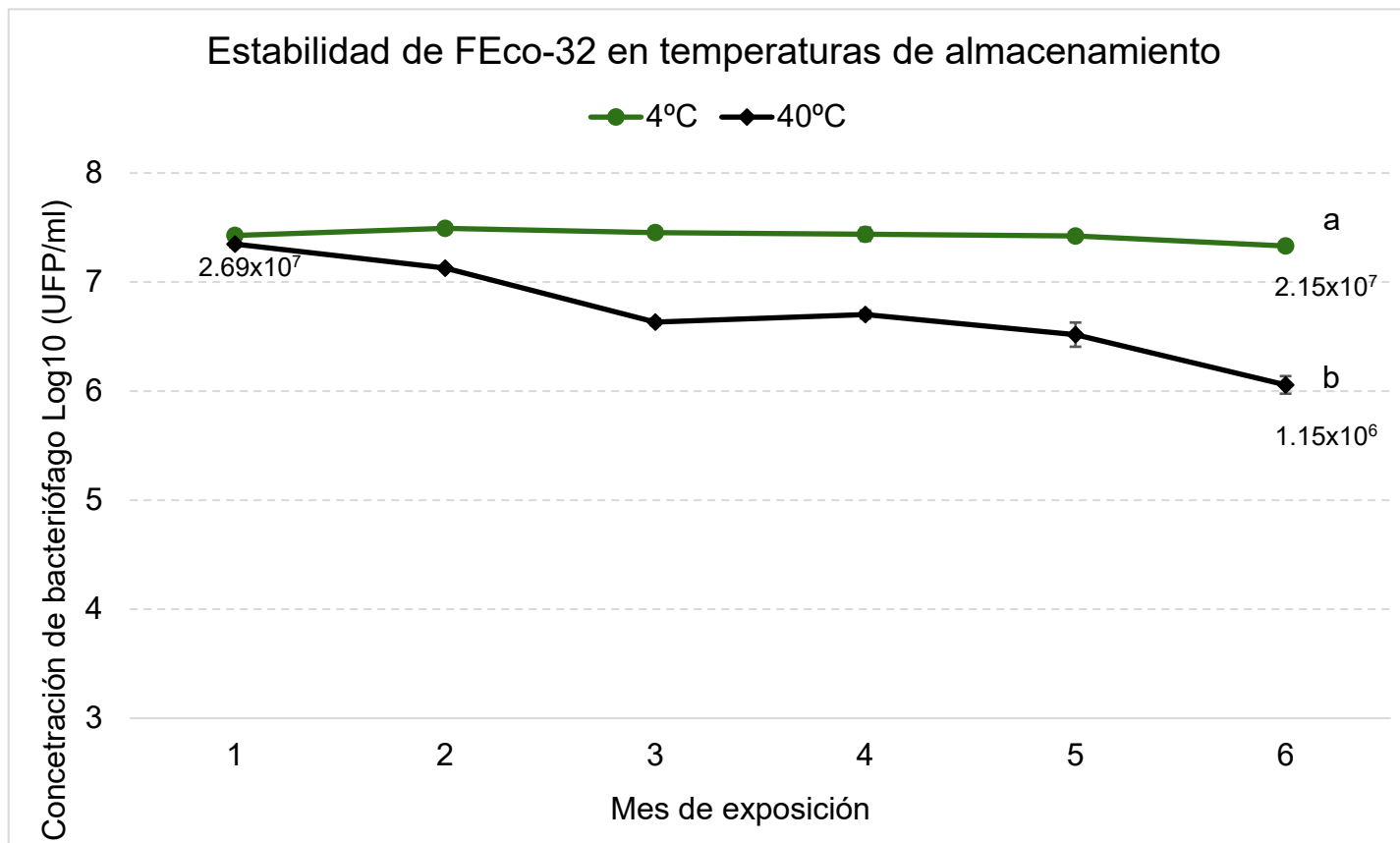


Figura 8. Concentración del bacteriófago FEco-32 (UFP/ml) después de exposición a temperaturas de 4 °C (●) y 40 °C (◆) durante 6 meses. El color azul representa el tratamiento 4 °C, mientras que el color naranja representa el tratamiento 40 °C. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

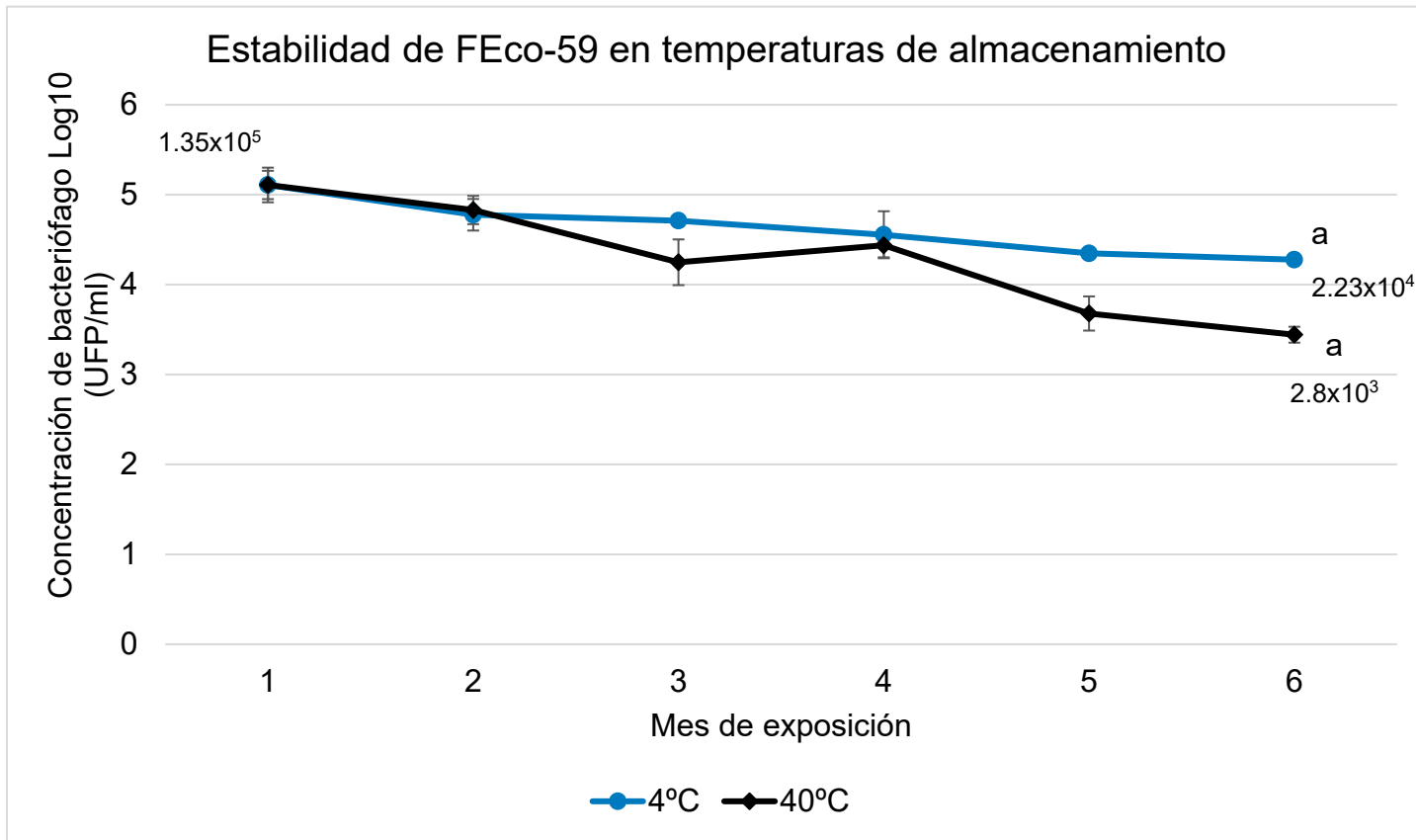


Figura 9. Concentración del bacteriófago FEco-59 (UFP/ml) después de exposición a temperaturas de 4 °C (●) y 40 °C (◆) durante 6 meses. El color azul representa el tratamiento 4 °C, mientras que el color naranja representa el tratamiento 40 °C. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

Además, la estabilidad de un bacteriófago puede entenderse como la capacidad de este de mantenerse viable a la concentración necesaria para su aplicabilidad (Matysiak y col., 2019), es decir, con ello podemos decir que ambos fagos son estables a estas condiciones; sin embargo, podrían mejorarse este aspecto, añadiendo algún tratamiento de los anteriormente mencionados, como liofilización, encapsulación, entre otras.

E ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS A DISTINTOS NIVELES DE PH

El pH es una de las condiciones fisicoquímicas que pueden llegar a afectar, ya sea en mayor o menor medida, la estabilidad de los fagos, y a su vez, afectar su capacidad como agentes de control biológico. Es por ello la importancia de evaluar y determinar la estabilidad de estos agentes a diferentes rangos de pH (Bagińska y col., 2024).

Para ambos fagos se tomó como control el tratamiento de pH 7, y los resultados obtenidos fueron algo contrastantes entre sí. Para FEco-32 se obtuvieron resultados muy prometedores, ya que no exhibió diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 10), demostrando estabilidad a estas condiciones de pH (3, 5, 7 y 9).

Esto es algo positivo, ya que numerosas investigaciones sobre distintos bacteriófagos (Liao y col., 2022; Tang y col., 2023), evidencian que al menos en condiciones de pH ácido, los fagos son mayormente afectados, y esto se atribuye a que los fagos son estructuras que consisten en proteínas, las cuales pueden desnaturalizarse ante estas condiciones de pH.

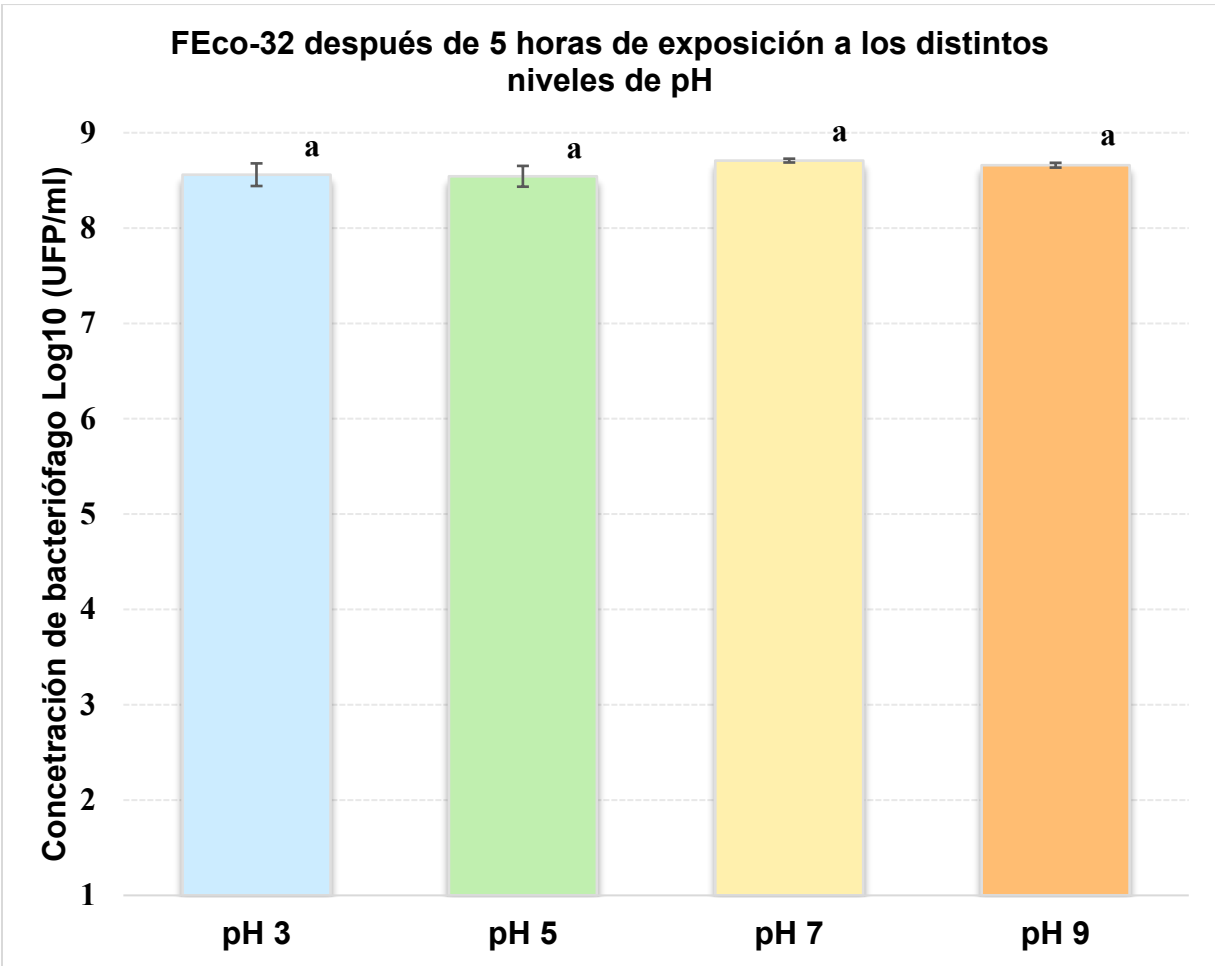


Figura 10. Concentración del bacteriófago FEco-32 después de ser expuesto a los distintos pH (3, 5, 7, 9). La exposición fue de 5 h, letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

Por otro lado, FEco-59 sí presentó sensibilidad a los distintos pH evaluados (Figura 11). Para el pH 9 no llegó a disminuir ningún logaritmo referente al control, mientras que los pH bajos fueron los que disminuyeron en mayor cantidad el título viral, perdiendo 2 logaritmos para pH 3 y 1 logaritmo para pH 5. Esto, corresponde con lo mencionado en otras investigaciones donde se observó que un pH bajo de 3,0 a 4,0 afecta significativamente la pérdida de actividad de los fagos, mientras que incluso una reacción alcalina fuerte (pH de 11,0 a 12,0) no conduce a una pérdida completa de la actividad de los fagos.

Sin embargo, aunque el bacteriófago que presentó mayor sensibilidad llegó a una disminución de 2 logaritmos en el pH más agresivo, es importante resaltar que después del tratamiento seguía teniendo capacidad lítica sobre la bacteria hospedera; esto aunado a la capacidad de hacer uso de dichas células bacterianas para su replicación, indican que es posible utilizar estos fagos como agentes de control, recordando administrar las concentraciones adecuadas para que su aplicabilidad, una vez expuesto bajo ciertas condiciones, siga siendo efectiva.

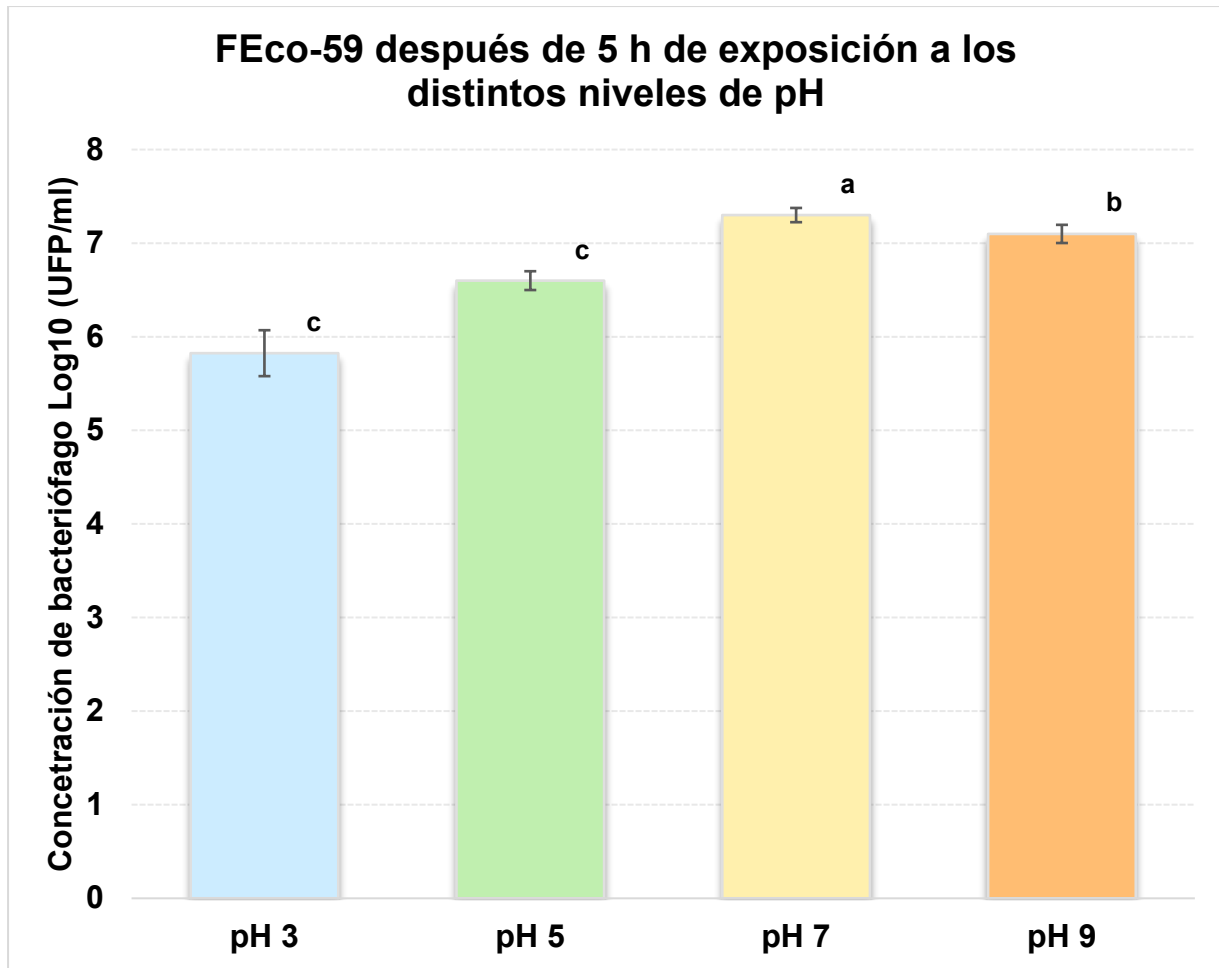


Figura 11. Concentración del bacteriófago FEco-59 después de ser expuesto a los distintos pH (3, 5, 7, 9). La exposición a los distintos pH fue de 5 h. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

F ESTABILIDAD DE LOS BACTERIÓFAGOS EN CONDICIONES DE TRACTO GASTROINTESTINAL SIMULADO

Los fagos utilizados para la seguridad alimentaria, particularmente cuando se aplican en alimentos listos para el consumo, serán ingeridos por el consumidor e inevitablemente pasarán por el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, en este estudio, utilizamos un modelo de simulación de tracto gastrointestinal *in vitro* para dilucidar el impacto que tienen estas condiciones sobre dos fagos que infectan cepas de *E. coli*.

Los ensayos *in vitro* ayudaron a demostrar que los bacteriófagos son capaces de resistir condiciones de tracto gastrointestinal simulado, teniendo una disminución mínima de un logaritmo en ambos fagos una vez terminado su paso a través de las respectivas etapas.

Para el bacteriófago FEco-32, se observó una disminución de un logaritmo en la fase más agresiva (fase gástrica) y manteniéndose estable en la concentración hasta la fase intestinal (Figura 12). Lo que resalta la capacidad de este virus para permanecer viable en condiciones a las cuales sería expuesto en caso de ser utilizado como agente bioterapéutico en un futuro, algo deseable para fagos que se apliquen con este fin según algunos investigadores (Gildea y col., 2022; Maronek y col., 2020).

Por otro lado, el bacteriófago FEco-59 demostró mayor estabilidad en la fase gástrica, permaneciendo su concentración en el mismo logaritmo que la etapa inicial (log 10⁶).

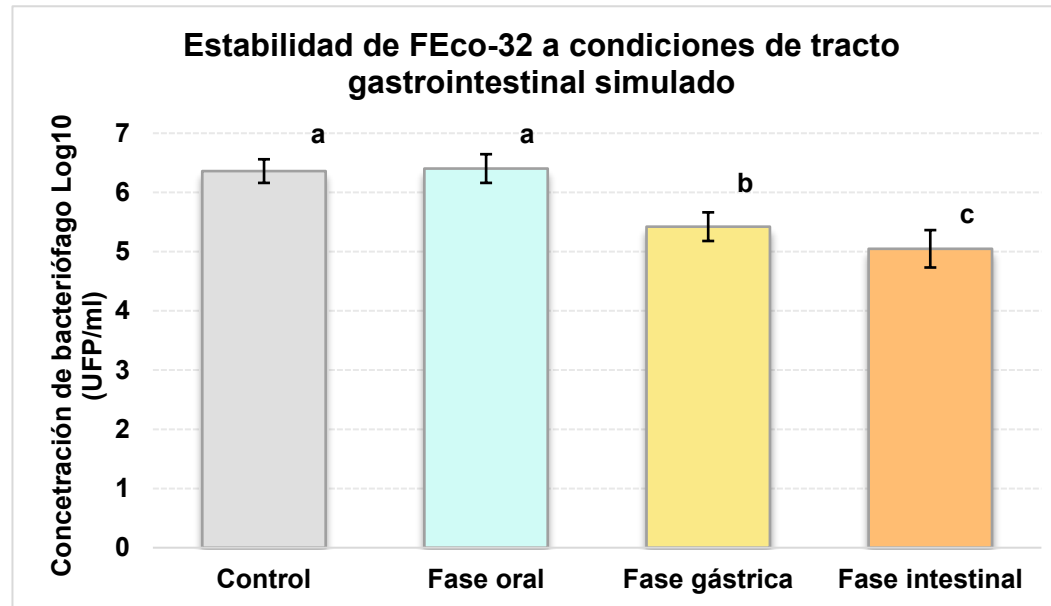


Figura 12. Concentración del bacteriófago FEco-32 (Log₁₀ UFP/ml) al ser expuesto a las distintas fases del tracto gastrointestinal simulado. Control (azul), fase oral (azul), fase gástrica (amarilla), fase intestinal (naranja). Las cuantificaciones del bacteriófago se realizaron al término de cada fase por triplicado (oral = 2 min, gástrica = 120 min, intestinal= 120 min), antes de transferirlo a la fase subsecuente. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

Sin embargo, una vez expuesto a la fase intestinal, también había sufrido una disminución de un logaritmo (Figura 13), es decir, al final del ensayo ambos fagos disminuyeron únicamente un logaritmo; esto es algo prometedor, ya que los títulos de fagos y la proliferación pueden reducirse significativamente con valores bajos de pH, lo que podría significar una reducción de la concentración del fago durante el tránsito TGI, debido a la acidez del estómago. Sin embargo, existen fagos, como los dos caracterizados en esta investigación, que son capaces de tolerar valores de pH bajos.

Tanto FEco-32 como FEco-59 demostraron mayor estabilidad que el colifago Ace reportado por (Pinto y col., 2022), el cuál disminuyó ~3.5 logaritmos después de ser expuesto a las mismas condiciones que las realizadas en este ensayo (disminuyendo de $\log 10^{10}$ a $\log 10^{6.5}$). Además, otros estudios han informado que algunos alimentos pueden funcionar como aliados protectores para que los fagos pasen al estómago (Międzybrodzki y col., 2017); por lo tanto, la probabilidad de que partículas de fagos viables lleguen al intestino es muy alta, lugar donde se almacena *E. coli* patógena. Ha de tenerse en cuenta que, en el paso por las diferentes etapas del tracto gastrointestinal, los fagos no solamente son expuestos a cambios repentinos de pH, sino que son expuestos a diversas enzimas, así como sales biliares.

Algo interesante para posteriores investigaciones es evaluar la capacidad de los bacteriófagos para controlar las bacterias hospederas bajo estas condiciones, así como cuantificarlos para determinar cuánto es el aumento en el título viral como resultado de la replicación en estas condiciones.

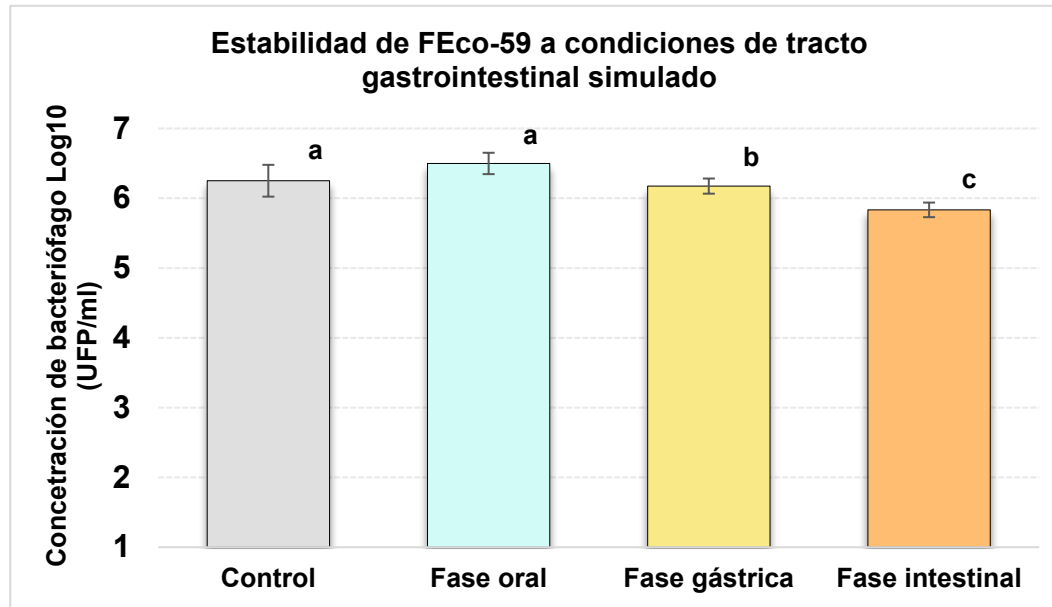


Figura 13. Concentración del bacteriófago F Eco-59 (\log_{10} UFP/ml) al ser expuesto a las distintas fases del tracto gastrointestinal simulado. Control, (azul) Fase oral (azul), fase gástrica (amarilla), fase intestinal (naranja). Las cuantificaciones del bacteriófago se realizaron al término de cada fase por triplicado (oral = 2 min, gástrica = 120 min, intestinal = 120 min), antes de transferirlo a la fase subsecuente. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios.

G SECUENCIACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO DE LOS BACTERIÓFAGOS Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

1 Análisis bioinformático del genoma de FEco-32

La secuenciación masiva y la anotación del genoma a través de diversas herramientas bioinformáticas revelaron que ambos genomas tienen un genoma lineal de ADN bicatenario, con un tamaño molecular para FEco-32 de 40,287 pb y un contenido de GC de 50%. Para el genoma de FEco-32 en total se identificaron 64 ORFs de los cuales 37 se encuentran en la cadena sentido y 27 en la anti sentido; 44 de ellos codifican para proteínas con función conocida, el resto codifican para proteínas cuya función no ha sido determinada o bien, no presenta ninguna homología con las secuencias reportadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (Cuadro 3; Anexo 1). Al igual que otros bacteriófagos, FEco-32 presenta un genoma con organización modular (Figura 14); integradas por los módulos de lisis, ADN replicación-modificación, proteínas de empaquetamiento del ADN y morfogénesis.

La búsqueda dirigida de genes relacionados con posibles mecanismos de patogenicidad y/o genes de resistencia antimicrobiana, así como genes de alergenicidad no arrojó homología con algunos genes encontrados en FEco-32, lo que evidencia su potencial para ser utilizado como agente de control de bacterias patógenas sin riesgo a agravar el problema de la resistencia bacteriana, ya que como indican múltiples investigadores, la ausencia de estos elementos en su genoma, es crucial para poder utilizar estos agentes de manera práctica desde el punto de vista de bioseguridad (Pires y col., 2023; Dalen y col., 2020).

Cuadro 3. Generalidades del genoma del bacteriófago FEco-32 obtenidas gracias al análisis bioinformático. En la columna derecha se describe el programa, algoritmo o base de datos utilizado para determinar cada característica, según sea el caso.

Genoma del bacteriófago FEco-32

Generalidades		
	Dato	Fuente
Tipo de genoma	Lineal de ADN bicatenario	GeneMarks
Tamaño molecular	40,287 pb	
GC	50%	GeneMarks
ORFs	64	GeneMarks
Cadena sentido	37	GeneMarks
Cadena antisentido	27	GeneMarks
Codificantes para proteína con función conocida	44	BLAST
Codificantes para proteína sin función conocida	20	BLAST
RNA de transferencia	1	Aragorn tRNAscan-se
Factores de virulencia	0	Victors
Resistencia a antibióticos	0	CARD
Genes de alergenicidad	0	AllergenOnline

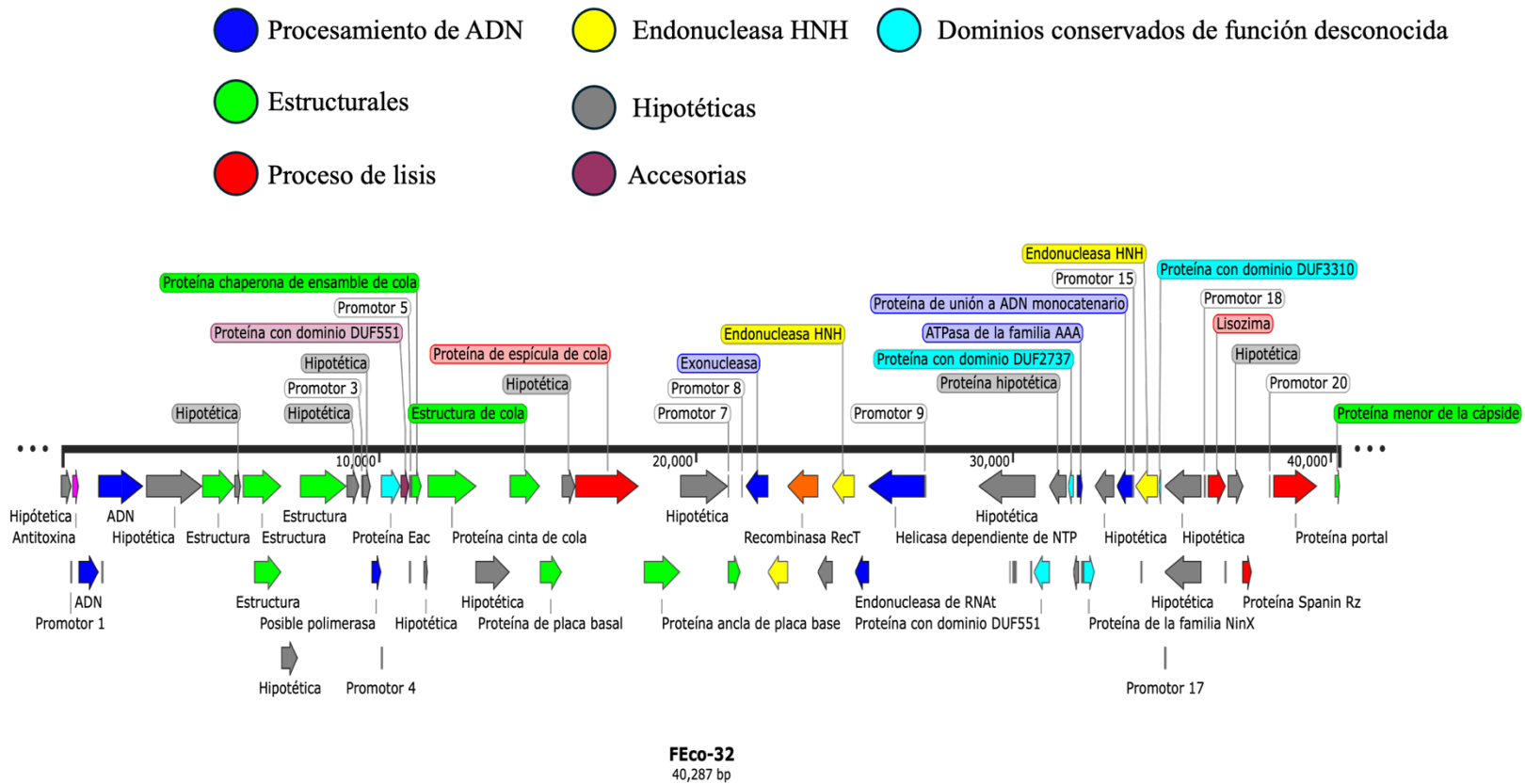


Figura 14. Representación gráfica del genoma del bacteriófago FEco-32.

2 Análisis bioinformático del genoma de FEco-59

Al igual que FEco-32, el genoma de FEco-59 tiene un genoma lineal de ADN bicatenario, con un tamaño considerablemente mayor, de 166,149 pb, así como un contenido de GC de 35% (Figura 15).

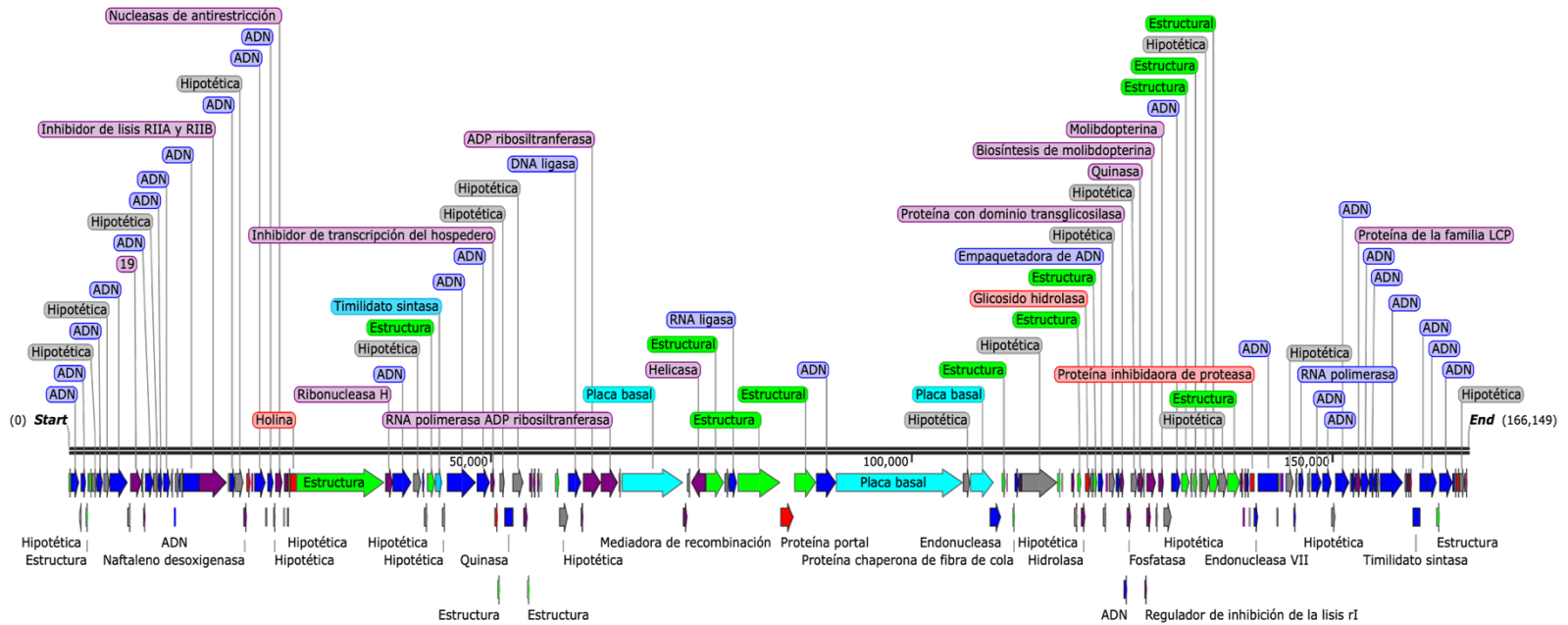
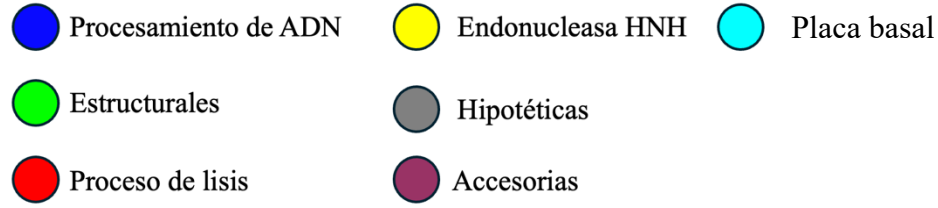
Para el genoma de FEco-59 en total se identificaron 266 ORFs de los cuales 225 se encuentran en la cadena sentido y 41 en la anti sentido. 178 de ellos presentaron homología con genes de función conocida y el resto codifican para proteínas cuya función no ha sido determinada, o no presenta ninguna homología con las secuencias reportadas en la base de datos de NCBI (Cuadro 4; Anexo 2).

Además, con ayuda de las herramientas Aragorn y tRNAscan-se se lograron identificar 11 RNAt en su genoma, algo positivo teniendo en cuenta que los fagos que tienen estos elementos genéticos tienden a ser más virulentos en la naturaleza y los utilizan como herramientas para transcribir el propio material genético con maquinaria del hospedero de una forma más eficiente (Asghar y col., 2022; Delesalle y col., 2016). Sin embargo, en el genoma de FEco-59, se encontró la presencia de un posible gen de alergenicidad identificado con ayuda de AllergenOnline (Sato y col., 2013).

Por otro lado, a pesar de que lo anterior impide el uso práctico de este bacteriófago, es posible hacer uso de la biología sintética en estudios posteriores para la fabricación de una partícula viral nueva con las características ideales a partir de los genomas caracterizados en esta investigación.

Cuadro 4. Generalidades del genoma del bacteriófago F_{Eco-59} obtenidas gracias al análisis bioinformático. En la columna derecha se describe el programa, algoritmo o base de datos utilizado para determinar cada característica, según sea el caso.

Genoma del bacteriófago F_{Eco-59}		
Generalidades		
	Dato	Fuente
Tipo de genoma	Lineal de ADN bicatenario	GeneMarks
Tamaño molecular	166,149 pb	
GC	35%	GeneMarks
ORFs	266	GeneMarks
Cadena sentido	225	GeneMarks
Cadena antisentido	41	GeneMarks
Codificantes para proteína con función conocida	178	BLAST
Codificantes para proteína sin función conocida	88	BLAST
RNA de transferencia	11	Aragorn tRNAscan-se
Factores de virulencia	0	Victors
Resistencia a antibióticos	0	CARD
Genes de alergenidad	1	AllergenOnline



F Eco-59
166,149 bp

Figura 15. Representación gráfica del genoma del bacteriófago F Eco-59.

H MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS BACTERIÓFAGOS

Con ayuda de la plataforma PhaBOX (Shang y col., 2023), se logró determinar que el bacteriófago FEco-32 es virulento, y pertenece a la familia *Drexlerviridae* (anteriormente también conocida como superfamilia T1), de la clase *Caudoviricetes*, que son pequeños bacteriófagos con tamaños de genoma similares al de FEco-32 (43 a 52 kb, Maffei y col., 2021). Desafortunadamente, debido a problemas técnicos, el bacteriófago FEco-32 no pudo observarse en las micrografías electrónicas, seguramente debido al título viral obtenido, ya que no fue posible capturar una imagen clara de la partícula viral que ayudara a determinar el tamaño estructural del mismo, es necesario realizar la toma de microscopías nuevamente.

Por otro lado, para el bacteriófago FEco-59, analizando las imágenes, es posible clasificarlo en la clase *Caudoviricetes*, presentando una estructura cabeza-cola, de simetría icosaédrica y un diámetro de cápside de 57.14 nm, así como la presencia de un tallo largo y flexible de 65.88 nm (Figura 16).

Haciendo uso una vez más de la plataforma PhaBOX (Shang y col., 2023), se logró determinar que el bacteriófago es virulento, y pertenece a la familia *Straboviridae* (anteriormente también conocida como superfamilia T4), de la clase *Caudoviricetes*, que se caracterizan por tener una estructura de cabeza y cola, así como la presencia de 6 fibras largas y espículas (Fokine y col., 2004), con tamaños de genoma reportados rondando los 169 kb, el cual codifica para aproximadamente 300 genes que, como se puede observar, se asemeja al tamaño de genoma obtenido para FEco-95 de 166.4 kb y sus 266 ORF.

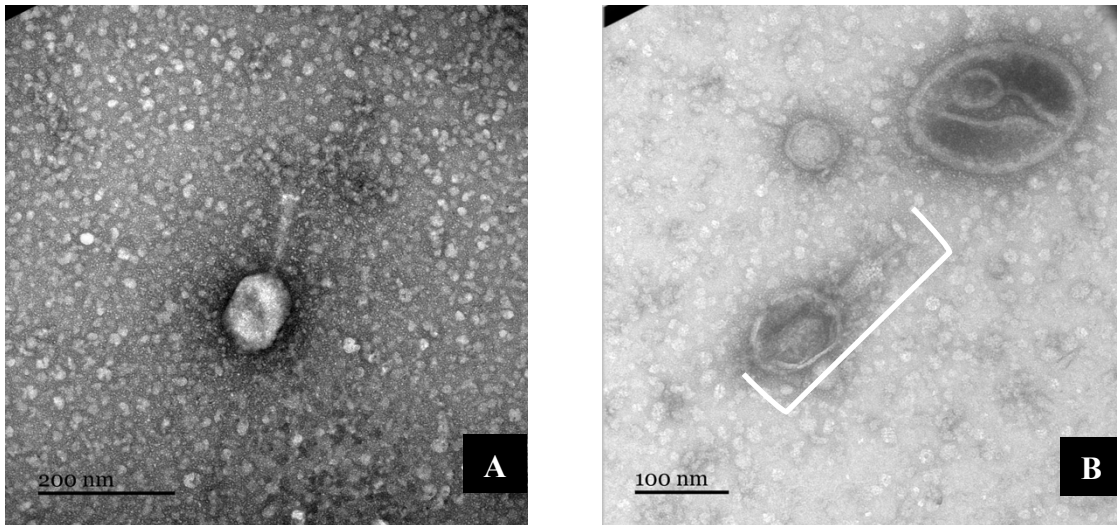


Figura 16. Micrografías electrónicas de transmisión (TEM) del bacteriófago FEco-59. Se muestran las tomas con diferentes objetivos. A) Micrografía a 200 nm, en la cual se observa claramente la estructura viral de FEco-59, B) Micrografía a 100 nm, donde se observa la partícula viral en la parte inferior de la imagen, señalada con blanco. Se logró identificar una estructura cabeza-cola de simetría icosaédrica y un diámetro de cápside de 57.14 nm, así como la presencia de un tallo largo, flexible de 65.88 nm

IX. CONCLUSIONES

Se lograron caracterizar dos bacteriófagos pertenecientes a la clase *Caudoviricetes*, los cuales fueron designados como FEco-32 y FEco-59. Ambos demuestran características biológicas aptas para su uso como agentes de control biológico sobre cepas de *Escherichia coli* ambientales con potencial patogénico.

Se determinó la capacidad de poder controlar a las respectivas bacterias hospederas en condiciones *in vitro* y en agua de uso agrícola, exhibiendo el potencial de estos agentes para el control biológico.

Con ayuda del análisis bioinformático de ambos genomas, se logró determinar que el bacteriófago FEco-32 no contiene genes de resistencia, virulencia o alergenicidad asociados a su genoma. Sin embargo, para el bacteriófago FEco-59, se encontraron elementos que impiden su uso práctico, como la presencia de un posible gen de alergenicidad.

Sin embargo, una alternativa para eliminar este gen sería hacer uso de herramientas para eliminar o noquear estos elementos como la ingeniería genética, o bien diseñar un genoma completo, haciendo uso de la información decodificada tanto de FEco-32 como de FEco-59, para la fabricación de una partícula viral sintética optimizada con biología sintética. De esta forma podría resolverse el problema y permitiría hacer uso de ambos fagos que, como se demostró a lo largo de esta investigación, presentan características biológicas prometedoras.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelsattar, A., Dawoud, A., Makky, S., Nofal, R., Aziz, R., y El-Shibiny, A. (2022). Bacteriophages: from Isolation to Application. *Current pharmaceutical biotechnology*, 23(3), 337–360. <https://doi.org/10.2174/1389201022666210426092002>
- Abedon, S. T. (2009). Kinetics of Phage-Mediated Biocontrol of Bacteria. <https://doi.org/https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0242>
- Abedon, S. T. (2016). Phage therapy dosing: The problem(s) with multiplicity of infection (MOI). *Bacteriophage*, 6(3), e1220348. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1220348>
- Abedon, S. T. (2022). Further Considerations on How to Improve Phage Therapy Experimentation, Practice, and Reporting: Pharmacodynamics Perspectives. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*, 3(2), 98–111. https://doi.org/10.1089/PHAGE.2022.0019/ASSET/IMAGES/PHAGE.2022.0019_FIGURE6.JPG
- Al-Hindi, R. R., Teklemariam, A. D., Alharbi, M. G., Alotibi, I., Azhari, S. A., Qadri, I., Alamri, T., Harakeh, S., Applegate, B. M., y Bhunia, A. K. (2022). Bacteriophage-Based Biosensors: A Platform for Detection of Foodborne Bacterial Pathogens from Food and Environment. En *Biosensors* (Vol. 12, Número 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios12100905>
- Alsubhi, G. A. (2021). Bacteriophages as affordable solution for treatment of multidrug resistant bacteria, and their recent potential applications. En *Novel Research in*

- Microbiology Journal* (Vol. 5, Número 6, pp. 1405–1414). Egyptian Association for Medical Mycologists (EAMM). <https://doi.org/10.21608/nrmj.2021.204798>
- Álvarez, B., López, M. M., y Biosca, E. G. (2019). Biocontrol of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 10, 492073. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02813/BIBTEX>
- Amakiri, K. T., Ogolo, N. A., Angelis-Dimakis, A., y Albert, O. (2023). Physicochemical assessment and treatment of produced water: A case study in Niger delta Nigeria. *Petroleum Research*, 8(1), 87–95. <https://doi.org/10.1016/J.PTLRS.2022.05.003>
- Amarillas, L., Rubí-Rangel, L., Chaidez, C., González-Robles, A., Lightbourn-Rojas, L., y León-Félix, J. (2017). Isolation and characterization of phiLLS, a novel phage with potential biocontrol agent against multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL), 279350. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01355/BIBTEX>
- Amjad, N., Naseer, M. S., Imran, A., Menon, S. V., Sharma, A., Islam, F., Tahir, S., y Shah, M. A. (2024). A mini review on the role of bacteriophages in food safety. *CyTA - Journal of Food*, 22(1), 2357192. <https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2357192>
- Arienzo, A., Murgia, L., Fraudentali, I., Gallo, V., Angelini, R., y Antonini, G. (2020). Microbiological Quality of Ready-to-Eat Leafy Green Salads during Shelf-Life and Home-Refrigeration. *Foods*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/FOODS9101421>
- Arthur, J. C., Gharaibeh, R. Z., Mühlbauer, M., Perez-Chanona, E., Uronis, J. M., Mccafferty, J., Fodor, A. A., y Jobin, C. (2014). *ARTICLE Microbial genomic analysis*

reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer.

<https://doi.org/10.1038/ncomms5724>

Arzanlou, M., Chai, W. C., yVenter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*, 61(1), 49–59.

<https://doi.org/10.1042/EBC20160063>

Asghar, S., Ahmed, A., Khan, S., Lail, A., yShakeel, M. (2022). Genomic characterization of lytic bacteriophages AϕL and AϕM infecting ESBL *K. pneumoniae* and its therapeutic potential on biofilm dispersal and in-vivo bacterial clearance.

Microbiological Research, 262, 127104.

<https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2022.127104>

Atluri, E., yYang, V. (s/f). *A Comparison of Bacterial/Animal/Plant Viruses and Their Effects on Humans.*

Bagińska, N., Grygiel, I., Orwat, F., Harhala, M. A., Jędrusiak, A., Gębarowska, E., Letkiewicz, S., Górski, A., y Jończyk-Matysiak, E. (2024). Stability study in selected conditions and biofilm-reducing activity of phages active against drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54469-z>

Besemer, J., Lomsadze, A., y Borodovsky, M. (2001). GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*, 29(12), 2607–2618.

<https://doi.org/10.1093/NAR/29.12.2607>

- Borodovich, T., Shkoporov, A. N., Ross, R. P., y Hill, C. (2022). Phage-mediated horizontal gene transfer and its implications for the human gut microbiome. *Gastroenterology Report*, 10. <https://doi.org/10.1093/GASTRO/GOAC012>
- Chan, P. P., y Lowe, T. M. (2019). tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1962, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_1
- Chen, Q., Dharmaraj, T., Cai, P. C., Burgener, E. B., Haddock, N. L., Spakowitz, A. J., y Bollyky, P. L. (2022). Bacteriophage and Bacterial Susceptibility, Resistance, and Tolerance to Antibiotics. *Pharmaceutics*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14071425>
- Chibani-Chennoufi, S., Sidoti, J., Bruttin, A., Kutter, E., Sarker, S., y Brüßow, H. (2004). In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: Implications for phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2558–2569. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2558-2569.2004>
- Cuevas, C., Batura, N., Wulandari, L. P. L., Khan, M., y Wiseman, V. (2021). Improving antibiotic use through behaviour change: a systematic review of interventions evaluated in low- and middle-income countries. *Health Policy and Planning*, 36(5), 754. <https://doi.org/10.1093/HEAPOL/CZAB021>
- Dale, A. P., y Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615–626. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2015.09.009/ASSET/F966F364-875C-4464-A6D2-BA9E3AF4016B/MAIN.ASSETS/GR2.SML>

- Deepika, Kumar, L., y Gaikwad, K. K. (2023). Carbon dots for food packaging applications. En *Sustainable Food Technology* (Vol. 1, Número 2, pp. 185–199). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d2fb00020b>
- Delesalle, V. A., Tanke, N. T., Vill, A. C., Krukonis, G. P., Eronique, V., y Delesalle, A. (2016). Testing hypotheses for the presence of tRNA genes in mycobacteriophage genomes. *Bacteriophage*, 6(3), e1219441. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1219441>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., y Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 19, Número 1, pp. 37–54). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>
- Domingo-Calap, P., y Delgado-Martínez, J. (2018). Bacteriophages: Protagonists of a post-antibiotic era. En *Antibiotics* (Vol. 7, Número 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., y Maciejewska, B. (2015). Bacteriophages and Phage-Derived Proteins-Application Approaches. En *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 22).
- Ducarmon, Q. R., Zwiittink, R. D., Hornung, B. V. H., Van Schaik, W., Young, V. B., y Kuijper, E. J. (2019). *Gut Microbiota and Colonization Resistance against Bacterial Enteric Infection*. <https://doi.org/10>
- Edgar, R., Friedman, N., Shahar, M. M., y Qimron, U. (2012). Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes.

Applied and Environmental Microbiology, 78(3), 744–751.
https://doi.org/10.1128/AEM.05741-11/SUPPL_FILE/AEM-AEM05741-11-S01.DOC

Endersen, L., y Coffey, A. (2020). The use of bacteriophages for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 36, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2020.10.006>

FDA. (s/f). *Investigations of Foodborne Illness Outbreaks | FDA*. Recuperado el 29 de agosto de 2024, de <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/investigations-foodborne-illness-outbreaks>

Fokine, A., Chipman, P. R., Leiman, P. G., Mesyanzhinov, V. V., Rao, V. B., y Rossmann, M. G. (2004). Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6003. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0400444101>

Foodborne Pathogens | FDA. (s/f). Recuperado el 4 de agosto de 2024, de <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>

Furfaro, L. L., Payne, M. S., y Chang, B. J. (2018). Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00376/FULL>

García-Cruz, J. C., Huelgas-Méndez, D., Jiménez-Zúñiga, J. S., Rebollar-Juárez, X., Hernández-Garnica, M., Fernández-Presas, A. M., Husain, F. M., Alenazy, R., Alqasmi, M., Albalawi, T., Alam, P., y García-Contreras, R. (2023). Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy. *PeerJ*, 11. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.15272>

García-Robles, S., Manuel, J., y Janeth, L. (2017). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha Asociación Iberoamericana de.* 18, 9–22.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81351597002>

Geneva: World Health Organization. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance.*

Gildea, L., Ayariga, J. A., y Robertson, B. K. (2022). Bacteriophages as Biocontrol Agents in Livestock Food Production. En *Microorganisms* (Vol. 10, Número 11). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10112126>

Gontsarik, M., Buhmann, M. T., Yaghmur, A., Ren, Q., Maniura-Weber, K., y Salentinig, S. (2016). Antimicrobial Peptide-Driven Colloidal Transformations in Liquid-Crystalline Nanocarriers. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(17), 3482–3486.
https://doi.org/10.1021/ACS.JPCLETT.6B01622/SUPPL_FILE/JZ6B01622_SI_001.PDF

Gordillo Altamirano, F., Kostoulas, X., Archer, S., Forsyth, J. H., Patwa, R., Trim, M., Morris, F. C., Oliveira, C., Kielty, L., Korneev, D., O, M. K., Lithgow, T. J., Peleg, A. Y., yBarr, J. J. (s/f). Bacteriophages targeting *Acinetobacter baumannii* capsule induce antimicrobial resensitization 2 3. 3800.
<https://doi.org/10.1101/2020.02.25.965590>

Habboush, Y., y Guzman, N. (2023). Antibiotic Resistance. *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>

- Harshitha, N., Rajasekhar, A., Saurabh, S., Sonalkar, R., Tejashwini, M., y Mitra, S. Das. (2022). Bacteriophages: Potential Biocontrol Agents and Treatment Options for Bacterial Pathogens. *Clinical Microbiology Newsletter*, 44(5), 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.CLINMICNEWS.2022.02.002>
- Hibstu, Z., Belew, H., Akelew, Y., y Mengist, H. M. (2022). Phage Therapy: A Different Approach to Fight Bacterial Infections. En *Biologics: Targets and Therapy* (Vol. 16, pp. 173–186). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/BTT.S381237>
- Hosseini, N., Chehrehgani, M., Moineau, S., y Charette, S. J. (2024). Centroid of the bacterial growth curves: a metric to assess phage efficiency. *Communications Biology* 2024 7:1, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06379-z>
- Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/PH12010035>
- Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Robles Aguilar, G., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., Davis Weaver, N., Wool, E. E., Han, C., Gershberg Hayoon, A., Aali, A., Abate, S. M., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abd-Elsalam, S., Abebe, G., Abedi, A., Abhari, A. P., Abidi, H., ... Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221–2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)
- Imran, A., Shehzadi, U., Islam, F., Afzaal, M., Ali, R., Ali, Y. A., Chauhan, A., Biswas, S., Khurshid, S., Usman, I., Hussain, G., Zahra, S. M., Shah, M. A., yRasool, A. (2023).

- Bacteriophages and food safety: An updated overview. *Food Science yNutrition*, 11(7), 3621. <https://doi.org/10.1002/FSN3.3360>
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., y Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/JAM.13468>
- Jo, S. J., Kwon, J., Kim, S. G., y Lee, S. J. (2023). The Biotechnological Application of Bacteriophages: What to Do and Where to Go in the Middle of the Post-Antibiotic Era. *Microorganisms*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11092311>
- Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B., y Górski, A. (2019). Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. En *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 17, Número 8, pp. 583–606). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1646126>
- Kannoly, S., Oken, G., Shadan, J., Musheyev, D., Singh, K., Singh, A., y Dennehy, J. J. (2021). A Single-Cell Approach Reveals Variation in Cellular Phage-Producing Capacities. *bioRxiv*, 2021.10.19.465070. <https://doi.org/10.1101/2021.10.19.465070>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., y Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004 2:2, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., y Nordmann, P. (2001). Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion

- sequence ISEcp1. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 237–241.
<https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2001.TB10762.X>
- Kasman, L. M., y Porter, L. D. (2022). Bacteriophages. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 280–283. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00131-5>
- Kokjohn, T. A., Sayler, G. S., y Miller, R. V. (1991). Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments. *Journal of General Microbiology*, 137(3), 661–666.
<https://doi.org/10.1099/00221287-137-3-661/CITE/REFWORKS>
- Lai, M. J., Chang, K. C., Huang, S. W., Luo, C. H., Chiou, P. Y., Wu, C. C., y Lin, N. T. (2016). The Tail Associated Protein of *Acinetobacter baumannii* Phage ΦAB6 Is the Host Specificity Determinant Possessing Exopolysaccharide Depolymerase Activity. *PLOS ONE*, 11(4), e0153361. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153361>
- Laslett, D., yCanback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 11.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKH152>
- Lee, H., y Yoon, Y. (2021a). Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness Worldwide. *Food Science of Animal Resources*, 41(1), 1.
<https://doi.org/10.5851/KOSFA.2020.E75>
- Lee, H., y Yoon, Y. (2021b). Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness Worldwide. *Food Science of Animal Resources*, 41(1), 1.
<https://doi.org/10.5851/KOSFA.2020.E75>

- León, M., y Bastías, R. (2015). Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), 135678. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00343/BIBTEX>
- Liao, Y. Te, Zhang, Y., Salvador, A., Ho, K. J., Cooley, M. B., yWu, V. C. H. (2022). Characterization of polyvalent *Escherichia* phage Sa157lw for the biocontrol potential of Salmonella Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 on contaminated mung bean seeds. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1053583>
- Liao, Y.-T., Zhang, Y., Salvador, A., Harden, L. A., y Wu, V. C. H. (2022). Characterization of a T4-like Bacteriophage vB_EcoM-Sa45lw as a Potential Biocontrol Agent for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O45 Contaminated on Mung Bean Seeds. *Microbiology Spectrum*, 10(1). https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02220-21/SUPPL_FILE/SPECTRUM02220-21_SUPPLEMENTARY_TABLES_S1-S4_UPDATED.XLSX
- Lin, D. M., Koskella, B., y Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), 162. <https://doi.org/10.4292/WJGPT.V8.I3.162>
- Liu, S., Lu, H., Zhang, S., Shi, Y., y Chen, Q. (2022). Phages against Pathogenic Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Infections: A Review. *Pharmaceutics*, 14(2), 427. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14020427>
- Loc-Carrillo, C., yAbedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111. <https://doi.org/10.4161/BACT.1.2.14590>

- Logeswari, P., Silambarasan, S., yAbraham, J. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(3), 311–317. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2012.04.007>
- Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 5(FEB), 51. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00051>
- Maffei, E., Shaidullina, A., Burkolter, M., Heyer, Y., Estermann, F., Druelle, V., Sauer, P., Willi, L., Michaelis, S., Hilbi, H., Thaler, D. S., y Harms, A. (2021). Systematic exploration of *Escherichia coli* phage–host interactions with the BASEL phage collection. *PLOS Biology*, 19(11), e3001424. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3001424>
- Magdalane, C. M., Kaviyarasu, K., Vijaya, J. J., Siddhardha, B., yJeyaraj, B. (2016). Photocatalytic activity of binary metal oxide nanocomposites of CeO₂/CdO nanospheres: Investigation of optical and antimicrobial activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 163, 77–86. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2016.08.013>
- Malabadi, R. B., MR, S., Kolkar, K. P., y Chalannavar, R. K. (2024). Pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) food borne outbreak: Detection methods and controlling measures. <https://magnascientiapub.com/journals/msarr/sites/default/files/MSARR-2024-0003.pdf>, 10(1), 052–085. <https://doi.org/10.30574/MSARR.2024.10.1.0003>
- Malabadi, R. B., Mr, S., Kolkar, K. P., Chalannavar, R. K., y Scientia, M. (2024). Pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) food borne outbreak: Detection methods and controlling

- measures. <https://magnascientiapub.com/journals/msarr/sites/default/files/MSARR-2024-0003.pdf>, 10(1), 052–085. <https://doi.org/10.30574/MSARR.2024.10.1.0003>
- Manohar, P., y Ramesh, N. (s/f). Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51742-4>
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., y Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23040795>
- Mármol, I., Sánchez-De-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., Jesús, M., y Yoldi, R. (s/f). *Molecular Sciences Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer*. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>
- Maronek, M., Link, R., Ambro, L., y Gardlik, R. (2020). Phages and Their Role in Gastrointestinal Disease: Focus on Inflammatory Bowel Disease. En *Cells* (Vol. 9, Número 4). <https://doi.org/10.3390/cells9041013>
- Martínez, B., García, P., y Rodríguez, A. (2019). Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2018.07.007>
- Międzybrodzki, R., Kłak, M., Jonczyk-Matysiak, E., Bubak, B., Wójcik, A., Kaszowska, M., Weber-Dabrowska, B., Łobocka, M., y Górski, A. (2017). Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic *staphylococcal* bacteriophage A5/80. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 220058. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00467/BIBTEX>

- Mills, S., Ross, R. P., y Hill, C. (2017). Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S129–S153. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX022>
- Montso, P. K., Mlambo, V., Ateba, C. N. (2019). Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting Multidrug-Resistant Shiga Toxigenic Atypical *Escherichia coli* O177 Strains Isolated from Cattle Feces. *Frontiers in Public Health*, 7. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2019.00355>
- Moye, Z. D., Woolston, J., y Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage applications for food production and processing. En *Viruses* (Vol. 10, Número 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Munir, M. T., Mtimet, N., Guillier, L., Meurens, F., Fravalo, P., Federighi, M., y Kooh, P. (2023). Physical Treatments to Control *Clostridium botulinum* Hazards in Food. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/FOODS12081580>
- Musa Yahaya, S., Ahmad Mahmud, A., y Abdu, N. (2023). The use of wastewater for irrigation: Pros and cons for human health in developing countries. *Total Environment Research Themes*, 6, 100044. <https://doi.org/10.1016/J.TOTERT.2023.100044>
- Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., y Aatif, M. (2023). Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/PH16111615>
- Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., Maltese, P. E., Cristofoli, F., Antoni, L. De, Beccari, T., Dundar, M., y Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial

- populations. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 91(Suppl 13), 1–13.
<https://doi.org/10.23750/ABM.V91I13-S.10819>
- Osman, A. H., Kotey, F. C. N., Odoom, A., Darkwah, S., Yeboah, R. K., Dayie, N. T. K. D., y Donkor, E. S. (2023). The Potential of Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy in Treating Infections with Multidrug-Resistant Bacteria. En *Antibiotics* (Vol. 12, Número 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12081329>
- Padilla Medina, J. A. (2022). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O129 multidrogoresistente, y evaluación del potencial biotecnológico de un bacteriófago como agente de control [Tesis de licenciatura]. Culiacán, Sin. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Pakbin, B., Brück, W. M., y Rossen, J. W. A. (2021). Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Petsong, K., Benjakul, S., y Vongkamjan, K. (2019). Evaluation of storage conditions and efficiency of a novel microencapsulated *Salmonella* phage cocktail for controlling *S. enteritidis* and *S. typhimurium in-vitro* and in fresh foods. *Food Microbiology*, 83, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.008>
- Pinto, G., Shetty, S. A., Zoetendal, E. G., Gonçalves, R. F. S., Pinheiro, A. C., Almeida, C., Azeredo, J., y Smidt, H. (2022). An in vitro fermentation model to study the impact of bacteriophages targeting Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* on the colonic

microbiota. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41522-022-00334-8>

Pires, J., Santos, R., y Monteiro, S. (2023). Antibiotic resistance genes in bacteriophages from wastewater treatment plant and hospital wastewaters. *Science of The Total Environment*, 892, 164708. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.164708>

Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., y Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.ARBA-0026-2017>

Pouillot, F., Chomton, M., Blois, H., Courroux, C., Noelig, J., Bidet, P., Bingen, E., y Bonacorsi, S. (2012). Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b: H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7), 3568–3575. <https://doi.org/10.1128/AAC.06330-11>

Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, M. F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, V., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D. V., Khedkar, G. D., Raposo, A., Han, H., y Puniya, A. K. (2024). Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain. En *npj Science of Food* (Vol. 8, Número 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41538-023-00245-8>

Rather, I. A., Koh, W. Y., Paek, W. K., y Lim, J. (2017). The sources of chemical contaminants in food and their health implications. En *Frontiers in Pharmacology*

Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47–56.
www.pelagiaresearchlibrary.com

Reina, J., yReina, N. (2018). Fagoterapia ¿una alternativa a la antibioticoterapia? *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 101. [/pmc/articles/PMC6159377/](https://doi.org/10.1016/j.rpe.2018.02.001)

Rendueles, C., Duarte, A. C., Escobedo, S., Fernández, L., Rodríguez, A., García, P., y Martínez, B. (2022). Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 368. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611>

Ríos-Tobón, S., Agudelo-Cadavid, R. M., y Gutiérrez-Builes, L. A. (2017). Pathogens and microbiological indicators of the quality of water for human consumption. En *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* (Vol. 35, Número 2, pp. 236–247). Universidad de Antioquia. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08>

Rogovski, P., Cadamuro, R. D., da Silva, R., de Souza, E. B., Bonatto, C., Viancelli, A., Michelon, W., Elmahdy, E. M., Treichel, H., Rodríguez-Lázaro, D., y Fongaro, G. (2021). Uses of Bacteriophages as Bacterial Control Tools and Environmental Safety Indicators. *Frontiers in Microbiology*, 12, 793135. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.793135/BIBTEX>

Sachs, J. D., Schmidt-Traub, G., Mazzucato, M., Messner, D., Nakicenovic, N., yRockström, J. (2019). Six Transformations to achieve the Sustainable

- Development Goals. *Nature Sustainability* 2019 2:9, 2(9), 805–814.
<https://doi.org/10.1038/s41893-019-0352-9>
- Sadeqi, S., Shahraki, A. H., Nikkhahi, F., Javadi, A., y Marashi, S. M. A. (2022). Application of bacteriophage cocktails for reducing the bacterial load of nosocomial pathogens in hospital wastewater. *Iranian Journal of Microbiology*, 14(3), 395.
<https://doi.org/10.18502/IJM.V14I3.9782>
- Sanchez-Rosario, R., Garcia, J., Rodriguez, V., Schug, K. A., Hildenbrand, Z. L., y Bernal, R. A. (2024). Using Bacteriophages to Treat Resilient Bacteria Found in Produced Water. *Water (Switzerland)*, 16(6), 797. <https://doi.org/10.3390/W16060797/S1>
- Sarker, S. A., McCallin, S., Barretto, C., Berger, B., Pittet, A. C., Sultana, S., Krause, L., Huq, S., Bibiloni, R., Bruttin, A., Reuteler, G., y Brüssow, H. (2012). Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology*, 434(2), 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.002>
- Sato, T., Sulistyani, H., Kamaguchi, A., Miyakawa, H., y Nakazawa, F. (2013). Hemolysin of *Prevotella oris*: Purification and characteristics. *Journal of Oral Biosciences*, 55(3), 149–154. <https://doi.org/10.1016/J.JOB.2013.04.002>
- Sattar, S., Bailie, M., Yaqoob, A., Khanum, S., Fatima, K., Altaf, A. U. R. Bin, Ahmed, I., Shah, S. T. A., Munawar, J., Zehra, Q. A., Daud, S., Arshad, A., Imdad, K., Javed, S., Tariq, A., Bostan, N., y Altermann, E. (2023). Characterization of two novel lytic bacteriophages having lysis potential against MDR avian pathogenic *Escherichia coli* strains of zoonotic potential. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-37176-z>

- Shah, M., Taylor, V. L., Bona, D., Tsao, Y., Stanley, S. Y., Pimentel-Elardo, S. M., McCallum, M., Bondy-Denomy, J., Howell, P. L., Nodwell, J. R., Davidson, A. R., Moraes, T. F., y Maxwell, K. L. (2021). A phage-encoded anti-activator inhibits *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Cell*, *81*(3), 571-583.e6. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.12.011>
- Shang, J., Peng, C., Liao, H., Tang, X., y Sun, Y. (2023). PhaBOX: A web server for identifying and characterizing phage contigs in metagenomic data. *Bioinformatics Advances*, *3*(1). <https://doi.org/10.1093/bioadv/vbad101>
- Sharma, H., Tal, R., Clark, N. A., y Segars, J. H. (2014). Microbiota and pelvic inflammatory disease. *Seminars in Reproductive Medicine*, *32*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1055/S-0033-1361822/ID/JR00857-22/BIB>
- Shin, E. J., Lee, S. J., Jeong, H. J., yLee, J. H. (2024). Development of a novel serogrouping method for the rapid detection of 21 *Escherichia coli* O-serotypes using multiplex real-time PCR. *Food Control*, *157*, 110171. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.110171>
- Sillankorva, S., Oliveira, D., Moura, A., Henriques, M., Faustino, A., Nicolau, A., y Azeredo, J. (2011). Efficacy of a broad host range lytic bacteriophage against *E. coli* adhered to urothelium. *Current microbiology*, *62*(4), 1128–1132. <https://doi.org/10.1007/S00284-010-9834-8>
- Śliwka, P., Mituła, P., Mituła, A., Skaradziński, G., Choińska-Pulit, A., Niezgoda, N., Weber-Dąbrowska, B., Żaczek, M., y Skaradzińska, A. (2019). Encapsulation of bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry microspheres and survival in simulated

gastrointestinal conditions. *LWT*, 99, 238–243.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.043>

Song, J., Ruan, H., Chen, L., Jin, Y., Zheng, J., Wu, R., y Sun, D. (2021). Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC Microbiology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02117-1>

Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., y Zecconi, A. (2021). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10111355>

Tahden, M., Manitz, J., Baumgardt, K., Fell, G., Kneib, T., yHegasy, G. (2016). Epidemiological and Ecological Characterization of the EHEC O104:H4 Outbreak in Hamburg, Germany, 2011. *PLoS ONE*, 11(10), e0164508.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0164508>

Tang, Z., Tang, N., Wang, X., Ren, H., Zhang, C., Zou, L., Han, L., Guo, L., y Liu, W. (2023). Characterization of a lytic *Escherichia coli* phage CE1 and its potential use in therapy against avian pathogenic *Escherichia coli* infections.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1091442>

Thung, T. Y., Krishanthi Jayarukshi Kumari Premarathne, J. M., San Chang, W., Loo, Y. Y., Chin, Y. Z., Kuan, C. H., Tan, C. W., Basri, D. F., Jasimah Wan Mohamed Radzi, C. W., y Radu, S. (2017). Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella Enteritidis* in retail food. *LWT*, 78, 222–225. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.12.044>

- van Dalen, R., Peschel, A., y van Sorge, N. M. (2020). Wall Teichoic Acid in *Staphylococcus aureus* Host Interaction. En *Trends in Microbiology* (Vol. 28, Número 12, pp. 985–998). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.017>
- Vikram, A., Tokman, J. I., Woolston, J., y Sulakvelidze, A. (2020). Phage Biocontrol Improves Food Safety by Significantly Reducing the Level and Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Various Foods. *Journal of food protection*, 83(4), 668–676. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-433>
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., y Lesterlin, C. (2020). Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes*, 11(11), 1239. <https://doi.org/10.3390/GENES11111239>
- Walsh, J., y Johnson, S. (1996). Genetics. *Principles and Practice in Ophthalmic Assisting: A Comprehensive Textbook*, 459–472. <https://doi.org/10.1201/9781003525899-28>
- Wang, S., Zhao, S., Zhou, Y., Jin, S., Ye, T., y Pan, X. (2023). Original research: Antibiotic resistance spectrum of *E. coli* strains from different samples and age-grouped patients: a 10-year retrospective study. *BMJ Open*, 13(4), 67490. <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2022-067490>
- Wdowiak, M., Paczesny, J., y Raza, S. (2022). Enhancing the Stability of Bacteriophages Using Physical, Chemical, and Nano-Based Approaches: A Review. En *Pharmaceutics* (Vol. 14, Número 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091936>
- Wei, B., Cong, C., Zheng, L., Chen, L., y Yan, X. (2023). Isolation, characterization and whole genome analysis of the novel genus *Lederbergvirus*, phage vB_EcoP_E212

- infecting enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Virus Research*, 331, 199125.
<https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2023.199125>
- Xiao, T., Zhu, X., Wang, W., Jia, X., Guo, C., Wang, X., y Hao, Z. (2023). A novel lytic bacteriophage against colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from different animals. *Virus Research*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199090>
- Xing, Y., Clark, J. R., Chang, J. D., Chirman, D. M., Green, S., Zulk, J. J., Jelinski, J., Patras, K. A., y Maresso, A. W. (2023). Broad protective vaccination against systemic *Escherichia coli* with autotransporter antigens. *PLOS Pathogens*, 19(2).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1011082>
- Yehl, K., Lemire, S., Yang, A. C., Ando, H., Mimee, M., Torres, M. D. T., de la Fuente-Nunez, C., y Lu, T. K. (2019). Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell*, 179(2), 459-469.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.09.015/ATTACHMENT/3C800350-B48C-4475-BFD6-C555C20A7956/MMC2.XLSX>
- Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., y Qimron, U. (2015). Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(23), 7267–7272.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1500107112/SUPPL_FILE/PNAS.201500107SI.PDF
- Yuvaraj, D., Iyyappan, J., Gnanasekaran, R., Ishwarya, G., Harshini, R. P., Dhithya, V., Chandran, M., Kanishka, V., y Gomathi, K. (2021). Advances in bio food packaging – An overview. *Heliyon*, 7(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07998>

Zhou, C., Zhu, M., Wang, Y., Yang, Z., Ye, M., Wu, L., Bao, H., Pang, M., Zhou, Y., Wang, R., Sun, L., Wang, H., Zheng, C., y Zhang, H. (2020). Broad host range phage vB-LmoM-SH3-3 reduces the risk of *Listeria* contamination in two types of ready-to-eat food. *Food Control*, 108, 106830. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106830>

Zhou, Y., Wan, Q., Bao, H., Guo, Y., Zhu, S., Zhang, H., Pang, M., y Wang, R. (2022). Application of a novel lytic phage vB_EcoM_SQ17 for the biocontrol of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Enterotoxigenic E. coli in food matrices. *Frontiers in Microbiology*, 13, 929005. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.929005/BIBTEX>

XI. ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxirribonucleíco.

ARN = Ácido ribonucleíco.

ARNr = Ácido ribonucleico ribosomal.

ARNt = Ácido ribonucleico de transferencia.

BLAST = Herramienta básica de búsqueda de alineación local (Basic Local Alignment Search Tool).

CCR: Cáncer colorrectal.

CDC = Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention).

CDS = Región de codificación (Coding Sequence).

CLSI = Comité Internacional de Normas de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute).

DGVES = Dirección General de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud.

DO = Densidad óptica.

ECEA = *Escherichia coli* enteroagregativas.

ECEH = *Escherichia coli* enterohemorrágicas.

ECEI = *Escherichia coli* enteroinvasiva.

ECEP = *Escherichia coli* enteropatogénicas.

ECET = *Escherichia coli* enterotoxigénica.

ECPEx = *Escherichia coli* patogénicas extraintestinales.

FAO = La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization).

FDA = Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration).

MOI = Multiplicidad de infección óptima.

NCBI = Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information).

OMS = Organización Mundial de la Salud.

ONU = Organización de las Naciones Unidas.

ORF = Marco de lectura abierto (Open Reading Frames).

PATRIC = Centro de integración de recursos de sistemas patógenos (Pathosystems Resource Integration Center).

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLPs = Los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (Restriction Fragment Length Polymorphism).

TSA = Agar soya tripticaseína.

TSB = Caldo soya tripticaseína.

UFC = Unidades formadoras de colonia.

UFP = Unidades formadoras de placa.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Genes identificados en el genoma de FEco-32 con ayuda de BLAST de NCBI.

También se muestran los promotores y terminadores encontrados. Se muestra el porcentaje de cobertura, valor de error y porcentaje de identidad de cada uno de los genes identificados.

ORF	Inicio	Fin	Tamaño del fragmento	Score	Cadena	BLAST de NCBI		
						Descripción	Valor de error	Porcentaje de identidad
1	<2	313	312		+	Proteína hipotética	3.00E-71	99.03%
Promotor 1	310	338		0.968	+			
2	362	562	201		+	Antitoxina	2.00E-39	98.46%
3	564	1190	627		+	Subunidad pequeña de la terminasa	2.00E-145	94.71%
4	1174	2574	1401		+	Subunidad grande de la terminasa	0	98.71%
Promotor 2	1271	1296		0.578	+			
5	2697	3968	1272		+	Proteína hipotética	0	98.11%
6	3968	4441	474		+	Proteína hipotética	8.00E-102	96.18%
7	4455	5483	1029		+	Proteína principal de la cápside	0	99.42%
8	5486	5668	183		+	Proteína hipotética	3.00E-34	98.33%
Terminador 1	5691	5708						
9	5726	6115	390		+	Adaptador de cabeza a cola	2.00E-80	92.25%
10	6105	6587	483		+	Proteína de morfogénesis del virión	2.00E-111	96.25%
11	6587	6952	366		+	Proteína menor de la cápside	5.00E-80	95.87%
12	6949	7476	528		+	Proteína hipotética	8.00E-123	95.98%

						(posible tail-completion protein)		
13	7527	8999	1473		+	Proteína de la vaina de la cola	0	95.71%
14	9002	9415	414		+	Proteína hipotética	7.00E-94	97.81%
Terminador 2	9423	9436						
Promotor 3	9465	9472		0.987	+			
15	9510	9773	264		+	Proteína hipotética (Posible polimerasa)	2.00E-56	100.00%
16	9790	10089	300		+	Proteína contenedora de dominio TM2 (Posible polimerasa)	3.00E-64	95.96%
Promotor 4	10086	10112		0.574	+			
17	10086	10715	630		+	Proteína Eac	5.00E-128	86.63%
18	10719	10964	246		+	Proteína que contiene el dominio DUF551	3.00E-45	85.19%
Terminador 3	10965	10978						
Promotor 5	10980	11009		0.648	+			
Promotor 6	10983	11009		0.781				
19	11037	11381	345		+	Proteína chaperona de ensamblaje de cola	8.00E-75	97.37%
20	11420	11578	159		+	Proteína hipotética	8.00E-30	100.00%
21	11578	13086	1509		+	Cinta métrica de cola	0	86.82%
22	13086	13754	669		+	Proteína hipotética	2.00E-149	93.24%
23	13764	14153	390		+	Proteína hipotética	4.00E-87	97.67%
24	14150	15100	951		+	Proteína de cola	0	98.42%
25	15090	15788	699		+	Proteína de la placa base	8.00E-162	96.55%
26	15785	16213	429		+	Proteína hipotética	3.00E-91	95.07%

27	16222	18213	1992		+	Proteína de la espiga de la cola del fago (BRP)	0	67.97%
28	18364	19530	1167		+	Proteína de cuña de placa base	0	96.38%
29	19527	20177	651		+	Proteína hipotética	2.00E-148	97.22%
30	20189	21019	831		+	Proteína hipotética	1.00E-13	42.22%
31	21019	21408	390		+	Proteína de ensamblaje de fibra de cola / Chaperona de ensamblaje de cola	3.00E-17	48.81%
Promotor 7	21025	21032		0.932	+			
Promotor 8	21456	21463		0.774	+			
Terminador 4	21561	21584						
ORF 32	21590	22282	693		-	Exonucleasa	2.00E-151	90.27%
ORF 33	22275	22595	321		-	Endonucleasa HNH	1.00E-30	51.89%
ORF 34	22703	22894	192		-	Endonucleasa HNH	2.00E-04	47.17%
35	22894	23841	948		-	Recombinasa RecT	0	98.41%
36	23844	24089	246		-	Proteína hipotética	3.00E-45	86.42%
37	24089	24298	210		-	Proteína hipotética	4.00E-42	100.00%
38	24295	24990	696		-	Endonucleasa HNH	1.00E-59	44.17%
39	25020	25445	426		-	ARNt endonucleasa	1.00E-95	95.74%
40	25442	27190	1749		-	Helicasa dependiente de NTP	0	50.91%
Promotor 9	27212	27240		0.93	+			
41	27252	28856	1605		-	Helicasa de ADN replicativo	0	97.94%
42	28911	29147	237		-	Proteína hipotética	7.00E-43	88.46%
43	29144	29395	252		-	Proteína hipotética	1.00E-23	58.24%

44	29559	29834	276		-	Proteína hipotética	1.00E-48	97.47%
Promotor 10	29889	29917		0.972	+			
Promotor 11	30015	30043		0.973	+			
Promotor 12	30077	30105		0.988	+			
45	30272	30676	405		-	Proteína hipotética	3.00E-88	94.03%
Promotor 13	30565	30592		0.576	+			
46	30673	31149	477		-	Proteína que contiene el dominio DUF551	5.00E-86	88.11%
47	31146	31673	528		-	Proteína hipotética	1.00E-44	54.19%
48	31741	31917	177		-	Proteína que contiene dominio DUF2737	3.00E-31	94.83%
49	31907	32053	147		-	Proteína hipotética	6.00E-25	95.83%
50	32046	32210	165		-	ATPasa de la familia AAA	1.00E-28	94.44%
Promotor 14	32176	32204		0.974	+			
51	32236	32601	366		+	Proteína de fagos de la familia NinX	4.00E-35	54.92%
52	32598	32729	132		+	Proteína hipotética	3.00E-20	95.35%
53	32853	33170	318		-	Proteína hipotética	3.00E-67	95.24%
54	33295	33774	480		-	Proteína de unión al ADN monocatenario	5.00E-91	91.19%
55	33880	34554	675		-	Endonucleasa HNH	6.00E-37	49.24%
56	34565	34801	237		-	Proteína que contiene dominio DUF3310	7.00E-46	96.15%
Promotor 15	33779	33811		0.845	+	-	-	-
Promotor 16	34035	34063		0.528	+	Proteína hipotética	-	-
Promotor 17	34782	34811		0.714	+	-	-	-
57	34801	35463	663		-	Antitoxina	6.00E-73	59.81%

58	35460	35915	456		-	Subunidad pequeña de la terminasa	3.00E-18	70.00%
Promotor 18	36026	36054		0.714	+	Subunidad grande de la terminasa	-	-
59	36146	36706	561		+		3.00E-125	95.70%
Promotor 19	36684	36710		0.585	+	Proteína hipotética		
60	36775	36999	225		+	Proteína hipotética	1.00E-44	98.65%
61	37152	37271	120		+	Proteína principal de la cápside		
62	37258	37521	264		+	Proteína hipotética	3.00E-08	39.76%
Promotor 20	38082	38107		0.698	+			
63	38226	39608	1383		+	Adaptador de cabeza a cola	0	98.91%
64	40147	40287	141		+	Proteína de morfogénesis del virión	4.00E-25	100.00%

Anexo 2. Genes identificados en el genoma del bacteriófago Feco-59 con la ayuda de BLAST de NCBI. Se muestra el porcentaje de cobertura, valor de error y porcentaje de identidad de cada uno de los genes identificados.

ORF	Inicio	Fin	Longitud del gen	Cadena	BLAST de NCBI			
					Descripción	Porcentaje de cobertura	Valor de error	Porcentaje de identidad
1	25	189	165	+	Proteína que contiene el dominio principal de la cápside [<i>Escherichia</i> phage teqsoen]	76%	1.00E-20	100.00%
2	192	1220	1029	+	ADN primasa [Fago de <i>Yersinia</i> fps-90]	99%	0	99.71%
3	1217	1417	201	-	Proteína hipotética [<i>Enterobacteriaceae</i>]	98%	6.00E-37	100.00%
4	1489	2007	519	+	Dctp pirofosfatasa [<i>Escherichia coli</i>]	99%	7.00E-126	100.00%
5	2007	2201	195	+	Proteína estructural del virión [Fago de <i>Escherichia</i> UFV-AREG1]	98%	3.00E-37	100.00%
6	2198	2407	210	+	Proteína de la cabeza [Fago de <i>Shigella</i> SHBML-50-1]	98%	9.00E-43	98.55%
7	2424	2669	246	+	Proteína estructural del virión [Fago <i>Shigella</i> Shf12]	98%	1.00E-52	100.00%
8	2766	2972	207	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	98%	6.00E-43	100.00%
9	2972	3313	342	+	Proteína hipotética RB27_028 [Fago de enterobacterias RB27]	82%	7.00E-31	100.00%
10	3322	3807	486	+	Modulador de transcripción de fagos Mrh o Srh (ACLAME 1277) [<i>Escherichia</i> phage T4_ev151]	99%	4.00E-108	97.52%
11	3782	3985	204	+	Señuelo del huésped sigma32 [Fago de <i>Escherichia</i> RB14]	98%	3.00E-39	100.00%

12	3982	4146	165	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	98%	5.00E-15	98.15%
13	4139	4609	471	+	Proteína hipotética ECO07P2_00203 [fago de <i>Escherichia</i> ECO07P2]	99%	2.00E-109	99.36%
14	4618	4800	183	+	Proteína hipotética RB51ORF023 [Fago de enterobacterias RB51]	98%	7.00E-36	100.00%
15	4868	5491	624	+	ARN polimerasa ADP- ribosilasa [ligadura de fago de <i>Escherichia</i> 14]	99%	1.00E-150	100.00%
16	5488	6090	603	+	ARN polimerasa ADP- ribosilasa [Ligadura de fago de <i>Escherichia</i> 07]	99%	2.00E-146	99.00%
17	6216	6962	747	+	Srd factor anti-sigma de [Fago de enterobacterias Kha5h]	99%	2.00E-175	99.19%
18	6964	7275	312	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	99%	2.00E-68	99.03%
19	7272	8591	1320	+	Proteína contenedora de dominio SH3 [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	0	100.00%
20	8598	8858	261	+	Proteína hipotética RB51ORF017 [Fago de enterobacterias RB51]	98%	6.00E-54	100.00%
21	8845	9090	246	+	Dextranasa [<i>Escherichia coli</i>]	98%	3.00E-49	100.00%
22	9083	9325	243	+	Exonucleasa [Fago de <i>Escherichia</i> HP3]	98%	2.00E-48	97.50%
23	9325	10008	684	+	Exoribonucleasa 3'-5' [<i>Escherichia coli</i>]	99%	3.00E-167	100.00%
24	10072	10575	504	+	Hipotética proteína KMB94_gp111 de [Fago de enterobacterias Aplg8]	99%	2.00E-121	100.00%
25	10588	11082	495	+	Regulador transcripcional [<i>Escherichia</i> phage vb_Eco_F27]	99%	3.00E-115	97.56%

26	11155	11628	474	+	Regulador transcripcional tipo motb [Escherichia phage teqhad]	99%	7.00E-100	100.00%
27	11638	12057	420	+	Regulador transcripcional tipo motb [Fago de enterobacterias gizh]	99%	9.00E-96	99.28%
28	12164	12433	270	+	Hipotética proteína JLBYU31_21 [fago de Escherichia JLBYU31]	98%	1.00E-58	100.00%
29	12447	12662	216	+	Modificador de arnt supresores [Fago de Escherichia REP1]	98%	4.00E-44	100.00%
30	12662	13075	414	+	Proteína hipotética [Fago de Escherichia REP1]	99%	2.00E-96	100.00%
31	13078	13254	177	+	Regulador transcripcional similar a fmdb [Fago de Yersinia fps-90]	98%	1.00E-31	94.83%
32	13257	13517	261	+	Lipoproteína putativa [Escherichia phage JLBYU31]	98%	2.00E-56	100.00%
33	13587	15404	1818	+	Subunidad de ADN topoisomerasa atpasa dependiente de ADN [Fago de Escherichia Ec_MI-02]	99%	0	99.83%
34	15459	15662	204	+	Inhibidor de la lisis del fagos riia [Escherichia phage vb_Eco_QOTSP]	98%	3.00E-39	98.51%
35	15673	17850	2178	+	Inhibidor de lisis RIIA [Escherichia phage vb_ecom_Ozark]	99%	0	99.86%
36	17862	18800	939	+	Inhibidor de lisis RIIB [Fago de enterobacterias Kha5h]	99%	0	99.68%
37	18829	19023	195	+	Proteína hipotética KMC02_gp221 [Fago de Escherichia ecnp1]	98%	2.00E-36	98.44%
38	19088	19645	558	+	ADN endonucleasa IV similar a denb [fago de Escherichia vb_ecom-G28]	99%	3.00E-136	99.46%

39	19726	19932	207	+	Proteína hipotética [fago de <i>Escherichia</i> ZCEC14]	98%	9.00E-28	98.53%
40	19938	20201	264	+	Proteína hipotética PHAGINATOR_273 [<i>Shigella</i> phage vb_sbom_Phaginator]	98%	2.00E-57	100.00%
41	20281	20379	99	+	Hipotética proteína PHAGINATOR_271 [<i>Shigella</i> phage vb_sbom_Phaginator]	69%	2.00E-06	95.65%
42	20445	20558	114	+	Hipotética proteína PHAGINATOR_271 [<i>Shigella</i> phage vb_sbom_Phaginator]	69%	2.00E-06	95.65%
43	20566	20763	198	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	98%	5.00E-38	98.46%
44	20763	20870	108	+	Naftaleno 1,2-dioxigenasa [Fago de <i>Escherichia</i> AR1]	97%	9.00E-15	97.14%
45	20879	21094	216	+	Naftaleno 1,2-dioxigenasa [<i>Escherichia coli</i>]	98%	8.00E-44	100.00%
46	21154	21612	459	+	Proteína de disrupción de nucleoides [Fago de <i>Yersinia</i> pyps32t]	99%	3.00E-108	98.68%
47	21700	21858	159	+	Proteína de resistencia a la acridina [<i>Escherichia</i> phage vb_ecom_SA21RB]	98%	6.00E-27	98.08%
48	21996	23324	1329	+	ADN topoisomerasa II [fago de <i>Escherichia</i> wv7]	99%	0	100.00%
49	23321	23470	150	+	Proteína motora flagelar mota [Fago de enterobacterias RB51]	98%	3.00E-08	97.96%
50	23602	24237	636	+	Activador similar a mota de la transcripción del periodo medio [<i>Shigella</i> phage pss-1]	99%	2.00E-135	99.05%
51	24248	24577	330	+	Proteína hipotética [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_SCS4]	99%	7.00E-75	99.08%
52	24574	25035	462	+	Nucleasa antirrestrictiva [Fago <i>Shigella</i> SHFML-11]	99%	7.00E-110	98.69%

53	25035	25331	297	+	Nucleasa antirrestrictiva [<i>Escherichia</i> phage vb_Eco_F26]	98%	1.00E-64	97.96%
54	25508	25627	120	+	Proteína hipotética RB32ORF249c [Fago de enterobacterias RB51]	97%	3.00E-17	100.00%
55	25617	25895	279	+	Inhibidor de la restricción de mrcbc [Fago de <i>Escherichia</i> RB14]	98%	4.00E-45	98.91%
56	25892	26044	153	+	Proteína hipotética KMC10_gp164 [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_G4498]	98%	8.00E-26	100.00%
57	26057	26329	273	+	Proteína asia anti-sigma 70 [<i>Escherichia coli</i>]	98%	1.00E-56	100.00%
58	26330	26986	657	-	Holin [Insulto de fago de <i>Escherichia</i> 07]	99%	6.00E-161	100.00%
59	27018	27803	786	-	Proteína de fibra de cola; especificidad del huésped [Enterobacteria phage vb_ecom_IME339]	99%	4.00E-121	99.23%
60	27834	31733	3900	-	Proteína que contiene el dominio de la fibra de la cola [<i>Escherichia coli</i>]	99%	0	99.85%
61	31742	32404	663	-	Conector de bisagra de conector distal de proteína de fibra de cola larga [<i>Escherichia</i> phage slur02]	99%	6.00E-157	99.55%
62	32467	33582	1116	-	Conector proximal de proteína de fibra de cola larga [Fago <i>Citrobacter</i> phizz23]	99%	0	99.73%
63	33591	37460	3870	-	Subunidad proximal de la proteína de la fibra de cola [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom-UFV13]	99%	0	98.84%

64	37565	38482	918	+	Rnaseh [Fago de <i>Escherichia</i> RB14]	99%	0	100.00%
65	38491	38760	270	+	Proteína de unión al ADN bicatenario [<i>Enterobacteriaceae</i>]	98%	2.00E-55	100.00%
66	38738	39076	339	+	Proteína accesorio de transcripción del promotor tardío [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	8.00E-60	99.11%
67	39073	39726	654	+	Cargador de ADN helicasa [Fago de enterobacterias RB51]	99%	2.00E-154	100.00%
68	39826	40734	909	+	Proteína de unión al ADN monocatenario [Fago <i>Shigella</i> Sf22]	91%	0	100.00%
69	40877	41104	228	+	Proteína hipotética CPTSV76_036 [Fago de enterobacterias SV76]	98%	7.00E-47	100.00%
70	41152	41538	387	+	Hipotética proteína KMC13_gp080 [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_IME537]	99%	2.00E-83	96.88%
71	41677	41919	243	+	DUF5417 proteína que contiene el dominio [Fago <i>Escherichia</i> T2]	98%	2.00E-50	97.50%
72	41930	42262	333	+	ADN adenina metiltransferasa [fago de <i>Escherichia</i> Killian]	99%	1.00E-72	98.18%
73	42274	42519	246	+	Proteína hipotética [<i>Sallmonella</i> enterica]	98%	4.00E-51	100.00%
74	42519	43133	615	+	Dihidrofolato reductasa [fago de <i>Escherichia</i> RB14]	99%	3.00E-139	100.00%
75	43123	43470	348	+	Dihidrofolato reductasa [<i>Sallmonella</i> enterica]	99%	3.00E-78	99.13%
76	43515	44375	861	+	Timidilato sintasa [<i>Escherichia</i> phage slur07]	99%	0	100.00%
77	44372	44635	264	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	98%	7.00E-56	98.85%
78	44628	44915	288	+	DUF4326 proteína que contiene dominio [<i>Escherichia coli</i>]	98%	3.00E-64	100.00%
79	44906	47170	2265	+	Clase 1a ribonucleósido-difosfato reductasa	99%	0	100.00%

					subunidad alfa [<i>Escherichia coli</i>]			
80	47222	48400	1179	+	Ribonucleótido reductasa clase la beta subunidad [Escherichia phage slur07]	99%	0	99.74%
81	48428	48838	411	+	Endonucleasa II [Enterobacteriaceae]	99%	3.00E-94	99.26%
82	48891	50015	1125	+	Catalizador de unión de proteínas de ARN ligasa y fibra de cola [Escherichia phage teqhad]	99%	0	99.73%
83	50080	50583	504	+	Inhibidor de la transcripción del huésped [Escherichia phage slur02]	99%	1.00E-120	100.00%
84	50574	50927	354	+	Spanna tipo Rz [Fago de Escherichia ECML-134]	99%	4.00E-27	99.15%
85	50924	51223	300	+	Lipoproteína de membrana externa Rz1 [Fago de Escherichia GADU22]	99%	3.00E-66	98.99%
86	51220	51450	231	+	Proteína hipotética [Escherichia coli]	98%	1.00E-48	100.00%
87	51447	51749	303	+	Proteína hipotética KMB95_gp027 [Fago de enterobacterias gizh]	99%	2.00E-55	99.00%
88	51746	52654	909	+	Polinucleótido quinasa [Escherichia phage YUEEL01]	99%	0	99.34%
89	52654	52851	198	+	Proteína hipotética bas38_0056 [Fago de Escherichia augustsocin]	98%	4.00E-40	100.00%
90	52844	53044	201	+	Proteína hipotética KMC11_gp193 [fago de Escherichia vb_ecom_G4507]	98%	7.00E-38	96.97%
91	53047	53322	276	+	Proteína hipotética [Escherichia coli]	98%	1.00E-58	100.00%
92	53385	53621	237	+	Proteína hipotética KMC19_gp192 [fago de Escherichia vb_ecom_Ozark]	98%	2.00E-47	98.72%

93	53618	53956	339	+	Proteína hipotética [fago de <i>Yersinia</i> PST]	99%	2.00E-75	100.00%
94	53953	54534	582	+	Desaminasa [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	1.00E-140	100.00%
95	54534	54770	237	+	Proteína de fibras de cola [Fago de <i>Escherichia</i> 4E10]	98%	4.00E-48	97.44%
96	54771	55079	309	+	SH3 proteína que contiene pliegues de barril beta [<i>Shigella</i> phage pss-1]	99%	7.00E-67	100.00%
97	55136	55471	336	+	Proteína de la familia groes [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	9.00E-73	100.00%
98	55619	55867	249	+	Inhibición de la lisis; proteína accesoria [<i>Escherichia</i> phage teqdros]	98%	8.00E-51	98.78%
99	55988	56164	177	+	Proteína hipotética KMC07_gp201 [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_G8]	74%	2.00E-21	100.00%
100	56275	56607	333	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	99%	2.00E-73	100.00%
101	56676	57041	366	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	99%	2.00E-84	98.35%
102	57083	57370	288	+	Proteína hipotética Shfl2p207 [fago <i>Shigella</i> Shfl2]	98%	4.00E-64	100.00%
103	57370	57567	198	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	98%	1.00E-37	100.00%
104	57564	57770	207	+	Proteína hipotética F412_gp073 [Fago de <i>Escherichia</i> wv7]	98%	1.00E-41	98.53%
105	57763	58221	459	+	Proteína central prohead [Fago de <i>Escherichia</i> BW-1]	99%	2.00E-106	98.68%
106	58218	59078	861	+	Proteína hipotética [Fago de <i>Escherichia</i> REP1]	99%	0	100.00%
107	59078	59347	270	+	DUF3045 proteína que contiene dominio [<i>Escherichia coli</i>]	98%	4.00E-60	100.00%
108	59344	60864	1521	+	ADN ligasa [Fago de enterobacterias RB51]	99%	0	96.05%
109	60861	61049	189	+	Proteína que interactúa con	98%	1.00E-35	95.16%

					sideróforos [Fago de enterobacterias T6]			
110	61102	63195	2094	+	ADP-ribosiltransferasa [<i>Shigella sonnei</i>]	99%	0	99.86%
111	63199	65256	2058	+	ARN polimerasa similar a Alt ADP-ribosiltransferasa [fago de <i>Escherichia</i> REP1]	99%	0	99.27%
112	65317	65607	291	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	98%	7.00E-59	98.96%
113	65636	66601	966	-	Proteína iniciadora del tubo de cola de la placa base [<i>Escherichia</i> phage augustsocin]	99%	0	99.07%
114	66601	67695	1095	-	Tapa del tubo de cola de la placa base [<i>Shigella</i> phage esh24]	99%	0	99.18%
115	67704	69476	1773	-	Subunidad de cubo de placa base y longitud de la cola [<i>Escherichia</i> phage REP1]	99%	0	100.00%
116	69473	70006	534	-	Subunidad distal del cubo de la placa base [Fago de <i>Escherichia</i> T4]	88%	9.00E-110	100.00%
117	69954	71126	1173	-	Cubo de placa base [Fago <i>Shigella</i> SHFML-11]	99%	0	100.00%
118	71123	71875	753	-	Proteína de ensamblaje de cubo de placa base [<i>Escherichia coli</i>]	99%	0	99.60%
119	71926	72552	627	+	Cubo de placa base [Fago de <i>Escherichia</i> ECML-134]	99%	5.00E-150	99.52%
120	72552	72950	399	+	Subunidad de cuña de placa base [<i>Escherichia</i> phage slur02]	99%	1.00E-89	100.00%
121	73017	73430	414	+	Proteína mediadora de recombinación uvsy [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	2.00E-93	100.00%
122	73430	73654	225	+	Proteína hipotética D862_gp090 [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_ACG-C40]	98%	2.00E-46	100.00%
123	73683	73850	168	+	DUF2685 proteína contenedora de	71%	6.00E-20	100.00%

					dominio [<i>Enterobacteriaceae</i>]			
124	73906	74136	231	-	ADN helicasa dependiente de ATP uvsw [<i>Escherichia coli</i>]	81%	8.00E-36	100.00%
125	74162	75673	1512	-	Proteína de la familia helicasa de caja DEAD/DEAH [<i>Escherichia coli</i>]	99%	0	100.00%
126	75724	76404	681	+	Inhibidor de la proteína de la proteasa [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_ACG-C40]	99%	3.00E-150	99.12%
127	76414	77832	1419	+	Decoración de cabeza tipo hoc [<i>Escherichia</i> phage teqskov]	99%	0	96.82%
128	77951	78136	186	+	DUF2774 proteína que contiene el dominio [<i>Escherichia</i> phage vb_ecom_112]	98%	7.00E-35	100.00%
129	78123	78401	279	+	Proteína hipotética [<i>Enterobacteriaceae</i>]	98%	9.00E-60	100.00%
130	78411	79415	1005	+	ARN ligasa 2 [Fago de <i>Escherichia</i> vec74]	99%	0	100.00%
131	79445	80728	1284	-	Proteína del vértice de la cápside [Fago de <i>Escherichia</i> RB3]	99%	0	100.00%
132	80812	82377	1566	-	Proteína principal de la cabeza [Fago de enterobacterias Aplg8]	99%	0	100.00%
133	82396	83205	810	-	Proteína de andamiaje de cabeza [Fago de enterobacterias Aplg8]	99%	3.00E-134	100.00%
134	83236	83874	639	-	TPA: proteína de andamiaje central prohead y proteasa [<i>Escherichia coli</i>]	93%	1.00E-142	100.00%
135	83874	84299	426	-	Proteína central de la cabeza [<i>Enterobacteriaceae</i>]	83%	2.00E-78	100.00%
136	84299	84547	249	-	Prohead [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_112]	54%	1.00E-19	100.00%
137	84547	86121	1575	-	Proteína portal [<i>Shigella</i> phage Sf22]	99%	0	100.00%

138	86205	86696	492	-	Proteína de la cola del fago [Enterobacteriaceae]	99%	7.00E-117	100.00%
139	86813	88792	1980	-	Vaina de la cola [Fago de Citrobacter phizz23]	99%	0	99.70%
140	88824	90656	1833	-	Subunidad grande de [Fago de enterobacterias RB27]	99%	0	100.00%
141	90640	91134	495	-	Proteína terminasa pequeña [Enterobacteriaceae]	99%	8.00E-117	100.00%
142	91143	91961	819	-	Estabilizador de la vaina de la cola [Fago de enterobacterias gizh]	95%	0	100.00%
143	92003	92773	771	-	Cierre de cabeza Hc2 [Escherichia phage vb_ecom_112]	99%	0	99.61%
144	92775	93704	930	-	Adaptador cabeza-cola Ad2 [Shigella phage Shf12]	99%	0	99.68%
145	93737	95200	1464	-	Proteína de bigotes de cuello de fibrina [Escherichia phage teqsoen]	99%	0	99.59%
146	95197	96780	1584	-	Proteína de fibra de cola [Escherichia phage vb_Eco_F26]	99%	0	99.62%
147	96777	97436	660	-	Subunidad de cuña de placa base [Escherichia phage slur02]	99%	1.00E-158	100.00%
148	97436	99244	1809	-	Proteína de cuña de placa base [Fago de Escherichia 303Ecol101PP]	99%	0	100.00%
149	99244	100110	867	-	Conector de fibra de cola de cuña de placa base [Escherichia coli]	99%	0	100.00%
150	100174	101178	1005	-	Subunidad de cuña de placa base [Fago de enterobacterias RB18]	99%	0	99.70%
151	101171	104269	3099	-	Proteína de cuña de placa base [Escherichia phage ECO07P3]	99%	0	99.22%

152	104266	106248	1983	-	Subunidad de cuña de placa base [Fago de <i>Escherichia vec74</i>]	99%	0	99.85%
153	106257	106550	294	-	Proteína contenedora de dominio PAAR [<i>Enterobacteriaceae</i>]	98%	6.00E-64	100.00%
154	106551	107069	519	-	Proteína hipotética KMC16_gp264 [fago de <i>Escherichia vb_ecom_Lutter</i>]	99%	3.00E-108	100.00%
155	107080	108807	1728	-	Placa base, subunidad de cubo y cola lisozima [Fago de <i>Yersinia PST</i>]	99%	0	99.48%
156	108791	109381	591	-	Proteína de cuña de placa base 53 [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	2.00E-141	100.00%
157	109429	109881	453	+	Proteína que contiene dominio N-terminal de la endonucleasa tnsa [<i>Escherichia coli</i>]	99%	5.00E-106	100.00%
158	109881	110705	825	+	Protector del extremo del ADN [Fago de <i>Escherichia HY01</i>]	99%	0	100.00%
159	110812	111342	531	+	Proteína de la cola del fago [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	4.00E-126	100.00%
160	111392	112105	714	+	Desoxinucleósido monofosfato quinasa [Fago de <i>Escherichia HY03</i>]	99%	1.00E-161	100.00%
161	112105	112347	243	+	Chaperona de fibra de cola [<i>Escherichia phage vb_ecom_Ozark</i>]	98%	8.00E-45	97.50%
162	112347	112802	456	+	ARN ligasa [Fago de <i>Shigella KNP5</i>]	99%	6.00E-107	99.34%
163	112879	113112	234	+	Proteína interna del virión [fago de <i>Yersinia PST</i>]	98%	4.00E-48	100.00%
164	113171	113356	186	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	98%	1.00E-23	100.00%
165	113358	113738	381	+	Proteína hipotética bas38_0259 [Fago de <i>Escherichia augustsocin</i>]	99%	4.00E-88	100.00%
166	113741	114028	288	+	Proteína hipotética F413_gp247	98%	4.00E-62	98.95%

					[<i>Escherichia</i> phage ime09]			
167	115538	116011	474	+	Proteína hipotética RB32ORF133c [fago de <i>Escherichia</i> RB32]	99%	7.00E-101	99.36%
168	116134	116700	567	+	Proteína hipotética BIZ64_gp139 [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom-UFV13]	99%	3.00E-105	99.47%
169	116939	117202	264	+	Hipotética proteína JLBYU22_135 [fago de <i>Escherichia</i> JLBYU22]	98%	1.00E-57	100.00%
170	117271	117435	165	+	Proteína hipotética KMC16_gp137 [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_Lutter]	98%	1.00E-30	100.00%
171	117480	117815	336	+	Proteína de andamiaje de la cápside [Fago de enterobacterias T6]	99%	8.00E-60	97.30%
172	117873	118466	594	+	Proteína hipotética RB3_133 [fago de <i>Escherichia</i> RB3]	99%	1.00E-119	99.49%
173	118514	119113	600	+	Proteína hipotética FDJ03_gp258 [Fago <i>Shigella</i> Sf24]	99%	2.00E-143	100.00%
174	119082	119474	393	+	Sulfurtransferasa [<i>Shigella</i> sonnei]	99%	1.00E-69	97.69%
175	119456	119830	375	+	Proteína hipotética F413_gp125 [Fago de <i>Escherichia</i> ime09]	99%	4.00E-55	100.00%
176	119827	120315	489	+	Proteína de membrana [Fago de <i>Escherichia</i> REP2]	99%	1.00E-96	96.30%
177	120312	120752	441	+	Nudix hidrolasa [Fago de <i>Escherichia</i> REP1]	99%	2.00E-106	100.00%
178	120790	121284	495	+	Proteína de la familia de los glucósidos hidrolasa [<i>Escherichia coli</i>]	99%	7.00E-118	100.00%
179	121373	121690	318	+	Proteína hipotética KMC01_gp122 [Fago de <i>Escherichia</i> EC121]	99%	2.00E-70	99.05%
180	121706	122179	474	+	Proteína interna del virión [Fago de <i>Escherichia</i> HY01]	99%	1.00E-109	99.36%
181	122332	122871	540	+	Proteína de empaquetamiento de	99%	1.00E-127	97.77%

					ADN [Escherichia phage vb_ecom_Shinka]			
182	122868	123197	330	+	Proteína hipotética BI058_gp123 [Fago Shigella SHBML-50-1]	99%	9.00E-75	100.00%
183	123205	123567	363	+	Cofactor autónomo de radicales glicilo grca [fago de Escherichia vb_ecom_112]	99%	2.00E-81	99.17%
184	123567	123788	222	+	Hipotética proteína AS348_gp011 [Ligadura de fago de Escherichia14]	98%	2.00E-46	100.00%
185	123781	124047	267	+	Proteína hipotética [Escherichia coli]	98%	4.00E-57	100.00%
186	124047	124325	279	+	Hipotética proteína KMC06_gp118 [Fago de Escherichia vb_ecom-ffieco06]	98%	3.00E-60	98.91%
187	124385	124846	462	+	Rnasa específica de sitio [Escherichia coli]	99%	1.00E-109	100.00%
188	124854	125399	546	+	Proteína que contiene el dominio SLT de la transglicosilasa [Enterobacteriaceae]	99%	2.00E-129	100.00%
189	125392	125739	348	+	Modificador de la valyl trna sintetasa [fago de Escherichia wv7]	99%	1.00E-76	99.13%
190	125736	126215	480	+	Fosfatasa [Fago Shigella Sf22]	99%	7.00E-113	100.00%
191	126187	126399	213	+	Proteína hipotética RB3_115 [Fago de Escherichia RB3]	98%	4.00E-44	98.57%
192	126390	126602	213	+	Proteína hipotética Phage107_117 [Fago de Escherichia 107]	98%	7.00E-45	100.00%
193	126599	126772	174	+	Proteína hipotética [Fago de Shigella esh29]	98%	4.00E-31	100.00%
194	126769	126954	186	+	Proteína hipotética bas40_0219 [fago de Escherichia felixplatter]	98%	2.00E-35	100.00%
195	126964	127545	582	+	Timidina quinasa [Escherichia coli]	99%	3.00E-141	100.00%
196	127588	127800	213	+	Proteína hipotética F25_0105 [fago de	98%	2.00E-42	100.00%

					<i>Escherichia</i> vb_Eco_F25]			
197	127813	128106	294	+	Regulador de la inhibición de la lisis [Fago de <i>Escherichia</i> 4E10]	98%	5.00E-65	98.97%
198	128103	128489	387	+	Regulador transcripcional inducible por inanición [Fago de <i>Escherichia</i> vv7]	99%	1.00E-86	99.22%
199	128585	128773	189	+	Proteína de biosíntesis de dinucleótido de molibdopterina-guanina mobd [Fago de <i>Escherichia</i> phage vb_ecom_G50]	98%	2.00E-35	96.77%
200	128773	128976	204	+	Proteína de biosíntesis de dinucleótidos de molibdopterina-guanina mobd [Fago de <i>Escherichia coli</i>]	98%	4.00E-38	100.00%
201	128979	129173	195	+	Proteína de biosíntesis de dinucleótidos de molibdopterina-guanina mobd [Fago de <i>Escherichia coli</i>]	98%	3.00E-27	96.88%
202	129163	129336	174	+	Proteína hipotética [Fago de <i>Enterobacteriaceae</i>]	98%	1.00E-32	100.00%
203	129504	130046	543	+	Proteína de biosíntesis de dinucleótidos de molibdopterina-guanina mobd [Fago de <i>Escherichia</i> PP01]	99%	2.00E-129	100.00%
204	130053	130574	522	+	Proteína hipotética KMC22_gp102 [Fago de <i>Escherichia</i> PP01]	99%	2.00E-123	100.00%
205	130577	131038	462	+	Proteína hipotética [Fago de <i>Escherichia</i> REP1]	99%	2.00E-86	100.00%
206	131038	132048	1011	+	Nucleotidiltransferasa [Fago de <i>Escherichia</i> REP1]	99%	0	99.70%
207	132162	133130	969	+	Tiorredoxina [fago de <i>Shigella</i> esh16]	99%	0	100.00%
208	133232	133534	303	+	Proteína hipotética AR1_096 [Fago de <i>Escherichia</i> AR1]	99%	9.00E-68	100.00%

209	133595	134122	528	+	Tiorredoxina [Fago de <i>Shigella</i> esh24]	99%	2.00E-111	99.43%
210	134268	134585	318	+	Tiorredoxina putativa [fago <i>Shigella</i> vb_sbom_Phaginator]	99%	1.00E-69	100.00%
211	134593	135480	888	+	Proteína hipotética [Fago de <i>Escherichia</i> REP1]	99%	0	100.00%
212	135489	136514	1026	+	Tiorredoxina [fago de <i>Escherichia</i> teqskov]	97%	0	99.70%
213	136572	137573	1002	+	Proteína hipotética [Fago de <i>Escherichia</i> REP1]	99%	0	100.00%
214	137628	138557	930	+	Tiorredoxina [fago de <i>Escherichia</i> 4E10]	99%	0	98.71%
215	138554	138943	390	+	Tiorredoxina [<i>Escherichia coli</i>]	99%	2.00E-90	100.00%
216	138946	139188	243	+	Tiorredoxina [Fago de <i>Shigella</i> esh28]	98%	2.00E-50	98.75%
217	139190	139453	264	+	Proteína que contiene el dominio glutaredoxina [<i>Enterobacteriaceae</i>]	98%	8.00E-58	100.00%
218	139453	139665	213	+	Gp96 [Fago <i>Shigella</i> pss-1]	98%	2.00E-42	100.00%
219	139668	139838	171	+	Antitoxina de un sistema toxina-antitoxina [<i>Escherichia</i> phage vb_ecom_dalca]	98%	1.00E-29	96.43%
220	139849	140169	321	+	Ribonucleótido reductasa [Fago de enterobacterias RB51]	99%	3.00E-72	100.00%
221	140154	140309	156	+	Proteína hipotética KMC10_gp081 [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_G4498]	98%	2.00E-12	98.04%
222	140293	140778	486	+	Inhibidor de la proteasa Lon del huésped [fago de <i>Escherichia</i> HP3]	99%	1.00E-112	98.14%
223	140820	141293	474	+	Endonucleasa VII [<i>Escherichia</i> phage vb_ecom_G9062]	99%	2.00E-111	98.73%
224	141290	143107	1818	+	Ribonucleótido reductasa de subunidad grande de	99%	0	99.83%

					clase III (anaeróbica) [Fago <i>Shigella</i> esh26]			
225	143104	143574	471	+	Subunidad pequeña de ribonucleótido reductasa anaeróbica [Fago <i>Shigella</i> pss-1]	99%	1.00E-111	100.00%
226	143567	143680	114	+	Proteína de finalización de la cabeza [Fago de enterobacterias T6]	97%	4.00E-17	97.30%
227	143690	143902	213	+	Proteína hipotética BECP11_00265 [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom-BECP11]	98%	4.00E-29	100.00%
228	143905	144213	309	+	Nrdh glutaredoxina [Enterobacteriaceae]	99%	1.00E-66	98.04%
229	144372	144548	177	+	Primasa [Fago de <i>Escherichia</i> ZCEC14]	98%	1.00E-32	98.28%
230	144541	144834	294	+	Proteína hipotética KMB99_gp069 [Fago de enterobacterias T6]	98%	2.00E-62	100.00%
231	144842	144973	132	+	Hipotética proteína JLBYU31_84 [fago de <i>Escherichia</i> JLBYU31]	97%	7.00E-23	100.00%
232	144974	145174	201	+	Proteína hipotética BI058_gp072 [Fago <i>Shigella</i> SHBML-50-1]	98%	3.00E-41	100.00%
233	145227	145553	327	+	Proteína hipotética BI058_gp071 [Fago <i>Shigella</i> SHBML-50-1]	99%	7.00E-72	100.00%
234	145556	145771	216	+	Endonucleasa de recombinación VII [Fago de <i>Escherichia</i> BW-1]	98%	6.00E-41	97.18%
235	145768	146037	270	+	Proteína hipotética BI058_gp069 [Fago <i>Shigella</i> SHBML-50-1]	98%	6.00E-59	100.00%
236	146116	146673	558	+	Factor sigma de ARN polimerasa [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_112]	99%	2.00E-135	100.00%

237	146657	146875	219	+	Proteína hipotética [Enterobacteriaceae]	98%	3.00E-43	100.00%
238	146877	147194	318	+	Proteína de la familia a-gt.4 [Enterobacteriaceae]	99%	9.00E-68	100.00%
239	147163	147366	204	+	Hipotética proteína KMC13_gp173 [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_IME537]	98%	4.00E-42	100.00%
240	147370	147543	174	+	Proteína hipotética ACQ28_gp058 [Fago de <i>Yersinia</i> PST]	98%	2.00E-32	96.49%
241	147610	148812	1203	+	Alfa-glucosiltransferasa [fago de <i>Escherichia</i> RB14]	99%	0	100.00%
242	148989	150008	1020	+	Subunidad similar a sbcd de la endonucleasa específica del palíndromo [Fago de enterobacterias RB51]	99%	0	99.41%
243	150005	150268	264	+	Proteína hipotética [<i>Sallmonella</i> enterica]	98%	2.00E-56	100.00%
244	150249	150455	207	+	Proteína hipotética AR1_058 [Fago de <i>Escherichia</i> AR1]	98%	3.00E-41	100.00%
245	150494	152134	1641	+	Subunidad similar a sbcc de la endonucleasa específica del palíndromo [Fago de enterobacterias RB27]	99%	0	99.63%
246	152190	152378	189	+	Proteína GP45.2 [Fago de <i>Escherichia</i> ime09]	98%	1.00E-37	100.00%
247	152388	152777	390	+	Unión a la ARN polimerasa [Fago de <i>Escherichia</i> KIT03]	99%	7.00E-91	100.00%
248	152833	153519	687	+	Proteína de la familia LCP [<i>Escherichia coli</i>]	99%	7.00E-165	100.00%
249	153571	154530	960	+	Familia AAA atpasa [Enterobacteriaceae]	99%	0	100.00%
250	154532	155095	564	+	Cargador de pinza de ADN polimerasa subunidad A [<i>Escherichia coli</i>]	92%	7.00E-125	100.00%

251	155097	155465	369	+	Represor traduccional regal [<i>Enterobacteriaceae</i>]	99%	1.00E-84	100.00%
252	155476	155712	237	+	Proteína hipotética [<i>Salmonella enterica</i>]	98%	3.00E-49	98.72%
253	155793	158489	2697	+	Proteína contenedora del dominio ADN polimerasa [<i>Escherichia coli</i>]	99%	0	99.89%
254	158674	158910	237	+	Proteína hipotética D862_gp227 [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_ACG-C40]	98%	2.00E-36	100.00%
255	158921	159301	381	+	Inmunidad [fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_11B_SA_N WU]	99%	2.00E-87	100.00%
256	159309	159560	252	+	Proteína de inmunidad a la superinfección [<i>Enterobacteriaceae</i>]	98%	9.00E-50	100.00%
257	159714	160454	741	+	Timidilato sintasa [<i>Escherichia coli</i>]	99%	0	100.00%
258	160451	161293	843	+	Beta-glucosil-HMC- alfa- glucosiltransferasa [Fago de <i>Escherichia</i> vb_ecom_ACG-C40]	99%	0	97.86%
259	161371	162552	1182	+	Recombinasa [vb_crom_crrp10 fago Citrobacter]	99%	0	99.75%
260	162545	162889	345	+	Chaperona de ensamblaje de vértices de cabeza [Fago de Citrobacter phizz23]	80%	2.00E-59	100.00%
261	162899	164326	1428	+	Proteína que contiene dominio terminal C helicasa similar a dnab [<i>Escherichia coli</i>]	99%	0	99.79%
262	164385	164567	183	+	Discriminador de la degradación del arm [<i>Escherichia</i> phage vb_ecom_SA20RB]	98%	4.00E-34	96.67%
263	164569	164826	258	+	Proteína hipotética [<i>Salmonella enterica</i>]	98%	9.00E-55	100.00%
264	164887	165180	294	+	Masilla periplásmica [Fago de <i>Escherichia</i> REP1]	98%	7.00E-66	100.00%

265	165182	165814	633	+	Proteína hipotética [<i>Escherichia coli</i>]	99%	2.00E-152	99.52%
266	165846	>166148	303	+	Fago de <i>Escherichia</i> vb_Eco_QOTSP	1.00E-66	100.00%	111