

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

**EVALUACIÓN DE UN BACTERIÓFAGO CON ACTIVIDAD LÍTICA CONTRA
Escherichia coli MEDIANTE ENSAYOS FISICOQUÍMICOS, GENÉTICOS Y
FENOTÍPICOS**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÁSTER EN BIOCENCIAS
APLICADAS CON MENCIÓN EN BIODESCUBRIMIENTO**

MARÍA BELÉN TOAQUIZA VILCA
maria.toaquiza@epn.edu.ec

DIRECTORA: MARYNES MONTIEL ROMERO, MSc., PhD.
marymont@espol.edu.ec

CODIRECTOR: ING. PEDRO MALDONADO PhD.
pedro.maldonado@epn.edu.ec

Quito, julio 2024

© Escuela Politécnica Nacional (2024)

Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, María Belén Toaquiza Vilca, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

María Belén Toaquiza Vilca

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por María Belén Toaquiza Vilca, bajo mi supervisión.

Marynes Montiel, MsC., PhD
DIRECTORA DE PROYECTO

Ing. Pedro Maldonado, PhD.
CODIRECTOR DE PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el financiamiento del proyecto “Bacteriófagos provenientes de muestras ambientales con posibles aplicaciones en el control de bacterias “, bajo el código FCV-15-2021, llevado a cabo en el Decanato de Investigación del Departamento de Ciencias de la Vida de la ESPOL.

DEDICATORIA

En memoria de mi padre, Ricardo Toaquiza.

A Dios, quien me ha otorgado la fortaleza necesaria para enfrentar las diversas situaciones que se han presentado en mi vida, guiándome y protegiéndome en cada paso.

A mi mamá, mi hermana Sofía y mi madrina Liliana, quienes han sido un constante pilar de apoyo. Su ejemplo y amor ha sido mi principal fuente de inspiración, motivándome a ser una mejor persona día tras día.

A mis amigos por su constante apoyo y amistad inquebrantable. Han sido pilares esenciales en mi trayecto

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Marynes Montiel por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto, así como por su dedicación, orientación y apoyo a lo largo de este proceso. Gracias a su compromiso y liderazgo, he adquirido conocimientos técnicos y habilidades críticas que me serán de utilidad en mi vida profesional. Su dedicación y mentoría han dejado un impacto positivo en mi crecimiento académico y personal.

También quiero agradecer al Dr. Diego Quito por su confianza, paciencia y guía. Y la colaboración de sus técnicos de laboratorio durante el año 2022, Gabriela Cañada y Edison Reyes, quienes, junto con Katya, Ivonne y Daniela, hicieron que mi estadía en la ESPOL fuera una experiencia inolvidable y enriquecedora.

De la misma manera, agradezco al Dr. Pedro Maldonado y al Dr. Omar Ruiz por su confianza, paciencia y valiosa retroalimentación, elementos fundamentales que han contribuido al desarrollo de mi trabajo.

Mi reconocimiento se extiende a todos los profesores de la maestría de Biociencias Aplicadas por compartir su conocimiento de manera excepcional.

Agradezco a todo el Departamento de Ciencias de la Vida de la ESPOL y al personal de la institución por su amabilidad y colaboración durante el desarrollo de mi tesis. Reconozco especialmente el apoyo brindado por los técnicos de docencia, pasantes y ayudantes de investigación del laboratorio de microbiología ambiental durante el período 2022.

Expreso mi reconocimiento al Centro de Nanociencias y Nanotecnologías (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por su disposición para contribuir al avance de la ciencia.

Finalmente, deseo agradecer a la Escuela Politécnica Superior del Litoral y a la Escuela Politécnica Nacional por su compromiso continuo en proporcionar educación de calidad de tercer y cuarto nivel a la población ecuatoriana, así como por brindar oportunidades para que los estudiantes persigan sus sueños.

Evaluación de un bacteriófago con actividad lítica contra *Escherichia coli* mediante ensayos fisicoquímicos, genéticos y fenotípicos

Toaquiza, Belén¹; Maldonado-Alvarado, Pedro¹; Quito, Diego²; Ruiz, Omar²; Debut, Alexis³; Montiel, Marynes²

¹Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología, Quito, Ecuador

²Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ciencias de la Vida, Guayaquil, Ecuador

³Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Centro de Nanociencia y Nanotecnología, Sangolquí-Ecuador

Resumen: La diseminación ambiental es una preocupación mundial y los bacteriófagos representan una alternativa prometedora para el control de bacterias resistentes a antibióticos debido a su alta especificidad, capacidad de autorreplicarse y coevolución con el huésped. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar mediante ensayos fisicoquímicos, genéticos y fenotípicos un bacteriófago con actividad lítica contra *Escherichia coli*. A partir de muestras de agua y sedimentos provenientes del Estero Salado, Guayaquil- Ecuador, se aislaron bacteriófagos pertenecientes a géneros líticos como *Felixunavirus*, *Dhillonvirus* y *Justusliebigvirus*. Sin embargo, solo el fago BME3, perteneciente al último género, logró lisar cepas de *E. coli* con diferentes fenotipos de susceptibilidad a antibióticos: 57,14% (8/14) resistentes, 12,5% (1/8) intermedio y 80% (4/5) sensible. Igualmente, BME3 infectó cepas *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, y no tuvo reacción contra *Bacillus* sp., *Vibrio* sp. y *Pseudomonas* sp. BME3 demostró estabilidad a temperaturas inferiores a 60°C y en rangos de pH entre 3 a 11, y carece de sensibilidad al cloroformo. Mediante, microscopía electrónica de transmisión se comprobó que BME3 pertenece a la clase *Caudoviricetes*, la longitud de la cabeza icosaédrica y la cola contráctil fue de 102,64±11,57 nm y 105,00±9,00 nm, respectivamente. El genoma del fago BME3 consta ADN bicatenario con 147 371 pb de longitud, con un contenido de GC del 37,5% y 15 genes de ARNt. Además, BME3 carece de genes lisogénicos, resistencia a antibióticos y virulencia, lo que indica que este bacteriófago es seguro para la fagoterapia.

Palabras clave: Bacteriófago, *Escherichia coli*, *Caudoviricetes*, control biológico, resistencia bacteriana a antibióticos

Bacteriophage evaluation with lytic activity against *Escherichia coli* using physicochemical, genetic, and phenotypic assay

Abstract: Environmental dissemination is a global concern, and bacteriophages represent a promising alternative for controlling antibiotic-resistant bacteria due to their high specificity, ability to self-replicate, and coevolution with the host. The objective of this research was to evaluate a bacteriophage with lytic activity against *Escherichia coli* through physicochemical, genetic, and phenotypic tests. Bacteriophages from lytic genera such as *Felixunavirus*, *Dhillonvirus*, and *Justusliebigvirus* were isolated from water and sediment samples from the Estero Salado, Guayaquil- Ecuador. However, only phage BME3, belonging to the last genus, managed to lyse *E. coli* strains with different antibiotic susceptibility phenotypes: 57.14% (8/14) resistant, 12.5% (1/8) intermediate, and 80% (4/5) sensitive. Likewise, BME3 infected strains of *E. coli* ATCC 25922 and *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, and did not react with *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., and *Pseudomonas* sp. BME3 demonstrated stability at temperatures below 60°C and in pH ranges between 3 to 11 and lacks sensitivity to chloroform. Through transmission electron microscopy, it was verified that BME3 belongs to the *Caudoviricetes* class, with the length of the icosahedral head and the contractile tail was 102.64±11.57 nm and 105.00±9.00 nm, respectively. The genome of phage BME3 consists of double-stranded DNA with a length of 147,371 bp, a GC content of 37.5%, and 15 tRNA genes. Furthermore, BME3 lacks lysogenic genes, antibiotic resistance, and virulence factors, indicating that this bacteriophage is safe for phage therapy.

Keywords: Bacteriophage, *Escherichia coli*, *Caudoviricetes*, biological control, bacterial resistance to antibiotics

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos es el resultado de múltiples factores, entre los cuales se destacan la automedicación, la prescripción irracional, el uso excesivo y

la disminución en el desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica (Luepke et al., 2017; Raffatellu, 2018; Rios et al., 2016). Estos compuestos se liberan al medio acuático a través de la descarga de aguas residuales domésticas e industriales, así como de los efluentes provenientes de granjas y de la actividad acuícola (Ben et al., 2018; Marathe et al., 2017).

En condiciones adecuadas, los residuos de antibióticos en el ambiente pueden ejercer presión selectiva sobre cepas inocuas o serotipos patogénicos de *Escherichia coli*, lo que complica el control de estos microorganismos debido a mutaciones puntuales o transferencia horizontal de genes (conjugación, transducción y transformación) (Bobate et al., 2023; Calero-Cáceres et al., 2019; Gordillo Altamirano & Barr, 2019). Entre los serotipos patogénicos de *Escherichia coli* de humanos y animales se encuentran aquellos capaces de provocar diversas enfermedades como enteritis, septicemia, infecciones del tracto urinario, meningitis y diarrea intestinal (Bolocan et al., 2016; Kapér et al., 2004).

El mayor riesgo de la diseminación de bacterias resistentes radica en el contacto de aquellos microorganismos con la microbiota intestinal de humanos y animales. Este contacto puede ocurrir por la ingestión de agua o alimentos contaminados con bacterias (Jiang et al., 2023; Ye et al., 2019).

La resistencia a antibióticos es una amenaza para la salud pública y seguridad alimentaria (Organización Mundial de la Salud, 2020). Se estima que más de 10 millones de personas morirán en 2050 debido a la resistencia a los antibióticos (Alanís, 2005; O'Neill, 2014). Se necesitan estudios holísticos sobre la resistencia a los antibióticos en humanos, animales y el medio ambiente para desarrollar estrategias de control efectivas (Van Puyvelde et al., 2018).

En la era de la crisis de resistencia a los antibióticos, la fagoterapia es una alternativa prometedora cuya aplicación empezó hace más de 100 años (Harada et al., 2018; Summers, 1999). Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y se encuentran ampliamente distribuidos en la biosfera, con una abundancia total 10^{31} partículas víricas (Mann, 2005). Se han desarrollado técnicas para descubrir la diversidad de bacteriófagos en varios nichos ambientales a través de la metaviromica, microscopía electrónica de transmisión y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Nicolas et al., 2023; Olsen et al., 2020; Yutin et al., 2017).

Los bacteriófagos se clasifican según su ciclo de vida en lisogénico y lítico. El primer estado favorece a la transducción, es decir, la transferencia horizontal de genes de resistencia a los antibióticos o toxinas entre bacterias. Sin embargo, para la fagoterapia es importante el aislamiento y uso de fagos virulentos que provocan la lisis del huésped (Salmond & Fineran, 2015).

El uso de bacteriófagos líticos ofrece varias ventajas importantes en la fagoterapia. En primer lugar, los fagos son fáciles de propagar mediante la autorreplicación y esto ocurre sólo en presencia del huésped (Hatfull et al., 2022; Park et al., 2020). En segundo lugar, los bacteriófagos ofrecen seguridad porque no infectan células eucariotas (Gordillo Altamirano & Barr, 2019; Rios et al., 2016). En tercer lugar, los virus son altamente específicos debido a que estos reconocen y se unen a receptores localizados en la membrana externa del huésped mediante proteínas de unión a receptores (PRB) como fibras o púas de la cola (Maffei et al., 2021). En cuarto lugar, la coevolución del fago con el huésped mediante la transferencia

horizontal de genes de dominios de unión al receptor del huésped, incluyendo centros catalíticos con actividad despolimerasa (Pas et al., 2023; Stummeyer et al., 2006).

Sin embargo, el uso de bacteriófagos está limitado por los siguientes factores: la transducción, la presencia de genes tóxicos en el genoma del fago, mecanismos de resistencia a fagos, y la necesidad de disponer de una colección de fagos que proporcione opciones terapéuticas efectivas (Kakasis & Panitsa, 2019).

Tradicionalmente, la fagoterapia se ha centrado en estudios clínicos, veterinarios y de seguridad alimentaria. En el sector clínico, se ha reportado el aislamiento de fagos para el control de bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones del tracto urinario o heridas de la piel (Mattila et al., 2015; Slobodníková et al., 2021; Yazdi et al., 2020). En el sector veterinario, fagos poseen interés para infectar cepas patogénicas de *E. coli* causantes de diarrea en ganado o incluso la colibacilosis en aves de corral (Cui et al., 2022; Nicolas et al., 2023). En la seguridad alimentaria, se incluyen investigaciones agrícolas para controlar bacterias resistentes a antibióticos en sistemas suelo-planta en cultivos de zanahoria y lechuga (Ye et al., 2018; Zhao et al., 2019) y la desinfección de semillas (Liao et al., 2022).

Los estudios sobre diseminación de resistencia ambiental en cuerpos de agua son muy escasos. Ecuador cuenta con el primer reporte de detección de cepas *E. coli* con fenotipo de multiresistencia y la presencia del gen de resistencia a colistina y β -lactamasas en muestras ambientales (Calero-Cáceres et al., 2022). Por tal motivo, es importante el aislamiento de bacteriófagos líticos para controlar y prevenir la diseminación de resistencia ambiental de *E. coli*.

En estuarios, se ha reportado la presencia de bacteriófago de la clase *Caudoviricetes*, siendo los de mayor prevalencia los pertenecientes a la morfología *Myoviridae* (viriones con cola larga contráctil) seguido de los pertenecientes a la morfología *Siphoviridae* (cola larga no contráctil) y *Podoviridae* (cola corta) (Jasna et al., 2018; Turner et al., 2023; Zhang et al., 2021). A pesar de la diversidad y abundancia de bacteriófagos que se encuentran comúnmente en estuarios, no todos son adecuados para el control biológico de *E. coli*. Por lo tanto, Born et al. (2019) proponen la preselección de fagos estrictamente líticos con morfología *Myoviridae* (FO1, GJ1, T4 y Vi1) y *Podoviridae* (N4, T7, SP6) mediante la amplificación del gen de la proteína de la cápside mayor (MCP). Sin embargo, existen otros géneros líticos como *Dhillonvirus* y *Tequintavirus* pertenecientes a la morfología *Siphoviridae* para los cuales no existen reportes de cebadores sobre su identificación (Adams et al., 2017; Golomidova et al., 2019; Maffei et al., 2021; Sváb et al., 2022).

Por lo tanto, los objetivos de la investigación fueron los siguientes: a) seleccionar bacteriófagos con actividad lítica contra la cepa de *Escherichia coli* ATCC 15597 aislados de muestras de agua y sedimentos provenientes del Estero Salado (Guayaquil, Ecuador); b) identificar un bacteriófago lítico con potencial uso en el control biológico de *Escherichia coli* mediante ensayos de biología molecular y perfil de lisis; c) caracterizar de forma fisicoquímica, fenotípica y genética al

menos un bacteriófago con características líticas deseables para su uso en control biológico.

2. METODOLOGÍA

2.1. Muestreo

El aislamiento de los bacteriófagos se realizó a partir de muestras de agua y sedimentos provenientes del Estero Salado (-2.4198713, -80.0299257), estuario ubicado en la ciudad de Guayaquil, Ecuador. El muestreo fue de tipo no probabilístico por conveniencia, en el cual se seleccionaron 15 puntos de muestreo que abarcaron sus diferentes ramales (Tabla FTI. 1). La selección de los sitios de muestreo se basó en los siguientes parámetros: influencia de la actividad antropogénica, seguridad del personal durante la toma de muestras y sitios de fácil acceso. Las muestras de agua se recolectaron en botellas de vidrio con una capacidad de 1 L, mientras que los sedimentos (250 g) fueron depositados en bolsas de plástico. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta que fueron recibidas y procesadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Vida de la ESPOL.

2.2. Aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras ambientales

La cepa de *Escherichia coli* ATCC 15597 se utilizó para el aislamiento de bacteriófagos tanto en muestras de agua como de sedimentos. Se empleó el método de capa simple de agar descrito por EPA (United States Environmental Protection Agency, 2001) con modificaciones en el procesamiento de sedimentos. Se pesaron 10 g de sedimentos y se mezclaron con 90 mL de solución salina (0.85%). Se agitó para liberar los fagos de las partículas del suelo. Finalmente, se dejó decantar y se recuperó el sobrenadante (Adriaenssens et al., 2011).

Las muestras de agua y el sobrenadante de los sedimentos se procesaron de la siguiente forma: 500 µL de MgCl₂ (4 M) y 1000 µL de cloruro de tetrazolio (1%) se añadieron a 100 mL de la muestra. La mezcla se incubó durante 10 min a 37°C. Luego, se agregaron 10 mL de la bacteria en crecimiento en fase logarítmica (0.5 McFarland) y se incubó durante 5 min a 37°C. A continuación, se añadió 100 mL de agar tripticosa soya (TSA, 2X) previamente atemperado a 45°C. La mezcla se homogeneizó y se dispensó en cajas Petri para su incubación a 37°C durante 24 a 48 h.

2.3. Recuperación y purificación de bacteriófagos

Para la recuperación y purificación de bacteriófagos, se empleó la metodología descrita por Lukman et al. (2020). En la selección de placas líticas, se consideró la morfología y el diámetro. Cada placa lítica se recuperó con una punta estéril de micropipeta y se resuspendió en 1 mL de tampón de sodio y magnesio (1 L de tampón SM: 50 mL de Tris-HCl 1 M pH 8, 2 g de MgSO₄·7H₂O, y 5.8 g NaCl). La suspensión se pasó a través de un filtro de membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0.22 µm y se realizó el método de doble capa de agar. Este proceso se repitió al menos tres veces hasta obtener placas uniformes. Los bacteriófagos recuperados fueron etiquetados como BMX_n o BMX_S_n,

donde “BM” corresponde a un indicador general, seguido de “X” que representa el punto de muestreo entre A-O, “S” significa muestras provenientes de sedimentos (su ausencia denota muestras de agua), y “n” indica el número de placa aislada.

Para determinar el título de los aislados se empleó el método de doble capa de agar según la metodología descrita por Kropinski et al. (2009). A partir de la suspensión inicial del fago, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻⁴ a 10⁻⁷, con la finalidad de visualizar placas líticas individuales. A un volumen de dilución de 1000 µL se añadieron 200 µL de la bacteria en crecimiento en fase logarítmica (0.5 McFarland) y 10 µL de MgCl₂ (4M). A continuación, se homogenizó la muestra en un vórtex y se incubó a 37°C durante 5 min. La mezcla se añadió a 4 mL de TSA con 0.7% de agar precalentado a 45°C y se dispensó sobre la superficie de placas de TSA con 1.5% de agar. Las cajas Petri se incubaron a 37°C durante 12 h. Los resultados se reportaron como Unidades Formadoras de Placas por mL de muestra (UFP/mL).

Se determinó la actividad lítica del filtrado contra la cepa de *E. coli* ATCC 15597 mediante la prueba de la gota, de acuerdo con la metodología descrita por Mirzaei & Nilsson (2015). En cajas Petri con medio TSA se inoculó el huésped en crecimiento logarítmico (0.5 McFarland), luego se colocaron 10 µL de suspensión de fagos sobre la superficie. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h. Los resultados se reportaron como la presencia o ausencia de zonas de lisis.

2.4. Identificación molecular de bacteriófagos líticos

La detección de bacteriófagos estrictamente líticos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando la metodología descrita por Born et al. (2019), que se basa en la amplificación del gen MCP. Para la preparación del ADN molde, se recuperaron los fagos a partir de las zonas líticas (prueba de la gota) o placas líticas (método de doble capa de agar) con la ayuda de una punta estéril de micropipeta y se resuspendieron en 100 µL de tampón SM. La suspensión del fago se incubó a temperatura ambiente (17°C) durante 1 h y luego a 95°C por 10 min e inmediatamente se refrigeró a 8°C. Para el análisis de PCR, se utilizaron 2 µL de ADN molde en una reacción de 20 µL, descrita a continuación: 10 µL de GoTaq® *Green Master Mix* (Promega, USA), 0.8 µL de cada cebador a 100 µM (Macrogen, Corea del Sur), 3.2 µL de ddH₂O de grado molecular (Invitrogen, USA) y 2 µL de ADN del fago. La temperatura de *annealing* fue de 52°C para los géneros T4/T7/SP6/Vi1 y 54°C para los géneros N4/FO1/GJ1.

Con el propósito de validar los resultados obtenidos mediante el análisis de PCR múltiple y detectar los miembros del género *Dhillionvirus* y *Tequintavirus*, se realizó un análisis de PCR con un solo set de cebadores. Se utilizó un volumen de reacción de 20 µL: 10 µL GoTaq® *Green Master Mix*, 0.8 µL de cada cebador 100 µM (Macrogen, Corea del Sur), 6.4 µL de ddH₂O de grado molecular (Invitrogen, USA) y 2 µL del ADN del fago. La temperatura de *annealing* se ajustó a 50°C (T4, FO1, GJ1, Vi1), 55°C (N4, SP6, T7) o 58 °C (HK578, T5).

Los resultados del análisis de PCR se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. El tamaño esperado de los productos de PCR se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Tamaño esperado de los productos de PCR para la detección de bacteriófagos

Especies	Género ¹	Producto del PCR (pb)
HK578-2	<i>Dhillonvirus</i>	1100
T5	<i>Tequintavirus</i>	1100
T4	<i>Tequatrovirus</i>	240
T7	<i>Teseptimavirus</i>	440
N4	<i>Enquatrovirus</i>	930
GJ1	<i>Carltongylesvirus</i>	680
SP6	<i>Zindervirus</i>	700
FO1	<i>Felixounavirus</i>	510
Vi1	<i>Kuttervirus</i>	605

¹International Committee on Taxonomy of Viruses (2023)

Los productos de PCR extraídos del gel se purificaron con el kit purificación (Invitrogen). El gen de la proteína de la cápside fue secuenciado mediante el método de Sanger (Sanger et al., 1977), MacroGen, Inc. (Corea del Sur).

2.5. Determinación del perfil de lisis de los bacteriófagos

Para determinar el perfil de lisis de los bacteriófagos identificados como líticos mediante PCR y aquellos que forman placas uniformes, se llevó a cabo un *screening* utilizando la prueba de la gota según metodología descrita por Kutter (2009). Esta prueba se realizó frente a 29 cepas de *E. coli* obtenidas de investigaciones previas de la Dra. Montiel sobre resistencia ambiental, así como cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14428. Como control, se utilizó la cepa de *E. coli* ATCC 15597. Las cajas Petri con TSA se inocularon con las cepas bacterianas a 0.5 de McFarland, y se goteó de 4-7 μ L de cada fago. Los resultados se registraron como la presencia o ausencia de actividad lítica del fago por cada cepa bacteriana evaluada.

2.6. Selección y enriquecimiento del bacteriófago de interés

En selección del bacteriófago de interés, se consideró la capacidad lítica frente a otras cepas de *E. coli* o la identificación molecular. Para incrementar el título del bacteriófago de interés, se utilizó la técnica descrita por Poxleitner et al. (2018) con algunas modificaciones. Con una punta estéril de micropipeta, se recuperó una placa de lisis y se resuspendió en 5 mL de caldo tripticasa soya (TSB). Al contenido del tubo se agregaron 300 μ L de la cepa *E. coli* ATCC 15597 (0.5 de la escala de McFarland) y se incubó durante 4 h a 37°C. Luego, el medio de cultivo se centrifugó a 8000 \times g durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y pasó por un filtro PVDF de jeringa de 0.22 μ m. Para determinar el título se aplicó el método de capa doble de agar.

2.7. Determinación del perfil de lisis del fago de interés

Con el bacteriófago de interés enriquecido a un título de 1×10^9 UFP/mL, se evaluó nuevamente el rango del huésped mediante la prueba de la gota, descrita en el apartado 2.5. Adicionalmente, se determinó la actividad lítica contra

Bacillus sp., *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.8. Estabilidad térmica y pH

Para las pruebas de estabilidad del fago, se utilizó la metodología descrita por Hu et al. (2021) con algunas modificaciones. En la evaluación de la estabilidad térmica, 1 mL de lisado de fago (1×10^8 UFP/mL), ajustado a un pH de 8, se sometió a diferentes temperaturas (35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 75°C y 80°C) durante 1 h. Para evaluar la estabilidad al pH, 100 μ L de lisado de fago (1×10^9 UFP/mL) se añadieron a 900 μ L de tampón SM ajustado con NaOH (5 M) o HCL (5 M) a pH de 3, 5, 7, 9 y 11, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. El título de cada tratamiento se determinó mediante el método de doble capa de agar utilizando como huésped a la cepa de *E. coli* ATCC 15597. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.9. Sensibilidad al cloroformo

Para determinar la sensibilidad al cloroformo del fago de interés, se empleó el método descrito por Chénard et al. (2015). A 500 μ L y 750 μ L del fago (1×10^9 UFC/mL) se añadieron 500 μ L y 250 μ L de cloroformo puro, respectivamente, y se agitó durante 1 h. La mezcla se centrifugó a 4100 \times g durante 5 min e inmediatamente se recuperó el sobrenadante. La muestra se incubó a 17°C durante 2 h para eliminar el cloroformo residual. Se determinó el título del fago de interés mediante el método de doble capa de agar y se utilizó como huésped la cepa de *E. coli* ATCC 15597. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.10. Caracterización morfológica mediante microscopía electrónica

La caracterización morfológica del bacteriófago de interés se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) (marca FEI modelo Tecnai G2 Spirit Twin, equipado con la cámara Eagle 4K, USA) en colaboración con el Centro de Nanociencias y Nanotecnologías (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Se empleó la metodología descrita por Wang et al. (2022) con algunas modificaciones. Se colocaron 5 μ L de la muestra del bacteriófago de interés (1×10^9 UFP/mL) en una rejilla redonda para microscopía electrónica de cobre con soporte de Formvar/carbono. A continuación, se realizó la tinción negativa mediante la adición de 5 μ L de ácido fosfotúngstico al 2% durante 1 segundo. Se secó con papel filtro y la muestra se introdujo en el MET y se operó a 80 kV. La longitud de la cola y el diámetro de la cápside se midieron con un programa informático de análisis de imágenes, Fiji versión 1.54f

2.11. Extracción de ADN y secuenciación del virus

En la extracción de ADN se empleó el método descrito por Jofre & Muniesa (2020) con algunas modificaciones. Por cada 500 μ L de suspensión de fago (1×10^9 UFP/mL) se agregaron 1.5 μ L de DNAsa (6 U/mL) (Applied Biological Materials Inc, Canadá) y 0.5 μ L RNAsa (20 ug/mL) (Invitrogen, USA), y se incubó a 37°C durante 1 h. Se inactivó la DNAsa incubando la

mezcla a 80°C por 10 min. A la mezcla se añadieron 12 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Invitrogen, USA) y 1000 µL de tampón de proteinasa K (1M Tris HCl, pH 8, 2 mL 0.5 M EDTA, pH, 10 mL 10% SDS, 100 mL H₂O), se homogeneizó y se incubó la mezcla a 55°C por 1 h. El DNA fue extraído y purificado utilizando las minicolumnas de ADN HiBind® (OMEGA BIO-TEK, USA).

La concentración de ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis) (NanoDrop) a una longitud de onda de 260 nm. Se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8%. El genoma del fago se secuenció usando la plataforma NovaSeq6000 de Illumina en lecturas de extremos pares de 150 nucleótidos (nt).

2.12. Ensamblaje del genoma y análisis bioinformático

Los análisis de secuencias, que incluyen normalización, ensamblaje de novo y anotaciones, se realizaron con BBNorm, SPAdes (Bankevich et al., 2012) y Glimmer3 (Delcher et al., 2007) en Geneious Prime versión 2023.2.1. El empaquetamiento del ADN se determinó mediante PhageTerm (Garneau et al., 2017). La anotación de genes se ejecutó con las herramientas BLAST y Uniprot en NCBI, y RCSB Protein Data Bank (Rose et al., 2015). Los ARN de transferencia (ARNts) se identificaron mediante tRNA scan-SE (Chan et al., 2021) y ARAGORN (Laslett, 2004). Para identificar genes de resistencia a los antimicrobianos (ARGs), se emplearon las bases de datos CARD (Alcock et al., 2019) y ResFinder 4.1.1 (Zankari et al., 2017). Además, la base de datos PhageScope (Wang et al., 2024) se utilizó para detectar posibles factores de virulencia presentes en el genoma del fago. Las plataformas PhageScope y DeepTMHMM se utilizaron para predecir proteínas con topología transmembrana (Hallgren et al., 2022; Wang et al., 2024).

El análisis filogenético y la clasificación taxonómica de los fagos se realizaron mediante los árboles filogenéticos a nivel de nucleótidos utilizando el servidor web VICTOR (Meier-Kolthoff & Göker, 2017) para ayudar en la clasificación taxonómica de las plataformas de virus y VIRIDIC (Moraru et al., 2020). Además, se llevó a cabo un análisis comparativo de secuencias codificantes (CDS) entre fagos relacionados utilizando Clinker (Gilchrist & Chooi, 2021).

2.13. Diseño de cebadores y detección por PCR

Para diseñar los cebadores de detección, se utilizaron los genes de la proteína de la cápside mayor (MCP) y de la ADN polimerasa (Pol) para garantizar la pureza de los lisados del fago. Se utilizó Geneious Prime para diseñar los cebadores, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores de detección para la amplificación de un fragmento de la proteína de la cápside mayor (MCP) y de la ADN polimerasa (Pol)

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del producto (bp)
MCP-fw	CAGACTGTAGCTGTACAGTGCG	629
MCP-rev	TGATAACCTGCGTACCGAAGCG	
Pol-fw	GGTATGGAGCCACCATCGCACT	826
Pol-rev	GCCTTACGAACAAGATCATCGTC	

En este ensayo, se utilizó ADN molde obtenido mediante el método propuesto por Born et al. (2019) y la metodología modificada de Jofre & Muniesa (2020), descrito en los apartados 2.4 y 2.11, respectivamente. La mezcla de PCR contenía 1 µl de ADN molde, 5 µl de GoTaq® 2X Green Master Mix (Promega, USA), 0.5 µl de cada cebador a 40 µM (Macrogen, Corea del Sur), 3 µl de ddH₂O de grado molecular (Invitrogen, USA). La temperatura de *annealing* fue de 55°C. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

2.14. Análisis estadístico

En los ensayos de caracterización fisicoquímica, los datos fueron sometidos a un análisis paramétrico mediante la prueba de Shapiro-Wilk para confirmar la distribución normal de los resultados. Posteriormente, los resultados se sometieron a un análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de comparaciones post hoc de Tukey para comprobar las diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis se llevaron a cabo con un nivel de confianza de significancia del 0.05, empleando los softwares estadísticos R versión 4.2.2 para el análisis e Infostat versión 2020 para la generación de gráficos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras ambientales

El método de capa simple, al utilizar un volumen considerable de muestra (100 mL de agua), permite determinar el conteo real de bacteriófagos en el ambiente, y se recomienda su uso para aguas poco contaminadas o subterráneas (US EPA, 2001). Por tal motivo, el conteo de bacteriófagos en las muestras de agua fue menor a 200 UFP/100 mL, con excepción del punto K (1400 UFP/100 mL), que corresponde a una zona residencial. No se logró recuperar fagos a partir de las muestras de sedimentos, especialmente en los puntos E, J, L, M, N y O (Tabla FTI. 1). Esto podría atribuirse a las propiedades de los sedimentos que dificultan la desorción, como contenido de humedad, pH, minerales, cantidad de materia orgánica y la composición del suelo. Para este tipo de matrices, se recomienda el aislamiento de fagos mediante métodos de enriquecimiento (Nair et al., 2022).

3.2. Recuperación de bacteriófagos

A partir de quince muestras agua y nueve de sedimentos se detectó 76 placas líticas que representan la presencia de bacteriófagos, las cuales mostraron diversidad en su morfología y tamaño. Mediante el método de simple capa se identificaron 8 tipos de morfología según la turbidez (Figura 1). Se identificaron placas claras (Figura 1A), turbias (Figura 1B), con un halo semitransparente (Figura 1C) y la presencia de halos turbios y claros de tamaño variable (Figura 1D-G). Entre las placas más comunes reportadas en investigaciones, destacan aquellas que son claras, turbias, con halo y “ojo de buey” (Abedon, 2018; Jurczak-Kurek et al., 2016). Las placas D, E, F y G corresponden a la morfología de “ojo de buey”,

resultado de la disminución de la eficiencia lítica, posiblemente debido al envejecimiento del césped bacteriano o a fenómenos de inhibición de la lisis (Jurczak-Kurek et al., 2016).

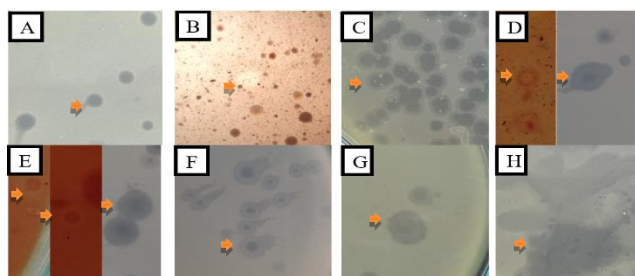


Figura 1. Morfología de las placas de lisis identificadas. (A) clara; (B) turbia; (C) clara rodeada por un halo delgado; (D) borde semitransparente con centro claro pequeño; (E) centro claro marcado con borde semitransparente; (F) borde y centro claro con halo turbio; (G) "ojo de buey" centro turbio con diferentes halos; y (H) crecimiento extendido.

La morfología H corresponde a una lisis extendida, atribuida a la presencia de enzimas virales que degradan la pared bacteriana, como endolisinas, holinas o spaninas (Abeysekera et al., 2022).

Las placas con morfología "ojo de buey" continuaban expandiéndose en el césped bacteriano o replicándose, resultados similares se han reportado para el fago T7 (Yin, 1991). Igualmente, Pan et al. (2022) han reportado variación en el tamaño de las placas en bacteriófagos Ca que infectan *Hafnia paralvei*. Además, se identificó que la morfología de las placas no era constante entre el método de capa simple y doble de agar, lo cual se atribuye a cambios de nutrientes en los medios de cultivo, dado que cada bacteriófago tiene requerimientos específicos (Ramesh et al., 2019).

3.3. Identificación molecular de bacteriófagos líticos

Mediante la prueba de goteo, se observó la actividad lítica de los bacteriófagos aislados contra *E. coli* ATCC 15597. El 71% (54/76) de los aislados infectaron a la cepa huésped, mostrando lisis turbia, clara y la visualización de placas líticas (título bajo). El 29% restante (22/76) no presentó reacción contra el huésped, lo cual puede atribuirse a la disminución del título, debido a factores como temperatura, acidez, presencia de iones y la exposición a la luz solar (Hyman & Abedon, 2010; Kutter, 2009).

Debido a estos factores, el título de los 54 bacteriófagos disminuyó y se perdieron cuatro muestras. Por lo tanto, se realizó la extracción de ADN a partir de placas líticas obtenidas mediante el método de doble capa de agar, de acuerdo con las recomendaciones de Born et al. (2019). El género *Dhillonvirus* fue el más frecuente con 58% (29/50) en muestras de agua y sedimentos. Mientras el 40% de los fagos (20/50) no se lograron identificar mediante PCR, 14 muestras provenían de agua y 16 presentaban un estado de crecimiento lisogénico, evidenciado por zonas de lisis turbias e incluso crecimiento bacteriano. Además del género *Dhillonvirus*, se identificó una muestra correspondiente al género *Felixounavirus*. Resultados similares han sido reportados en

estudios sobre la diversidad de bacteriófagos cultivables de *E. coli* a partir de aguas residuales (Olsen et al., 2020).

3.4. Perfil de lisis de los bacteriófagos

Siete aislados del género *Dhillonvirus* junto con un bacteriófago "no identificado" lograron infectar cepas distintas al huésped control (Tabla AII. 1). La ausencia de reacción por parte de los otros bacteriófagos líticos se puede atribuir a los factores como multiplicidad óptima de infección (MOI), concentración de cationes divalentes y el reconocimiento de proteínas de unión al receptor (PBR) del fago a los receptores primarios o secundarios del huésped (Bertozzi Silva et al., 2016; Islam et al., 2012; Landry & Zsigray, 1980).

Los fagos BMA1, BME3 y BMH4 infectaron a *E. coli* ATCC 25922, cepa control para susceptibilidad a los antimicrobianos (American Type Culture Collection, n.d.). Otros miembros del género *Dhillonvirus* mostraron actividad lítica contra cepas de *E. coli* susceptibles a los antibióticos. Las cepas sensibles a antibióticos fueron infectadas en un 40% (2/5) por BMA1 y 20% (1/5) por BMA2, BMC1y BMFS1. El fago BMA1 lisó el 12.50% (1/8) cepas con resistencia intermedia. Las cepas resistentes fueron susceptibles a fagos en 42.86% (6/14) por BMA2, 14.29% (2/14) por BMC1 y 7.14% (1/14) por BMA1, BMAS1 y BMH5. Estos bacteriófagos reconocen al glucano en el antígeno O como receptor primario y a proteínas superficiales (LpTD o FhuA) como secundarios del huésped.

Aunque el fago BMG5 pertenece al género *Felixounavirus* no logró infectar *Salmonella typhimurium*, resultados similares lo han reportado por Cui et al. (2022). Estos fagos reconocen al huésped a través del lipopolisacárido (LPS) (Maffei et al., 2021). BME3 presentó un amplio rango de huésped y logró lisar cepas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Entre las cepas de *E. coli* con diferentes fenotipos de susceptibilidad a los antibióticos, el fago BME3 infectó con éxito el 57.14% (8/14) de las bacterias resistentes, el 80% (4/5) de las cepas sensibles y el 12.50% (1/8) con resistencia intermedia.

Tabla 3. Actividad lítica de los bacteriófagos aislados frente a 26 cepas de *E. coli* ambientales, *E. coli* ATCC 15597, *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

GÉNERO	FAGO	Log UFP/mL	ATCC 15597	ATCC 25922	ATCC 14028	ESAN 11	ECAL 86	ECAL 130	ETRA 7	ECO 69	ETRA 5	ESAN 4	EMS 5	EMS 6	EMS 7	EMS 8	EMS 11	ECO 160	ESAN 2	EMS4	ESAN 31	ECAL 45	ECAL 141	ETRA 1	ETRA 6	ECO 85	ECO 119	ECO 122	ECO 141	ECO 142	ECO 148	ECO 163
			Susceptibilidad	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Dhillonvirus</i>	BMA1	7.00	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMA2	7.79	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMA3	6.94	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMAS1	8.00	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMB1	8.85	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMC1	8.41	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMCS1	8.88	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMCS2	8.79	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMCS3	8.36	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMD1	7.40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BME1	7.30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>No identificado</i>	BME3	9.00	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BME4	8.70	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BME5	8.92	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMF2	7.08	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMFS1	9.26	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMG1	6.40	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMG2	5.56	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Felixunavirus</i>	BMG5	8.70	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMH2	8.30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMH4	8.34	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMH5	6.18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMK1	5.95	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMK2	8.00	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMK3	7.00	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMKS1	5.26	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BML	7.95	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMM	7.79	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMN2	4.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMN4	8.00	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Dhillonvirus</i>	BMO3	5.32	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

En la matriz se refleja el efecto del fago en el huésped, indicando la presencia de lisis (+) y la ausencia de lisis (-). El fenotipo de susceptibilidad a antibióticos se define mediante las letras S (sensible), I (intermedio) y R (resistente).

3.5. Selección del bacteriófago de interés para la fagoterapia

BME3 no se logró identificar mediante PCR, pero presentó actividad lítica contra cepas de *E. coli* susceptibles a antibióticos. Además, el proceso de purificación del fago BME3 resultó más sencillo en comparación a los fagos identificados dentro del género *Dhillonvirus*. BME3 exhibió una morfología constante en términos de turbidez y tamaño, formando placas claras con un diámetro menor a 1 mm (Figura 2A). Las placas pequeñas pueden atribuirse a la lenta difusión de los bacteriófagos de cabeza grande (*Myoviridae*) a través de la capa superior del agar (Jurczak-Kurek et al., 2016).

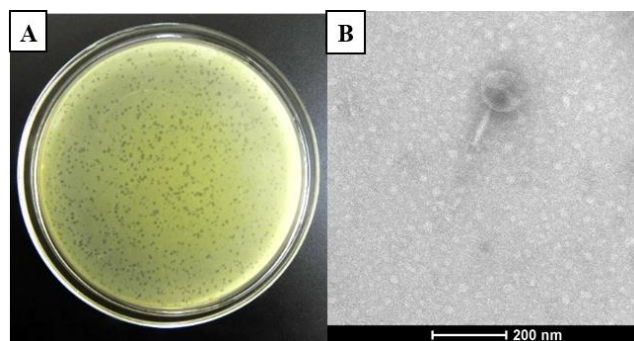


Figura 2. Caracterización del bacteriófago BME3. (A) Morfología de las placas líticas formadas por BME3 frente a *E. coli* ATCC 15597 determinada por el método de doble capa de agar. BME3 produce placas claras con un diámetro inferior a 1 mm. (B) Morfología por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de BME3 con una barra de escala (200 nm). El virión del fago se tiñó con ácido fosfotúngstico al 2% y se observó mediante TEM.

El análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) reveló que el bacteriófago BME3 pertenece a la clase *Caudoviricetes* y presenta morfología *Myoviridae* (Turner et al. 2023). La longitud de la cabeza icosaédrica y la cola contráctil fue aproximadamente 102.64 ± 11.57 nm y 105.00 ± 9.00 nm, respectivamente (Figura 2B).

3.6. Determinación del rango de huésped del bacteriófago BME3

BME3, además de ser capaz de lisar cepas susceptibles a antibióticos tiene la capacidad de infectar *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, BME3 no muestra actividad contra cepas de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. Esta especificidad de BME3 indica su seguridad y potencial uso en aplicaciones específicas, reduciendo el riesgo de afectar otros microorganismos del entorno (Hyman & Abedon, 2010).

3.7. Estabilidad fisicoquímica de BME3

BME3 mostró estabilidad hasta una temperatura máxima de 60°C durante una hora, lo que indica que es termoestable. Sin embargo, se observó una disminución del título del fago a 65°C , y temperaturas superiores a 80°C fueron letales para BME3 (Figura 3A). Del mismo modo, el fago BME3 demostró estabilidad en rangos de pH entre 3 y 11 durante 1 h de incubación a 37°C (Figura 3B). Esta notable estabilidad a las variaciones de pH y temperatura posiciona a BME3 como un candidato óptimo para la fagoterapia, en particular para el control de *E. coli* en entornos de riego, aguas residuales y marinos (Iskender & Soyer, 2023; Namura et al., 2008; Y. Zhang et al., 2022)

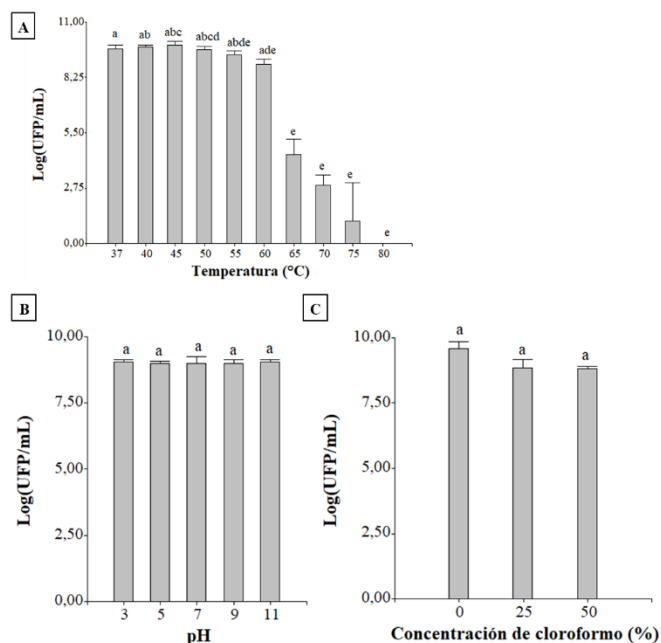


Figura 3. Estabilidad fisicoquímica de BME3 expresada como unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL). Se realizaron experimentos independientes para determinar la estabilidad a la temperatura (A), al pH (B) y al cloroformo (C). Los resultados se presentan como valores medios \pm desviaciones estándar (DE) de tres ensayos independientes. Letras iguales indican que no hay diferencia estadística entre tratamientos ($p > 0.05$), mientras que letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En el tratamiento de sensibilidad al cloroformo, BME3 mantuvo la estabilidad frente a diferentes concentraciones con una disminución no significativa ($p < 0.05$) del título al 92% en presencia de cloroformo a concentraciones del 25% y 50% en comparación con el tratamiento de control (Figura 3C). Esta característica sugiere que la BME3 podría utilizarse eficazmente en procesos de purificación para la eliminación de biomasa sin verse comprometida por la presencia de cloroformo (Luong et al., 2020).

3.8. Anotación del genoma del fago BME3

El genoma completo del bacteriófago BME3 comprende 147 371 pb de ADN de doble cadena y se depositó en el NCBI con el número de acceso PP239276. El genoma tiene un contenido de G+C del 37.5% y 15 ARNt. BME3 presentaba repeticiones terminales directas (DTRs) con un tamaño de 342 pb. Se identificaron un total de 256 CDSs en el genoma, de las cuales 133 CDSs estaban en la cadena positiva y 123 en la negativa. Se determinó la función de 112 CDSs, mientras que las 144 CDSs restantes se definieron como proteínas hipotéticas o proteínas con funciones desconocidas. Dentro del grupo de genes funcionales se encuentran las proteínas de estructura, lisis, regulación, replicación y empaquetamiento (Tabla AIII. 1 y Figura AIII. 1). No se detectaron genes de virulencia ni genes de resistencia a los antibióticos ni genes lisogénicos (integrasa) en el genoma del fago BME3.

ARNt

BME3 alberga 15 ARNts: Met^{CAT}, Met^{CAT}, Leu^{TAG}, Phe^{GAA}, Pro^{TGG}, Gln^{TTG}, Gly^{TCC}, Thr^{TGT}, Asn^{GTT}, Tyr^{GTA}, Lys^{TTT},

Ser^{GCT}, Ser^{TGA}, Leu^{TAA} y Met^{CAT}. Los ARNts desempeñan un papel crítico en la traducción y facilitan la integración del genoma del fago en el cromosoma del hospedador, contribuyendo en última instancia a la compatibilidad del genoma y aumentando la virulencia del fago (Bailly-Bechet et al., 2007).

Genes de empaquetamiento del ADN

El empaquetamiento del ADN genómico implica un complejo de empaquetamiento que comprende varias proteínas: la terminasa, que tiene un dominio ATPasa N-terminal y un dominio nucleasa C-terminal; y el portal, que se localiza en el ápice de la procápside. La actividad nucleasa de la terminasa es cortar el ADN replicado al principio y al final del proceso, mientras que el dominio ATPasa facilita la condensación del ADN empaquetado. La interacción entre la terminasa y la proteína portal permite el almacenamiento del ADN dentro de la cápside (Dasgupta et al., 2024). Además, se predice que el genoma de BME3 contiene la endonucleasa HNH, que mejora la actividad de la terminasa durante el corte del ADN (Kala et al., 2014).

Proteínas de metilación

El fago BME3 alberga 4 CDSs que potencialmente codifican proteínas metiltransferasas, que sirven para proteger el material genómico del fago contra la escisión por las endonucleasas de restricción del huésped (Murphy et al., 2013). El análisis BLASTx predijo que el fago codifica 3 clases de metiltransferasas de ADN huérfanas de tipo II. Estas enzimas catalizan la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina, dando lugar a la generación de productos como nitrógeno-4-metilcitosina, nitrógeno-6-metiladenina y carbono-5-metilcitosina (Wilson, 1991). Para validar estos hallazgos, es necesaria una predicción tridimensional de las proteínas y una comparación del número de dominios conservados. Además, los bacteriófagos han desarrollado mecanismos para contrarrestar los sistemas de restricción del hospedador, asegurando el éxito de la infección mediante la síntesis de bases hipermodificadas en el genoma del fago (Weigele & Raleigh, 2016).

Proteínas del metabolismo de nucleótidos

El genoma del bacteriófago BME3 revela la presencia de ribonucleótido reductasas de clase I (NrdA y NrdB) y de clase III (NrdD y NrdG). Estas enzimas desempeñan un papel crucial en la síntesis de desoxirribonucleótidos y operan en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente (Lundin et al., 2009). En particular, se ha informado de hallazgos similares en el fago rV5 (Kropinski et al., 2013). Otras enzimas implicadas en la síntesis de ADN son la timidilato sintasa y la timidina quinasa (Miller et al., 2003).

Proteínas de replicación y reparación

En el genoma del bacteriófago BME3 se han predicho dos CDSs que codifican la helicasa/primasa y la helicasa de la familia UvrD/Rep. Estas enzimas están implicadas en diversos procesos como la replicación, reparación y recombinación del

ADN. La helicasa/primasa en forma hexamérica junto con la polimerasa y la proteína de unión al ADN monocatenario (ss) se integra en el replisoma o complejo de replicación, facilitando la generación de múltiples copias del material genómico (Lo & Gao, 2021). Cada una de estas enzimas requiere tioredoxina como cofactor, que se deriva de la célula huésped. Mientras tanto, la helicasa de la familia UvrD/Rep, en forma no hexamérica, exhibe una polaridad 3'→ 5' para desenrollar el ADN y su función principal es reparar el material genómico (Yokota, 2022).

Proteínas de lisis

BME3 presenta las siguientes proteínas de lisis: holina, endolisina y complejo spanina. La lisis de la célula procariota es el evento final de la infección, que conduce a la liberación de viriones. La holina perfora la membrana citoplasmática y desencadena la degradación del peptidoglicano mediada por la endolisina (Abeysekera et al., 2022; Cahill & Young, 2019). Tras la degradación del peptidoglicano, el complejo spanina fusiona la membrana interna y externa, lo que provoca la ruptura celular (Berry et al., 2012). Mediante DeepTMHMM se predijeron dos holinas con topología de clase II (61 y 81 residuos), cada una con dos segmentos α -helicoidales transmembrana (Smith et al., 1998). Además, el complejo spanina es codificado por dos genes separados, uno para la lipoproteína de la membrana externa (o-spanina) y otro para la proteína de la membrana interna (i-spanina) (Berry et al., 2010). Las endolisinas de fagos tienen un gran potencial para controlar los patógenos bacterianos e incluso combatir la formación de biopelículas, estas enzimas no son tóxicas para los humanos (Liu et al., 2023).

Proteínas de morfogénesis

Las proteínas estructurales tienen tres segmentos principales: las proteínas de la cápside, de la cola y de la placa base. La cápside incluye la proteína principal de la cápside, la proteína de decoración de la cabeza y la proteína de andamiaje. Las proteínas que integran la estructura de la cola son la vaina contráctil, el tubo central y la cinta métrica. Cabe destacar que la longitud de la proteína cinta métrica se correlaciona con la longitud de la cola; phi92 y BME3 presentan el mismo número de residuos (659 aa). En cuanto a la estructura de la placa base, está compuesta por fibras de cola y picos de cola (Schwarzer et al., 2015). Estas proteínas tienen un porcentaje de identidad superior al 98% (cobertura del 96%) con bacteriófagos como phi92, muut, PHB05, alia y PDO6, a excepción de la proteína de la púa de la cola.

3.9. Análisis filogenético

La búsqueda BLAST realizada en NCBI reveló el 98% de identidad entre el fago BME3 y las secuencias genómicas de fagos similares a phi92 como KMB37, Paula, inny, alia, EmilieFrey, PATM, PHB05, arall, y muut; con una cobertura de secuencia entre 93% y 97%. Mediante el análisis de VIRIDIC, la similitud intergenómica del fago BME3 y otras especies del género *Justusliebigvirus* fue menor al 95%, a excepción de la secuencia genómica Paula (95.2%) (Figura 4).

El árbol filogenético generado por el sitio web VICTOR (a nivel de nucleótidos) confirmó que BME3 corresponde a una especie del género *Justusliebigvirus*. Los fagos como

nepoznato, ESCO5, ZCKP1 y anhybsys se agruparon dentro del género *Phapecoctavirus*. Ambos géneros pertenecen a la subfamilia *Stephanstirmvirinae* (Figura 5).

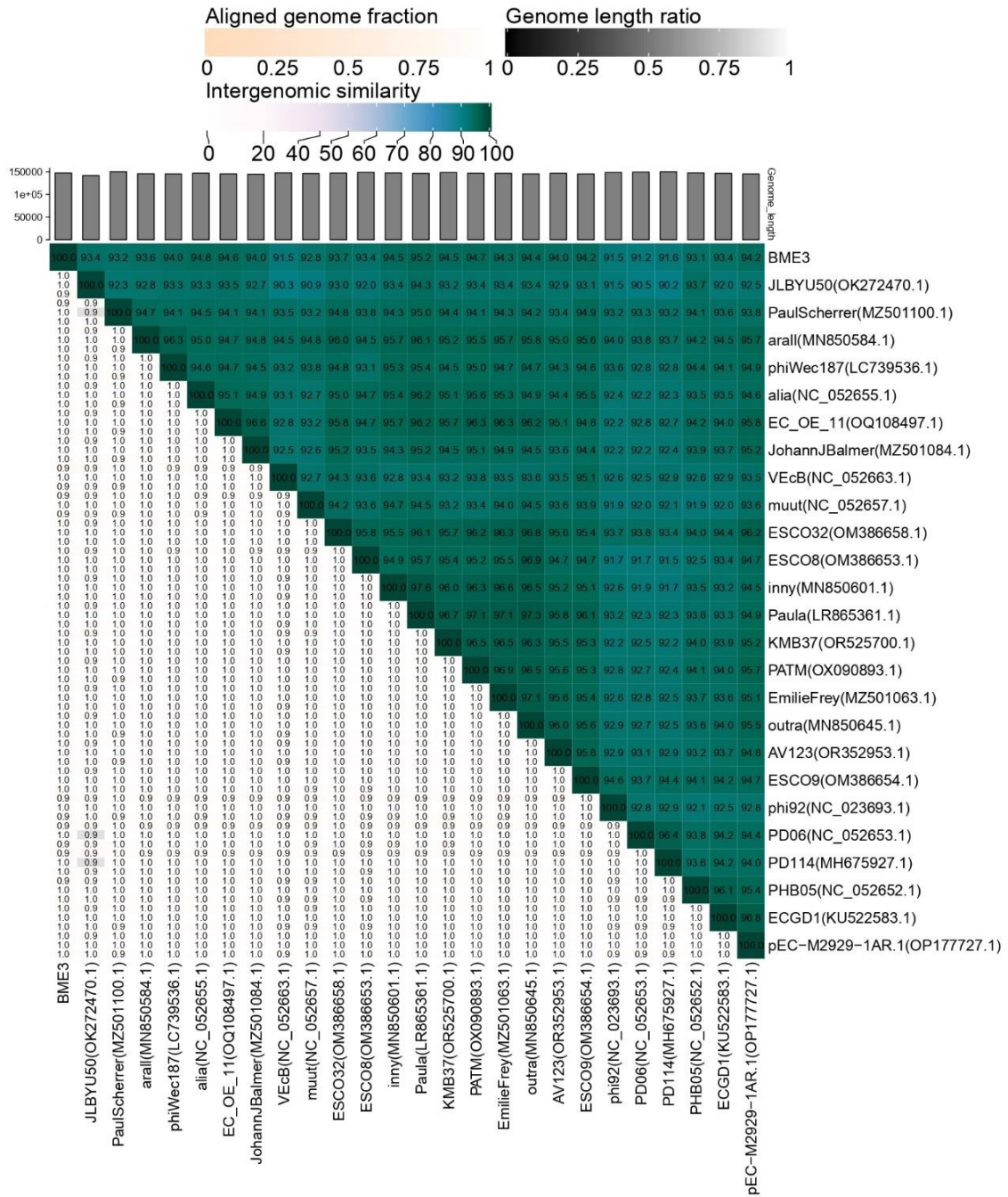


Figura 4. Mapa de calor VIRIDIC de BME3 con los 27 homólogos más cercanos identificados por BLAST. La mitad derecha muestra la similitud intergenómica entre los fagos, donde la intensidad del color indica el nivel de similitud. La mitad inferior izquierda muestra el porcentaje de cobertura del primer fago, junto con el porcentaje de alineación y el porcentaje de cobertura del segundo fago.

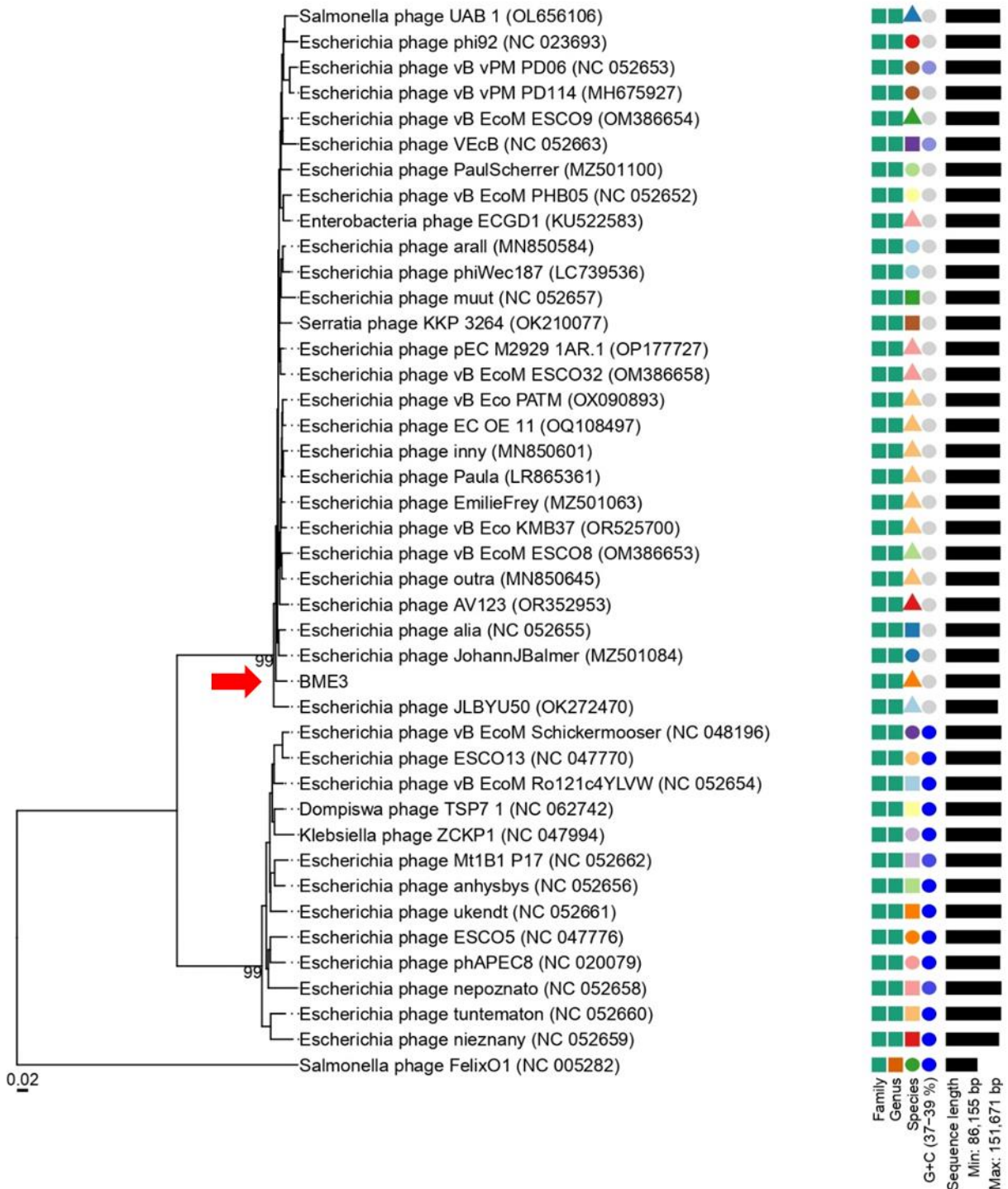


Figura 5. Árbol filogenético basado en el genoma completo de BME3 y parientes cercanos generado por el sitio web VICTOR. Árbol filogenético de distancia Genoma-BLAST (GBDP) inferido utilizando la fórmula D0 (nucleótido) y con un soporte medio del 6%. Los números sobre las ramas son valores de soporte pseudo-bootstrap GBDP de 100 réplicas. Las longitudes de las ramas de los árboles VICTOR resultantes están escaladas en función de la fórmula de distancia respectiva. La flecha señala BME3.

El fago BME3, junto con otros miembros del género *Justusliebigvirus*, ha demostrado la capacidad de lisar enterobacterias, incluidas cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Nicolas et al., 2023; Schwarzer et al., 2012). Esta actividad lítica se extiende a cepas encapsuladas y no encapsuladas, lo cual se atribuye a su aparato de adsorción multivariante, que se compara con una navaja suiza nanométrica debido a la disposición de las fibras

de la cola y púas de la cola en la placa base (Schwarzer et al., 2012).

En la comparación del genoma, se observó que los genes menos conservados son los que codifican para proteínas estructurales, en particular proteínas de unión a receptores, como la proteína de la púa y fibra de la cola (Figura AIV. I). La púa de la cola consta de dos CDSs con longitudes de 102 y

552 aminoácidos, respectivamente. El primer segmento muestra similitud con miembros del género *Justusliebigvirus* (Paul Scherrer, con 79% de identidad y 98% de cobertura) y *Phapecoetavirus* (ZCKP1, con 100% de identidad y 98% de cobertura). Mientras tanto, el segundo segmento muestra homología con las proteínas de unión a receptores, GenBank Acc.No. MDB8464820.1, con una cobertura del 91% y una identidad del 82.7% y GenBank Acc. WP_252514376.1, con una cobertura del 91% y una identidad del 82.68%. Además, el CDS de la fibra de la cola tiene una longitud de 939 aminoácidos. El fago BME3 comparte similitudes con otros fagos del género *Justusliebigvirus*, como PHB05, phiWec18, alia, JLBYU50, Paula, inny y Paul Scherrer; excepto con el fago phi92. Los resultados de BLASTx indican una cobertura y un porcentaje de identidad superiores al 99% y al 86%, respectivamente.

Los PBR tienen una estructura homotrimérica y generalmente poseen dos dominios: N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal facilita la unión del PBR a la placa base del fago y puede reutilizarse entre los miembros de la familia. Por el contrario, el dominio C-terminal puede albergar un centro catalítico con actividad depolimerasa e incluir chaperonas responsables del correcto plegamiento de la proteína y de facilitar la multimerización (Dunne et al., 2021; Latka et al., 2019; Müller et al., 2008; Ouyang et al., 2024).

La púa de la cola, debido a su actividad despolimerasa pueden degradar la cápsula bacteriana o LPS, lo que permite al fago acceder a la membrana bacteriana e iniciar la infección (Dunne et al., 2021; Schwarzer et al., 2015; Stummeyer et al., 2006). Durante la infección, las fibras laterales de la cola del fago se unen a los glicanos de la superficie del huésped o a antígenos comunes enterobacterianos. A continuación, las fibras cortas de la cola reconocen la glucosa del núcleo externo del LPS provocando la inyección del genoma del fago en la célula bacteriana (Maffei et al., 2021).

El fago BME3, al igual que phi92, es un fago polivalente que posee una estructura ramificada de PBR. Cada PBR puede reconocer diferentes receptores e incrementar el rango de huésped (Ouyang et al., 2024; Pas et al., 2023). BME3 tiene dos púas de cola: uno comparte homología con phi92 y se conoce como “colanidasa”, que probablemente degrada el ácido colánico que constituye la cápsula del huésped (Schwarzer et al., 2012). Por el contrario, la otra púa de la cola carece de homología con la enzima endosialidasa (ENDO92), responsable de degradar la cápsula compuesta de ácido siálico con enlaces α -2,8 y α -2,9 (Schwarzer et al., 2015). Del mismo modo, esta última enzima muestra una baja conservación entre los miembros del género *Justusliebigvirus* (Olsen et al., 2020).

Los resultados de BLASTx indican que BME3 codifica una despolimerasa, posiblemente una endorhamnosidasa (endoglicosidasa), debido a la similitud con la proteína de la púa de la cola del fago P22 de *Salmonella* (Steinbacher et al., 1997). La intercambiabilidad del sitio activo entre una endorhamnosidasa y una endosialidasa es factible y puede ocurrir a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes (Chen et al., 2014; Pas et al., 2023; Stummeyer et al., 2006; Walter et al., 2008).

3.10. Detección de BME3 por PCR

Los dos conjuntos de cebadores diseñados, uno para amplificar el gen de la proteína de la cápside y el otro para el gen de la ADN polimerasa, respectivamente, permiten la detección del fago BME3. Además, se obtuvieron resultados favorables utilizando ambos métodos de extracción de ADN molde (Figura 6).

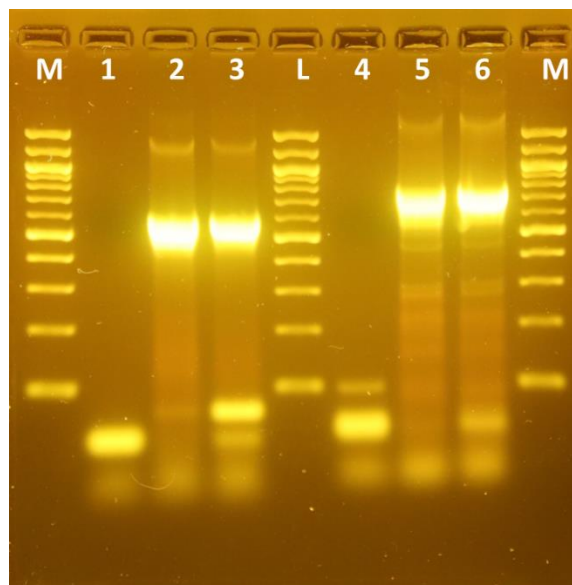


Figura 6. Detección de BME3 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se muestra la amplificación de fragmentos correspondientes a la proteína de la cápside mayor (MCP) y a la polimerasa (Pol). L: Marcador de peso molecular (100-2000 pb), Carriles 1 y 4: control negativo, Carriles 2 y 3: 629 pb (MCP), Carriles 5 y 6: 826 pb (Pol). Carriles 2 y 5: ADN extraído por el método de Born et al. (2019); Carriles 3 y 6: ADN extraído por un método modificado de Jofre & Muniesa (2020).

4. CONCLUSIONES

A partir de muestras de agua y sedimentos provenientes del Estero Salado, ubicado en la ciudad de Guayaquil- Ecuador, se logró aislar bacteriófagos líticos pertenecientes a los géneros *Felixunavirus*, *Dhillonvirus* y *Justusliebigvirus*. Los fagos pertenecientes a los dos últimos géneros pueden infectar cepas de *E. coli* con diferente fenotipo de susceptibilidad a antibióticos, pero solo el bacteriófago BME3 logró lisar la cepa de *Salmonella typhimurium*.

El fago BME3 tiene una morfología *Myoviridae*, es termoestable, resistente a variaciones de pH y no es sensible al cloroformo. Su genoma carece de genes de resistencia a antibióticos, toxinas y de lisogenia. Estas características sugieren al fago BME3 como una opción prometedora para la fagoterapia, destinado a controlar la diseminación ambiental de resistencia bacteriana a antibióticos.

5. REFERENCIAS

Abedon, S. T. (2018). Detection of Bacteriophages: Phage Plaques. In *Bacteriophages* (pp. 1–32). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_16-1

- Abeysekera, G. S., Love, M. J., Manners, S. H., Billington, C., & Dobson, R. C. J. (2022). Bacteriophage-encoded lethal membrane disruptors: Advances in understanding and potential applications. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1044143>
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Mushegian, A. R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Gorbalenya, A. E., & Davison, A. J. (2017). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology*, *162*(8), 2505–2538. <https://doi.org/10.1007/S00705-017-3358-5/TABLES/7>
- Adriaenssens, E. M., Ceysens, P. J., Dunon, V., Ackermann, H. W., van Vaerenbergh, J., Maes, M., de Proft, M., & Lavigne, R. (2011). Bacteriophages LIMelight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, Belonging to the “phiKMV-Like Viruses.” *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(10), 3443. <https://doi.org/10.1128/AEM.00128-11>
- Alanís, A. J. (2005). Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*, *36*(6), 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., Hernandez-Koutoucheva, A., Sharma, A. N., Bordeleau, E., Pawlowski, A. C., Zubyk, H. L., Dooley, D., Griffiths, E., Maguire, F., Winsor, G. L., Beiko, R. G., Brinkman, F. S., Hsiao, W. W., Domselaar, G. V., McArthur, A. G. (2019). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- American Type Culture Collection. (n.d.). *Escherichia coli (Migula) Castellani y Chalmers 25922TM*. Retrieved May 25, 2024, from <https://www.atcc.org/products/25922>
- Bailly-Bechet, M., Vergassola, M., & Rocha, E. (2007). Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. *Genome Research*, *17*(10), 1486–1495. <https://doi.org/10.1101/gr.6649807>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M. H., & Zheng, C. (2018). *Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review*. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
- Berry, J., Rajaure, M., Pang, T., & Young, R. (2012). The Spanin Complex Is Essential for Lambda Lysis. *Journal of Bacteriology*, *194*(20), 5667–5674. <https://doi.org/10.1128/JB.01245-12>
- Berry, J., Savva, C., Holzenburg, A., & Young, R. (2010). The lambda spanin components Rz and Rz1 undergo tertiary and quaternary rearrangements upon complex formation. *Protein Science*, *19*(10), 1967–1977. <https://doi.org/10.1002/pro.485>
- Bertozzi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, *363*(4), fnw002. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- Bobate, S., Mahalle, S., Dafale, N. A., & Bajaj, A. (2023). Emergence of environmental antibiotic resistance: Mechanism, monitoring and management. *Environmental Advances*, *13*, 100409. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100409>
- Bolocan, A. S., Callanan, J., Forde, A., Ross, P., & Hill, C. (2016). Phage therapy targeting *Escherichia coli* a story with no end? *FEMS Microbiology Letters*, *363*(22), fnw256. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw256>
- Born, Y., Knecht, L. E., Eigenmann, M., Bolliger, M., Klumpp, J., & Fieseler, L. (2019). A major-capsid-protein-based multiplex PCR assay for rapid identification of selected virulent bacteriophage types. *Archives of Virology*, *164*(3), 819–830. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04148-6>
- Bowen, M. (2013). Antimicrobial stewardship: Time for change. *Equine Veterinary Journal*, *45*(2), 127–129. <https://doi.org/10.1111/EVJ.12041>
- Cahill, J., & Young, R. (2019). *Phage Lysis: Multiple Genes for Multiple Barriers* (pp. 33–70). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>
- Calero-Cáceres, W., Tadesse, D., Jaramillo, K., Villavicencio, X., Mero, E., Lalaleo, L., Welsh, C., Villacís, J. E., Quentin, E., Parra, H., Ramirez, M. S., Harries, A. D., & Balcázar, J. L. (2022). Characterization of the genetic structure of *mcr-1* gene among *Escherichia coli* isolates recovered from surface waters and sediments from Ecuador. *Science of The Total Environment*, *806*, 150566. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150566>
- Calero-Cáceres, W., Ye, M., & Balcázar, J. L. (2019). Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, *27*(7), 570–577. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2019.02.008>
- Chan, P. P., Lin, B. Y., Mak, A. J., & Lowe, T. M. (2021). tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, *49*(16), 9077–9096. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab688>
- Chen, C., Bales, P., Greenfield, J., Heselpoth, R. D., Nelson, D. C., & Herzberg, O. (2014). Crystal Structure of ORF210 from *E. coli* O157:H1 Phage CBA120 (TSP1), a Putative Tailspike Protein. *PLoS ONE*, *9*(3), e93156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093156>
- Chénard, C., Chan, A. M., Vincent, W. F., & Suttle, C. A. (2015). Polar freshwater cyanophage S-EIV1 represents a new widespread evolutionary lineage of phages. *The*

- ISME Journal*, 9(9), 2046. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2015.24>
- Cui, J. qi, Liu, W. hua, Zang, Y. xin, Zhang, C., Zou, L., Sun, H. zhi, Pan, Q., & Ren, H. ying. (2022). Characterization and complete genome analysis of a bacteriophage vB_EcoM_DE7 infecting donkey-derived *Escherichia coli*. *Virus Research*, 321. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2022.198913>
- Dasgupta, S., Thomas, J. A., & Ray, K. (2024). Mechanism of Viral DNA Packaging in Phage T4 Using Single-Molecule Fluorescence Approaches. *Viruses*, 16(2), 192. <https://doi.org/10.3390/v16020192>
- Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C., & Salzberg, S. L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, 23(6), 673–679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009>
- Dunne, M., Prokhorov, N. S., Loessner, M. J., & Leiman, P. G. (2021). Reprogramming bacteriophage host range: design principles and strategies for engineering receptor binding proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.02.006>
- Garneau, J. R., Depardieu, F., Fortier, L.-C., Bikard, D., & Monot, M. (2017). PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Scientific Reports*, 7(1), 8292. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07910-5>
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 47(3), 137–146.
- Gilchrist, C. L. M., & Chooi, Y.-H. (2021). clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, 37(16), 2473–2475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007>
- Golomidova, A. K., Kulikov, E. E., Babenko, V. V., Ivanov, P. A., Prokhorov, N. S., & Letarov, A. V. (2019). *Escherichia coli* bacteriophage Gostya9, representing a new species within the genus T5virus. *Archives of Virology*, 164(3), 879–884. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4113-2>
- Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>
- Hallgren, J., Tsigos, K. D., Damgaard Pedersen, M., Juan, J., Armenteros, A., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N., & Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*, 212–213, 38–58. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.007>
- Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). *Annual Review of Medicine Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections*. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219>
- Hu, Y., Tong, S., Li, P., An, X., Song, L., Fan, H., & Tong, Y. (2021). Characterization and genome sequence of the genetically unique *Escherichia coli* bacteriophage vB_EcoM_IME392. *Archives of Virology*, 166(9), 2505–2520. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05160-5>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). *Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance* (Vol. 70, pp. 217–248). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)70007-1)
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2023). *Current ICTV Taxonomy Release*. <https://ictv.global/taxonomy>
- Iskender, I., & Soyer, Y. (2023). Phage Therapy Against Pathogenic *Escherichia coli* (O104:H4, O157:H7, and O26) Strains in Irrigation Water During Garden Cress (*Lepidium sativum* Linn.) Vegetation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 20(12), 553–562. <https://doi.org/10.1089/fpd.2023.0020>
- Islam, M. R., Ogura, Y., Asadulghani, M., Ooka, T., Murase, K., Gotoh, Y., & Hayashi, T. (2012). A sensitive and simple plaque formation method for the Stx2 phage of *Escherichia coli* O157:H7, which does not form plaques in the standard plating procedure. *Plasmid*, 67(3), 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.12.001>
- Jasna, V., Parvathi, A., & Dash, A. (2018). *Genetic and functional diversity of double-stranded DNA viruses in a tropical monsoonal estuary, India OPEN*. 8, 16036. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34332-8>
- Jiang, L., Zhai, W., Wang, J., Li, G., Zhou, Z., Li, B., & Zhuo, H. (2023). Antibiotics and antibiotic resistance genes in the water sources of the Wuhan stretch of the Yangtze River: Occurrence, distribution, and ecological risks. *Environmental Research*, 239, 117295. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117295>
- Jofre, J., & Muniesa, M. (2020). *Bacteriophage Isolation and Characterization: Phages of Escherichia coli* (pp. 61–79). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_4
- Jurczak-Kurek, A., Gasior, T., Nejman-Faleńczyk, B., Bloch, S., Dydecka, A., Topka, G., Necel, A., Jakubowska-Deredas, M., Narajczyk, M., Richert, M., Mieszkowska, A., Wróbel, B., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2016). Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep34338>
- Kakasis, A., & Panitsa, G. (2019). Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>
- Kala, S., Cumby, N., Sadowski, P. D., Hyder, B. Z., Kanelis, V., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2014). HNH proteins are a widespread component of phage DNA packaging machines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 6022–6027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320952111>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay (pp. 69–76). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7
- Kropinski, A. M., Waddell, T., Meng, J., Franklin, K., Ackermann, H.-W., Ahmed, R., Mazzocco, A., Yates, J., Lingohr, E. J., & Johnson, R. P. (2013). The host-range, genomics and proteomics of Escherichia coli O157:H7 bacteriophage rV5. *Virology Journal*, 10(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-76>
- Kutter, E. (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating (pp. 141–149). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_14
- Landry, E. F., & Zsigray, R. M. (1980). Effects of Calcium on the Lytic Cycle of Bacillus subtilis Phage 41c. *Journal of General Virology*, 51(1), 125–135. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-1-125>
- Laslett, D. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 11–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh152>
- Latka, A., Leiman, P. G., Drullis-Kawa, Z., & Briers, Y. (2019). Modeling the Architecture of Depolymerase-Containing Receptor Binding Proteins in Klebsiella Phages. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02649>
- Liao, Y.-T., Zhang, Y., Salvador, A., Harden, L. A., & Wu, V. C. H. (2022). Characterization of a T4-like Bacteriophage vB_EcoM-Sa451w 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>
- Liu, B., Guo, Q., Li, Z., Guo, X., & Liu, X. (2023). Bacteriophage Endolysin: A Powerful Weapon to Control Bacterial Biofilms. *The Protein Journal*, 42(5), 463–476. <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10139-z>
- Lo, C.-Y., & Gao, Y. (2021). DNA Helicase–Polymerase Coupling in Bacteriophage DNA Replication. *Viruses*, 13(9), 1739. <https://doi.org/10.3390/v13091739>
- Luepke, K. H., Suda, K. J., Boucher, H., Russo, R. L., Bonney, M. W., Hunt, T. D., & Mohr, J. F. (2017). Past, Present, and Future of Antibacterial Economics: Increasing Bacterial Resistance, Limited Antibiotic Pipeline, and Societal Implications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 37(1), 71–84. <https://doi.org/10.1002/phar.1868>
- Lukman, C., Yonathan, C., Magdalena, S., & Waturangi, D. E. (2020). Isolation and characterization of pathogenic Escherichia coli bacteriophages from chicken and beef offal. *BMC Research Notes*, 13(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4859-y>
- Lundin, D., Torrents, E., Poole, A. M., & Sjöberg, B.-M. (2009). RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics*, 10(1), 589. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-589>
- Luong, T., Salabarria, A. C., Edwards, R. A., & Roach, D. R. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature Protocols* 2020 15:9, 15(9), 2867–2890. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0346-0>
- Maffei, E., Shaidullina, A., Burkolter, M., Heyer, Y., Estermann, F., Druelle, V., Sauer, P., Willi, L., Michaelis, S., Hilbi, H., Thaler, D. S., & 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>
- Mann, N. H. (2005). The Third Age of Phage. *PLoS Biology*, 3(5), e182. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030182>
- Manohar, P., Tamhankar, A. J., Lundborg, C. S., & Ramesh, N. (2018). Isolation, characterization and in vivo efficacy of Escherichia phage myPSH1131. *PLOS ONE*, 13(10), e0206278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206278>
- Marathe, N. P., Pal, C., Gaikwad, S. S., Jonsson, V., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2017). Untreated urban waste contaminates Indian river sediments with resistance genes to last resort antibiotics. *Water Research*, 124, 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.060>
- Mattila, S., Ruotsalainen, P., & Jalasvuori, M. (2015). On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01271>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2017). VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics*, 33(21), 3396–3404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bt1440>
- Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., & Rüger, W. (2003). Bacteriophage T4 Genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 86–156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.86-156.2003>
- Mirzaei, M. K., & Nilsson, A. S. (2015). Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLOS ONE*, 10(3), e0118557. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0118557>
- Moraru, C., Varsani, A., & Kropinski, A. M. (2020). VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses*, 12(11), 1268. <https://doi.org/10.3390/v12111268>
- Müller, J. J., Barbirz, S., Heinle, K., Freiberg, A., Seckler, R., & Heinemann, U. (2008). An Intersubunit Active Site between Supercoiled Parallel β Helices in the Trimeric Tailspike Endorhamnosidase of Shigella flexneri Phage Sf6. *Structure*, 16(5), 766–775. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.01.019>
- Murphy, J., Mahony, J., Ainsworth, S., Nauta, A., & van Sinderen, D. (2013). Bacteriophage Orphan DNA Methyltransferases: Insights from Their Bacterial Origin, Function, and Occurrence. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7547–7555. <https://doi.org/10.1128/AEM.02229-13>

- Nair, A., Ghugare, G. S., & Khairnar, K. (2022). An Appraisal of Bacteriophage Isolation Techniques from Environment. *Microbial Ecology*, *83*(3), 519–535. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01782-z>
- Namura, M., Hijikata, T., Miyanaga, K., & Tanji, Y. (2008). Detection of *Escherichia coli* with Fluorescent Labeled Phages That Have a Broad Host Range to *E. coli* in Sewage Water. *Biotechnology Progress*, *24*(2), 481–486. <https://doi.org/10.1021/bp070326c>
- Nicolas, M., Trotureau, A., Culot, A., Moodley, A., Atterbury, R., Wagemans, J., Lavigne, R., Velge, P., & Schouler, C. (2023). Isolation and Characterization of a Novel Phage Collection against Avian-Pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, *11*(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04296-22>
- Olsen, N. S., Forero-Junco, L., Kot, W., & Hansen, L. H. (2020). Exploring the Remarkable Diversity of Culturable *Escherichia coli* Phages in the Danish Wastewater Environment. *Viruses*, *12*(9), 986. <https://doi.org/10.3390/v12090986>
- O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*. Rev. Antimicrob. Resist. . <http://amr-review.org/>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Ouyang, R., Ongenae, V., Muok, A., Claessen, D., & Briegel, A. (2024). Phage fibers and spikes: a nanoscale Swiss army knife for host infection. *Current Opinion in Microbiology*, *77*, 102429. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2024.102429>
- Pan, L., Li, D., Sun, Z., Lin, W., Hong, B., Qin, W., Xu, L., Liu, W., Zhou, Q., Wang, F., Cai, R., Qian, M., & Tong, Y. (2022). First Characterization of a Hafnia Phage Reveals Extraordinarily Large Burst Size and Unusual Plaque Polymorphism. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754331>
- Park, D.-W., Lim, G., Lee, Y., & Park, J.-H. (2020). Characteristics of lytic phage vB_EcoM-ECP26 and reduction of shiga-toxin producing *Escherichia coli* on produce romaine. *Applied Biological Chemistry*, *63*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00502-4>
- Pas, C., Latka, A., Fieseler, L., & Briers, Y. (2023). Phage tailspike modularity and horizontal gene transfer reveals specificity towards *E. coli* O-antigen serogroups. *Virology Journal*, *20*(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02138-4>
- Poxleitner, M., Pope, W., Jacob-Sera, D., Sivanathan, V., & Hatfull, G. (2018). *Phage Discovery Guide*. Howard Hughes Medical Institute.
- Raffatelli, M. (2018). Learning from bacterial competition in the host to develop antimicrobials. *Nature Medicine*, *24*(8), 1097–1103. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0145-0>
- Ramesh, N., Archana, L., Madurantakam Royam, M., Manohar, P., & Eniyan, K. (2019). Effect of various bacteriological media on the plaque morphology of *Staphylococcus* and *Vibrio* phages. *Access Microbiology*, *1*(4). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000036>
- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Fiol, F. S. Del, Jozala, A., Chaud, M. V, Vila, M. M. D. C., Teixeira, J. A., & Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research*, *191*, 51–80. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008>
- Rose, P. W., Prlić, A., Bi, C., Bluhm, W. F., Christie, C. H., Dutta, S., Green, R. K., Goodsell, D. S., Westbrook, J. D., Woo, J., Young, J., Zardecki, C., Berman, H. M., Bourne, P. E., & Burley, S. K. (2015). The RCSB Protein Data Bank: views of structural biology for basic and applied research and education. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D345–D356. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1214>
- Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(12), 777–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schwarzer, D., Browning, C., Stummeyer, K., Oberbeck, A., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., & Leiman, P. G. (2015). Structure and biochemical characterization of bacteriophage phi92 endosialidase. *Virology*, *477*, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.002>
- Schwarzer, D., Buettner, F. F. R., Browning, C., Nazarov, S., Rabsch, W., Bethe, A., Oberbeck, A., Bowman, V. D., Stummeyer, K., Mühlenhoff, M., Leiman, P. G., & Gerardy-Schahn, R. (2012). A Multivalent Adsorption Apparatus Explains the Broad Host Range of Phage phi92: a Comprehensive Genomic and Structural Analysis. *Journal of Virology*, *86*(19), 10384–10398. <https://doi.org/10.1128/JVI.00801-12>
- Slobodníková, L., Markusová, B., Kajsík, M., Andrezál, M., Straka, M., Liptáková, A., & Drahovská, H. (2021). Characterization of Anti-Bacterial Effect of the Two New Phages against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Viruses*, *13*(7), 1348. <https://doi.org/10.3390/v13071348>
- Smith, D. L., Struck, D. K., Scholtz, J. M., & Young, R. (1998). Purification and Biochemical Characterization of the Lambda Holin. *Journal of Bacteriology*, *180*(9), 2531–2540. <https://doi.org/10.1128/JB.180.9.2531-2540.1998>
- Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Budisa, N., Weintraub, A., Seckler, R., & Huber, R. (1997). Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. *Journal of Molecular Biology*, *267*(4), 865–880. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0922>
- Stummeyer, K., Schwarzer, D., Claus, H., Vogel, U., Gerardy-Schahn, R., & Mühlenhoff, M. (2006). Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. *Molecular Microbiology*, *60*(5), 1123–1135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05173.x>

- Summers, Williams. (1999). *Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale Univ. Press.
- Sváb, D., Falgenhauer, L., Papp, V., Rohde, M., Chakraborty, T., & Tóth, I. (2022). Characterisation of new anti-O157 bacteriophages of bovine origin representing three genera. *Archives of Microbiology*, 204(4). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02839-4>
- Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., van Zyl, L. J., Aziz, R. K., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., Kropinski, A. M., Barylski, J., Brister, J. R., Chanisvili, N., Edwards, R. A., Enault, F., Gillis, A., Knezevic, P., Krupovic, M., ... Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 74. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05694-2>
- United States Environmental Protection Agency. (2001). *Method 1602: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure*. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1002D21.TXT?ZyActionD>
- Van Puyvelde, S., Deborggraeve, S., & Jacobs, J. (2018). Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(2), 132–134. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30704-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30704-1)
- Walter, M., Fiedler, C., Grassl, R., Biebl, M., Rachel, R., Hermo-Parrado, X. L., Llamas-Saiz, A. L., Seckler, R., Miller, S., & van Raaij, M. J. (2008). Structure of the Receptor-Binding Protein of Bacteriophage Det7: a Podoviral Tail Spike in a Myovirus. *Journal of Virology*, 82(5), 2265–2273. <https://doi.org/10.1128/JVI.01641-07>
- Wang, L., Tan, Y., Liao, Y., Li, L., Han, K., Bai, H., Cao, Y., Li, J., Gong, Y., Wang, X., & Peng, H. (2022). Isolation, Characterization and Whole Genome Analysis of an Avian Pathogenic Escherichia coli Phage vB_EcoS_GN06. *Veterinary Sciences*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/VETSCI9120675>
- Wang, R. H., Yang, S., Liu, Z., Zhang, Y., Wang, X., Xu, Z., Wang, J., & Li, S. C. (2024). PhageScope: a well-annotated bacteriophage database with automatic analyses and visualizations. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D756–D761. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad979>
- Weigele, P., & Raleigh, E. A. (2016). Biosynthesis and Function of Modified Bases in Bacteria and Their Viruses. *Chemical Reviews*, 116(20), 12655–12687. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00114>
- Wilson, G. G. (1991). Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acids Research*, 19(10), 2539–2566. <https://doi.org/10.1093/nar/19.10.2539>
- Yazdi, M., Bouzari, M., Ghaemi, E. A., & Shahin, K. (2020). Isolation, Characterization and Genomic Analysis of a Novel Bacteriophage VB_EcoS-Golestan Infecting Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolated from Urinary Tract Infection. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63048-x>
- Ye, M., Sun, M., Huang, D., Zhang, Z., Zhang, H., Zhang, S., Hu, F., Jiang, X., & Jiao, W. (2019). A review of bacteriophage therapy for pathogenic bacteria inactivation in the soil environment. *Environment International*, 129, 488–496. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.05.062>
- Ye, M., Sun, M., Zhao, Y., Jiao, W., Xia, B., Liu, M., Feng, Y., Zhang, Z., Huang, D., Huang, R., Wan, J., Du, R., Jiang, X., & Hu, F. (2018). Targeted inactivation of antibiotic-resistant Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa in a soil-lettuce system by combined polyvalent bacteriophage and biochar treatment. *Environmental Pollution*, 241, 978–987. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.070>
- Yin, J. (1991). A quantifiable phenotype of viral propagation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174(2), 1009–1014. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91519-I](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91519-I)
- Yokota, H. (2022). Quantitative and kinetic single-molecule analysis of DNA unwinding by <i>Escherichia coli</i> UvrD helicase. *Biophysics and Physicobiology*, 19(0), e190006. <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v19.0006>
- Yutin, N., Makarova, K. S., Gussow, A. B., Krupovic, M., Segall, A., Edwards, R. A., & Koonin, E. V. (2017). Discovery of an expansive bacteriophage family that includes the most abundant viruses from the human gut. *Nature Microbiology*, 3(1), 38–46. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0053-y>
- Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2017). PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), 2764–2768. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>
- Zhang, C., Du, X. P., Zeng, Y. H., Zhu, J. M., Zhang, S. J., Cai, Z. H., & Zhou, J. (2021). The communities and functional profiles of viroplankton along a salinity gradient in a subtropical estuary. *Science of the Total Environment*, 759. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.143499>
- Zhang, Y., Huang, H.-H., Ma, L. Z., Masuda, Y., Honjoh, K., & Miyamoto, T. (2022). Inactivation of mixed Escherichia coli O157:H7 biofilms on lettuce by bacteriophage in combination with slightly acidic hypochlorous water (SAHW) and mild heat treatment. *Food Microbiology*, 104, 104010. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104010>
- Zhao, Y., Ye, M., Zhang, X., Sun, M., Zhang, Z., Chao, H., Huang, D., Wan, J., Zhang, S., Jiang, X., Sun, D., Yuan, Y., & Hu, F. (2019). Comparing polyvalent bacteriophage and bacteriophage cocktails for controlling antibiotic-resistant bacteria in soil-plant system. *Science of The Total Environment*, 657, 918–925. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.457>

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I	19
FICHA TÉCNICA N.º 1	19
Aislamiento de bacteriófagos	19
FICHA TÉCNICA N.º 2	21
Identificación molecular de bacteriófagos	21
FICHA TÉCNICA N.º 3	23
Caracterización fenotípica del bacteriófago BME3	23
FICHA TÉCNICA N.º 4	24
Caracterización fisicoquímica del bacteriófago BME3	24
ANEXO II	33
Tabla AII. 1. Información de las cepas bacterianas utilizadas para evaluar la actividad lítica de los fagos aislados	33
ANEXO III	35
Figura AIII. 1. Mapa del genoma del fago BME3	35
Tabla AIII. 1. Anotaciones de CDS del genoma del bacteriófago BME3	36
ANEXO IV	51
Figura AIV 1.-Comparación del genoma de los bacteriófagos phi92, BME3 y VEcB con Clinker	51

ANEXO I

FICHA TÉCNICA N.º 1

AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS

Muestra: Bacteriófagos aislados a partir de muestras de agua y sedimentos provenientes del Estero Salado

Objetivo: Seleccionar bacteriófagos con actividad lítica contra la cepa de *Escherichia coli* ATCC 15597 aislados de muestras de agua y sedimentos provenientes del Estero Salado.

Desarrollo:

En la Figura FTI. 1, se presentan los puntos de muestreo en el Estero Salado, estuario ubicado en la ciudad de Guayaquil.



Figura FTI. 1. Lugares de muestreo de agua y sedimentos en el Estero Salado

En la Tabla FTI. 1, se presenta el aislamiento de bacteriófagos a partir de muestras de agua ambientales del Estero Salado mediante el método de capa simple. Se reportó un alto título de fago en la muestra de agua del punto K, correspondiente a una zona urbana. Mientras, en muestras de sedimentos no se logró recuperar fagos en el punto E, J, L-O.

Tabla FTI. 1. Aislamiento de bacteriófagos de Estero Salado

Zona de muestreo	Características de la zona	Zona	UFP/100mL de agua	UFP/100 g de sedimentos
A	Kennedy Norte (Bosque salado)	Urbana	62	130
B	Puente Policentro	Urbana y poco comercial	185	260

C	Puente Federación	Urbana y recreacional	22	240
D	Puente Albán Borja	Urbana y comercial	168	160
E	Puente Zigzag	Comercial	58	0
F	Puente Velero	Zona recreacional	6	20
G	Estadio Barcelona	Urbano marginal y recreacional	201	70
H	Puente Portete	Comercial-recreacional y urbano marginal	98	20
I	Estero Tres Bocas	Urbano y manglar	38	20
J	Estero Palanqueado	Residencial	170	0
K	Puente Liza	Residencial	1776	100
L	Puerto Muerto	Urbano	99	0
M	Parque Lineal Fertisa	Urbano 75% y 25% manglar	14	0
N	Estero El Muerto	Industrial 10% y manglar 90%	6	0
O	Estero Cobina (Playita El Guasmo)	Urbana e industrial	15	0

FICHA TÉCNICA N.º 2

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIÓFAGOS

Muestra: ADN molde de los bacteriófagos aislados

Objetivo: Identificar bacteriófagos líticos mediante la amplificación del gen de la proteína de la cápside mayor

Fundamento:

En la Tabla FTII. 1, se presentan los cebadores que se utilizaron en la detección de bacteriófagos líticos mediante la amplificación del gen de la proteína de la cápside mayor.

Tabla FTII. 1. Cebadores para la identificación de bacteriófagos líticos

Bacteriófagos	Secuencias (5'3')
HK578 F	GGTGAAGTGCTGAAGGAYGTTR
HK578 R	CCACGTTGAAGTCGAATCRCC
HK578 F2	CGAYAACCTGAACGDTTCAACG
HK578 R2	CMGTCAGCGTAACCAGTACGC
T5 F	GSWCARYTTAGACCRTGACGR
T5 R	GCTRARCGTMTGCGTRAAGAGC
T5 F2	CARCAGACCYTTMGGYTKACCV
T5 R2	GAACTTGGTCTGGGTGATCTGG
T4-F ¹	CCCTGCTGTTCCAGATCGANAARGARG C
T4-R ¹	CTGCCTGGCGTACTGGTCDATRWANAC
T7-F ¹	GACAAGCGGAAGGACATCAANCA YACNGAR A
T7-R ¹	CGCGTAGTTGGCGGCRTTNGGCATNA
N4-F ¹	GGATGATCGTAATATTAATGATCAGGGNATHRAYGC
N4-R ¹	GACATAAAGCCCATTTCCGCCRWANGGRTC
GJ1-F ¹	GGCTGCGCGTATGATTAGGAYATHGAY GA
GJ1-R ¹	CCAATGCATCACCGGCADCCADATYTC
SP6-F ¹	CACCGTGATTGCGCGTAA YACNGTNGC
SP6-R ¹	TTCCCAACGATCCGGAATNGCNCCYTC
FO1-F ¹	CGCCATTGAAGAACTGCGTRWRCA YAT GGA
FO1-R ¹	GGCATCATATAGGAATGCGCYTCRAAR TC
Vi1-F ¹	GCCGATTAATATTGCGATGGAYTTYTT
Vi1-R ¹	CCAGCATAAAGGTCATAAATTTCCAYTTYTC

¹ (Born et al., 2019)

Desarrollo:

En la Figura FTII. 1, se presentan los resultados de corrida electroforética para la detección de bacteriófagos del género *Dhillonvirus* con los cebadores HK578-2 a una temperatura de *annealing* de 58°C. Con estos cebadores se obtuvo el tamaño deseado del producto de PCR para la detección del bacteriófago lítico.

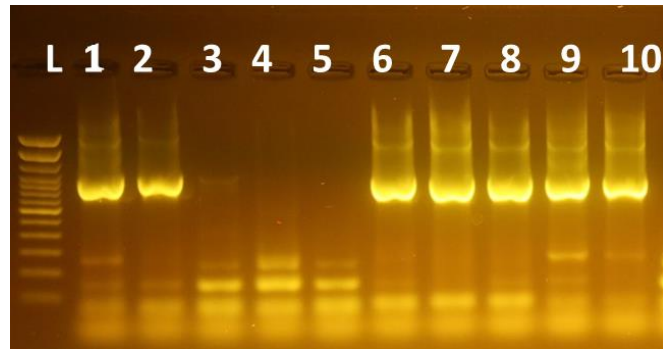


Figura FTII.2. Detección del género *Dhillonvirus* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se muestra la amplificación de fragmentos correspondientes a la proteína de la cápside mayor (MCP) con un tamaño de 1100 pb. L: Marcador de peso molecular (100-2000 pb). 1: BMH4; 2: BMH5; 3: BMJ1; 4: BMJ3; 5: BMJ4; 6: BMK1; 7: BMKS1; 8: BMM2; 9: BMO4; 10: BMO3.

FICHA TÉCNICA N.º 3

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL BACTERIÓFAGO BME3

Muestra: Bacteriófagos BME3

Objetivo: Caracterizar de forma fenotípica al bacteriófago BME3 con características líticas deseables para su uso en control biológico.

Desarrollo:

Los resultados del perfil de lisis del bacteriófago BME3 se presentan en la Tabla FTIII. 1. Se apreció que el fago BME3 logró lisar 16 cepas bacteriana de un total de 33. El fago infectó cepas de *E. coli* susceptible a antibióticos e incluso *Salmonella*, pero no tuvo reacción contra *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp.

Tabla FTIII.1. Actividad lítica del bacteriófago BME3

Fenotipo de resistencia a antibióticos	Total de cepas	Cepas lisadas por el fago BME3	Cepas no lisadas por el fago BME3	Frecuencia relativa (%)
No definido	6	3	3	50.00
Resistente	14	8	6	57.14
Sensible	5	4	1	80.00
Intermedio	8	1	7	12.50
Total	33	16	17	48.49

En la Tabla FTIII. 2, se presenta las mediciones de la estructura del bacteriófago. Los resultados fueron obtenidos a partir de las mediciones realizadas a las micrografías con software de análisis de imágenes Fiji. Debido a que el fago posee una cola contráctil, las mediciones de tamaño del fago y largo de la cola puede ser variable.

Tabla FTIII. 2. Mediciones del bacteriófago

Fago	Escala (nm)	Largo total (nm)	Diámetro de la cola (nm)	Largo de la cola(nm)	Ancho de la cápside(nm)	Largo de la cápside (nm)
1	500	150	34	60	119	98
2	500	228	23	105	132	117
3	200	157	31	54	100	92
7	200	166	23	67	81	94
8	200	229	28	96	132	114
6	500	144	31	47	103	90
14	200	160	27	66	93	94
15	200	162	27	69	83	92
11	500	233	28	114	125	121
16	500	181	30	74	100	104
17	200	192	27	68	120	113
Promedio		182	28.09	74.55	108.00	102.64
Desviación estándar		33.56	3.33	21.31	18.54	11.57

FICHA TÉCNICA N.º 4

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL BACTERIÓFAGO BME3

Muestra: Bacteriófago BME3 enriquecido

Objetivo: Caracterizar de forma fisicoquímica al bacteriófago BME3 para su uso en control biológico.

Desarrollo:

En la Figura FTIV. 1, se presentan los diagramas de cajas simultáneos correspondiente a los resultados obtenidos en el tratamiento de sensibilidad térmica. Se apreció que la media del tratamiento a 60°C es diferente a la media de los tratamientos a 30, 35, 40, 45°C y 50°C.

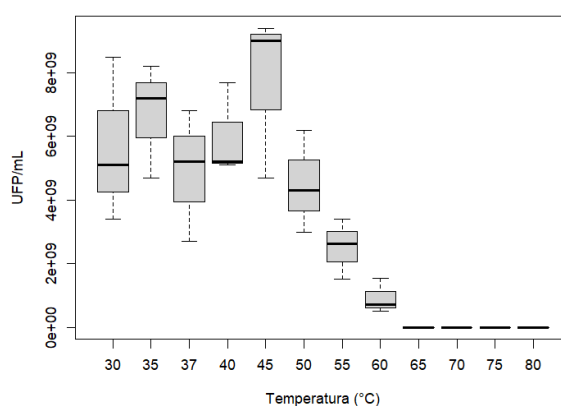


Tabla FTIV.1. Diagrama de caja del tratamiento de sensibilidad a la temperatura

Análisis de varianza

Ho: No hay efecto de los tratamientos en el título del fago

Hi: Al menos hay un efecto de los tratamientos en el título de los fagos

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
FI	11	2.928e+20	2.662e+19	11.83	3.47e-07 ***
Residuals	24	5.402e+19	2.251e+18		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Conclusiones:

Mediante el ANOVA se aprecia que la temperatura si tiene un efecto sobre el título del fago, se rechaza Ho.

Supuesto de Normalidad

Ho: Los datos provienen de una distribución normal

Hi: Los datos no provienen de una distribución normal

Shapiro-wilk normality test

```
data: residuals(BdD.aov)
W = 0.94611, p-value = 0.07887
```

Conclusión: Mediante la Prueba de Shapiro-Wilk a un nivel de significancia de 0.05, se acepta H_0 ($p_valor=0.07887$), es decir, los datos se ajustan a una distribución normal (Figura FTIV. 2A).

Supuesto de varianza constante

H_0 : Las varianzas de los tratamientos son iguales

H_1 : Las varianzas de los tratamientos son diferentes

```
> leveneTest(CONTEO~FI,data=BdD)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 11  1.0043 0.4711
      24
```

Conclusión: En la prueba de Levene a un nivel de significancia de 0.05, se acepta H_0 ($p_valor=0.4711$), es decir, se cumple el supuesto de varianza constante. En la Figura FTIV. 2B, se aprecia que los valores se distribuyen de forma aleatoria y no siguen un patrón.

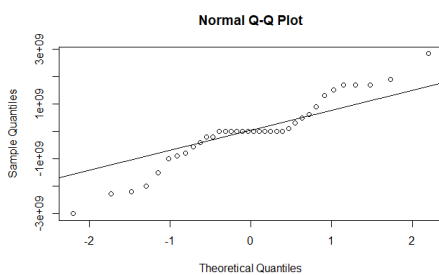
Supuesto de independencia

$H_0: \rho = 0$

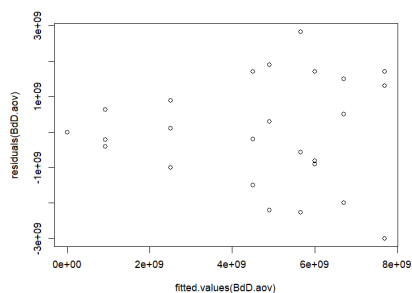
$H_1: \rho > 0$

```
> durbinWatsonTest(BdD.aov)
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
  1   -0.400058      2.705007   0.808
Alternative hypothesis: rho != 0
```

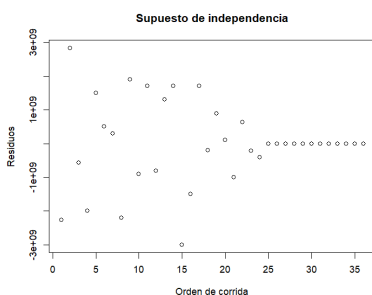
Conclusiones: En la Figura FTIV. 2C se aprecia que los datos se distribuyen de forma aleatoria y no siguen un patrón, es decir, los datos cumplen con supuesto de independencia.



A



B



C

Tabla FTIV.2. Normalidad (A). Predichos vs Residuos (B). Predichos vs Residuos (C).

Comparaciones o pruebas de rango múltiple:

Ho: $\mu_i = \mu_j$

Hi: $\mu_i \neq \mu_j$

Tabla FTIV. 1. Comparaciones post hoc de Tukey de los tratamientos de estabilidad térmica

FI	Diff	Lwr	upr	p adj
35-30	1.03×10^9	-3.38×10^9	5.5×10^9	0.999
37-30	-7.67×10^8	-5.18×10^9	3.7×10^9	1.000
40-30	3.33×10^8	-4.08×10^9	4.8×10^9	1.000
45-30	2.03×10^9	-2.38×10^9	6.5×10^9	0.869
50-30	-1.17×10^9	-5.58×10^9	3.3×10^9	0.997
55-30	-3.15×10^9	-7.57×10^9	1.3×10^9	0.345
60-30	-4.74×10^9	-9.16×10^9	-3.3×10^8	0.028
65-30	-5.67×10^9	-1.01×10^{10}	-1.2×10^9	0.005
70-30	-5.67×10^9	-1.01×10^{10}	-1.2×10^9	0.005
75-30	-5.67×10^9	-1.01×10^{10}	-1.2×10^9	0.005
80-30	-5.67×10^9	-1.01×10^{10}	-1.2×10^9	0.005
37-35	-1.80×10^9	-6.22×10^9	2.6×10^9	0.935
40-35	-7.00×10^8	-5.12×10^9	3.7×10^9	1.000
45-35	1.00×10^9	-3.42×10^9	5.4×10^9	0.999
50-35	-2.20×10^9	-6.62×10^9	2.2×10^9	0.805
55-35	-4.19×10^9	-8.60×10^9	2.3×10^8	0.074
60-35	-5.78×10^9	-1.02×10^{10}	-1.4×10^9	0.004
65-35	-6.70×10^9	-1.11×10^{10}	-2.3×10^9	0.001
70-35	-6.70×10^9	-1.11×10^{10}	-2.3×10^9	0.001
75-35	-6.70×10^9	-1.11×10^{10}	-2.3×10^9	0.001
80-35	-6.70×10^9	-1.11×10^{10}	-2.3×10^9	0.001
40-37	1.10×10^9	-3.32×10^9	5.5×10^9	0.998
45-37	2.80×10^9	-1.62×10^9	7.2×10^9	0.511
50-37	-4.00×10^8	-4.82×10^9	4.0×10^9	1.000
55-37	-2.39×10^9	-6.80×10^9	2.0×10^9	0.720
60-37	-3.98×10^9	-8.39×10^9	4.4×10^8	0.105
65-37	-4.90×10^9	-9.32×10^9	-4.8×10^8	0.021
70-37	-4.90×10^9	-9.32×10^9	-4.8×10^8	0.021
75-37	-4.90×10^9	-9.32×10^9	-4.8×10^8	0.021
80-37	-4.90×10^9	-9.32×10^9	-4.8×10^8	0.021
45-40	1.70×10^9	-2.72×10^9	6.1×10^9	0.955
50-40	-1.50×10^9	-5.92×10^9	2.9×10^9	0.981
55-40	-3.49×10^9	-7.90×10^9	9.3×10^8	0.222
60-40	-5.08×10^9	-9.49×10^9	-6.6×10^8	0.015
65-40	-6.00×10^9	-1.04×10^{10}	-1.6×10^9	0.003
70-40	-6.00×10^9	-1.04×10^{10}	-1.6×10^9	0.003
75-40	-6.00×10^9	-1.04×10^{10}	-1.6×10^9	0.003

FI	Diff	Lwr	upr	p adj
80-40	-6.00×10^9	-1.04×10^{10}	-1.6×10^9	0.003
50-45	-3.20×10^9	-7.62×10^{09}	1.2×10^9	0.326
55-45	-5.19×10^9	-9.60×10^{09}	-7.7×10^8	0.012
60-45	-6.78×10^9	-1.12×10^{10}	-2.4×10^9	0.001
65-45	-7.70×10^9	-1.21×10^{10}	-3.3×10^9	0.000
70-45	-7.70×10^9	-1.21×10^{10}	-3.3×10^9	0.000
75-45	-7.70×10^9	-1.21×10^{10}	-3.3×10^9	0.000
80-45	-7.70×10^9	-1.21×10^{10}	-3.3×10^9	0.000
55-50	-1.99×10^9	-6.40×10^{09}	2.4×10^9	0.884
60-50	-3.58×10^9	-7.99×10^{09}	8.4×10^8	0.195
65-50	-4.50×10^9	-8.92×10^{09}	-8.3×10^7	0.043
70-50	-4.50×10^9	-8.92×10^{09}	-8.3×10^7	0.043
75-50	-4.50×10^9	-8.92×10^{09}	-8.3×10^7	0.043
80-50	-4.50×10^9	-8.92×10^{09}	-8.3×10^7	0.043
60-55	-1.59×10^9	-6.01×10^{09}	2.8×10^9	0.971
65-55	-2.51×10^9	-6.93×10^9	1.9×10^9	0.658
70-55	-2.51×10^9	-6.93×10^9	1.9×10^9	0.658
75-55	-2.51×10^9	-6.93×10^9	1.9×10^9	0.658
80-55	-2.51×10^9	-6.93×10^9	1.9×10^9	0.658
65-60	-9.23×10^8	-5.34×10^9	3.5×10^9	1.000
70-60	-9.23×10^8	-5.34×10^9	3.5×10^9	1.000
75-60	-9.23×10^8	-5.34×10^9	3.5×10^9	1.000
80-60	-9.23×10^8	-5.34×10^9	3.5×10^9	1.000
70-65	-7.22×10^4	-4.42×10^9	4.4×10^9	1.000
75-65	-7.26×10^4	-4.42×10^9	4.4×10^9	1.000
80-65	-7.33×10^4	-4.42×10^9	4.4×10^9	1.000
75-70	-4.39×10^2	-4.42×10^9	4.4×10^9	1.000
80-70	-1.11×10^3	-4.42×10^9	4.4×10^9	1.000
80-75	-6.66×10^2	-4.42×10^9	4.4×10^9	1.000

Conclusión: Mediante la prueba Tukey a un nivel de significancia del 0,05, se aprecia que la media de los tratamientos a 30, 35, 37, 40, 45 y 50°C son diferentes a los tratamientos a 65, 70, 75 y 80°C. Igualmente, no hay diferencias entre los tratamientos entre la media de 55°C con 60°C y 65°C (Tabla FTIV. 1).

Sensibilidad al pH

En el diagrama de caja del tratamiento de sensibilidad al pH se aprecia que la media de los tratamientos es igual (Figura FTIV. 3).

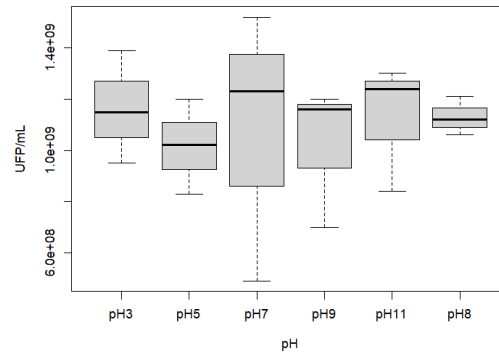


Figura FTIV. 3. Diagrama de cajas de la estabilidad al pH del fago BME3

Análisis de varianza

Ho: No hay efecto de los tratamientos en el título del fago

Hi: Al menos hay un efecto en el título de los fagos

```
> summary(BdD.aov)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
FI          5 5.609e+16 1.122e+16  0.132  0.982
Residuals  12 1.021e+18 8.505e+16
```

Conclusiones:

Mediante el ANOVA se aprecia que el pH no tiene un efecto sobre el título del fago, se acepta

Ho (p_valor=0.982).

Supuesto de Normalidad

Ho: Los datos provienen de una distribución normal

Hi: Los datos no provienen de una distribución normal

shapiro-wilk normality test

```
data: residuals(BdD.aov)
W = 0.94948, p-value = 0.4169
```

Conclusión: En la Figura FTIV. 4-A, se observa que los valores se ajustan a una distribución normal. Mediante la prueba de Shapiro-Wilk con un valor de significancia de 0.05, se acepta Ho.

Supuesto de homocedasticidad

Ho: La varianza de los tratamientos son iguales

Hi: La varianza de los tratamientos son diferentes

```
> leveneTest(CONTEO~FI,data=BdD)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 5    0.606 0.6971
      12
```

Conclusión: Con la prueba de Levene con un nivel de significancia de 0.05, se acepta la hipótesis nula ($p_valor=0.6971$), es decir, se cumple el supuesto de varianza constante (Figura FTIV. 4B).

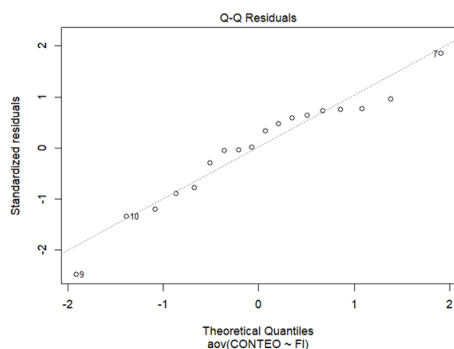
Supuesto de independencia

Ho: Los residuos cumplen con el supuesto de independencia

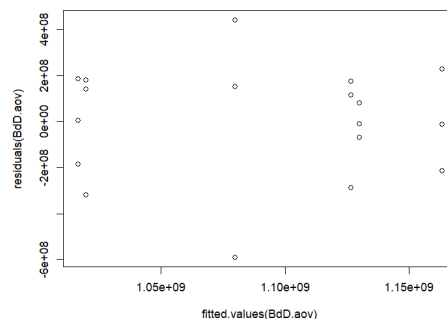
Hi: Los residuos no cumplen con el supuesto de independencia.

```
> durbinWatsonTest(BdD.aov)
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
 1    -0.06017158      2.069904      0.2
Alternative hypothesis: rho != 0
```

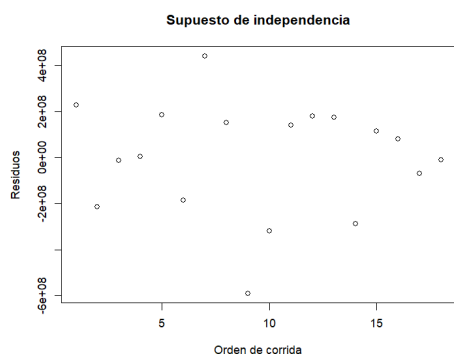
Conclusión: En el gráfico de orden de corrida versus residuos (Figura FTIV. 4C) se observa una aleatorización en la distribución de los puntos, es decir, no se detecta un patrón o tendencia y los datos cumplen con el supuesto de independencia. Igualmente, mediante la prueba de Durbin Watson a un nivel de significancia de 0.05, se acepta Ho ($p_valor=0.2$).



A



B



C

Figura FTIV. 4. Normalidad (A). Predichos vs Residuos (B). Orden de la corrida vs Residuos (C)

Sensibilidad al cloroformo

En la Figura FTIV. 5, se aprecia que el tratamiento a 25% y 50% de concentración de cloroformo es diferente al control.

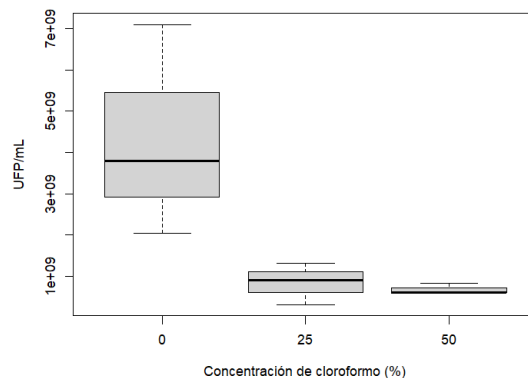


Figura FTIV. 5. Diagrama de cajas del tratamiento de sensibilidad al cloroformo

Análisis de varianza

Ho: No hay efecto de los tratamientos en el título del fago

Hi: Al menos hay un efecto en el título de los fagos

```
> summary(BdD.aov)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
FI      2 2.532e+19 1.266e+19  5.528 0.0435 *
Residuals 6 1.374e+19 2.290e+18
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Conclusiones:

Mediante el ANOVA a un nivel de significancia de 0.1, se rechaza Ho. El cloroformo tiene un efecto sobre el título del fago.

Supuesto de normalidad

Ho: Los datos provienen de una distribución normal

Hi: Los datos no provienen de una distribución normal

```
> shapiro.test(residuals(BdD.aov))

      Shapiro-wilk normality test

data:  residuals(BdD.aov)
W = 0.86542, p-value = 0.1098
```

Conclusión: Mediante el Figura FTIV. 6-A se observa que los valores se ajustan a una distribución normal. Igualmente, esto se comprueba con la prueba de Shapiro_Wilk con un valor de significancia de 0.05, se acepta Ho (p_valor=0.1098).

Supuesto de homocedasticidad

Ho: La varianza de los tratamientos son iguales

Hi: La varianza de los tratamientos son diferentes

```

> LeveneTest(CONTEO~FI,data=BdD)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 2  2.3749 0.1739
      6

```

Conclusión: Con la prueba de Levene con un nivel de significancia de 0.05, se acepta la hipótesis nula ($p_valor=0.1739$), es decir, se cumple el supuesto de varianza constante (Figura FTIV. 6-B).

Supuesto de independencia

Ho: Los residuos cumplen con el supuesto de independencia.

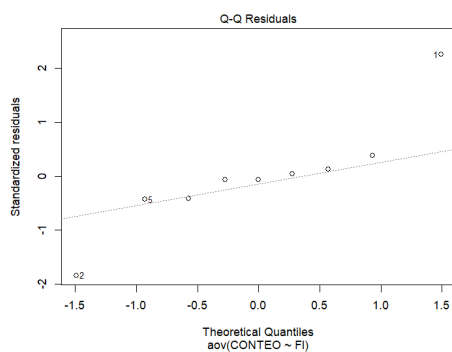
Hi: Los residuos no cumplen con el supuesto de independencia.

```

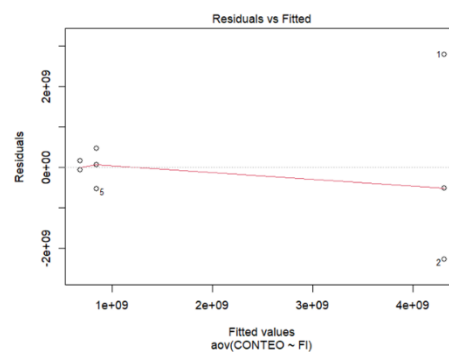
> durbinwatsonTest(BdD.aov)
lag Autocorrelation D-W Statistic p-value
 1      -0.4162493      2.266802      0.8
Alternative hypothesis: rho != 0

```

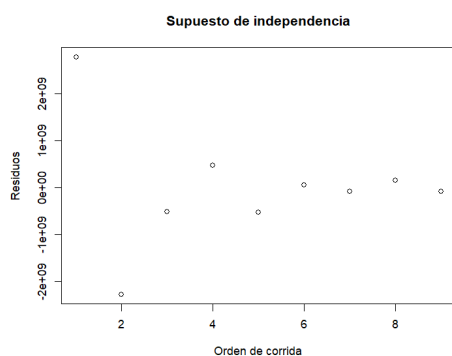
Conclusión: En el gráfico de orden de corrida versus residuos (Figura FTIV. 6C), se aprecia una aleatorización en la distribución de los puntos, por lo tanto, no se detecta un patrón o tendencia y los datos cumplen con el supuesto de independencia. Mediante la prueba de Durbin Watson a un nivel de significancia de 0.05, se acepta Ho ($p_valor= 0.8$).



A



B



C

Figura FTIV. 6. Normalidad (A). Predichos vs Residuos (B). Orden de corrida vs Residuos (C).

Comparaciones o prueba de rango múltiple

A continuación, se aplicaron pruebas de rango múltiple para identificar las medias de los tratamientos que son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey

$H_0: \mu_i = \mu_j$

$H_1: \mu_i \neq \mu_j$

95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = CONTEO ~ FI, data = BdD)

\$FI		diff	lwr	upr	p adj
25-0	-3473333333	-7264129975	317463308	0.0688298	
50-0	-3636666667	-7427463308	154129975	0.0583475	
50-25	-1633333333	-3954129975	3627463308	0.9904262	

Conclusión: Mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 0.05 se aprecia que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

ANEXO II

Tabla AII. 1. Información de las cepas bacterianas utilizadas para evaluar la actividad lítica de los fagos aislados

Especies	ID	Fuente	Resistencia a los antibióticos
<i>Escherichia coli</i> ATCC 15597		-	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		-	
<i>Escherichia coli</i>	ESAN 2	Agua subterránea	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^R , CAZ ^R , CIP ^I , CN ^S , CTX ^R , ETP ^S , FEP ^R , FOX ^R , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ESAN 4	Agua subterránea	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^R , CAZ ^R , CIP ^S , CN ^S , CTX ^R , ETP ^S , FEP ^R , FOX ^R , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ESAN 11	Agua subterránea	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ESAN 31	Agua subterránea	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^I , CN ^S , CTX ^I , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ECAL 45	Alimentos	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^R , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ECAL 86	Alimentos	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ECAL 130	Alimentos	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ECAL 141	Alimentos	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^S , CAZ ^R , CIP ^R , CN ^S , CTX ^R , ETP ^S , FEP ^R , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ETRA 1	Aguas residuales	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^R , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ETRA 5	Aguas residuales	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^I , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^I , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^I , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ETRA 6	Aguas residuales	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^R , CN ^S , CTX ^R , ETP ^S , FEP ^I , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ETRA 7	Aguas residuales	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	EMS 4	Agua potable	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^I , ETP ^I , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^I , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S , STX ^S , NOR ^S , ATM ^S
<i>Escherichia coli</i>	EMS 5	Agua potable	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^I , CN ^S , CTX ^S , ETP ^I , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^I , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S , STX ^I , NOR ^S , ATM ^S
<i>Escherichia coli</i>	EMS 6	Agua potable	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^I , ETP ^S , FEP ^I , FOX ^S , IMP ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S , STX ^S , NOR ^I , ATM ^S

<i>Escherichia coli</i>	EMS 7	Agua potable	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S , STX ^I , NOR ^S , ATM ^S
<i>Escherichia coli</i>	EMS 8	Agua potable	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^I , FOX ^S , IMP ^I , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S , STX ^S , NOR ^S , ATM ^S
<i>Escherichia coli</i>	EMS 11	Agua potable	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^I , ETP ^S , FEP ^I , FOX ^S , IMP ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S , STX ^S , NOR ^S , ATM ^S
<i>Escherichia coli</i>	ECO 69	Estuario	AK ^S , AMP ^S , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^S , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ECO 85	Estuario	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^I , CAZ ^R , CIP ^R , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^I , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^S
<i>Escherichia coli</i>	ECO 119	Estuario	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^I , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^I
<i>Escherichia coli</i>	ECO 122	Estuario	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^I , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^I , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^I , KZ ^I , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^R
<i>Escherichia coli</i>	ECO 141	Estuario	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^I , CAZ ^S , CIP ^I , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^I , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^I
<i>Escherichia coli</i>	ECO 142	Estuario	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^R , CAZ ^S , CIP ^S , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^I
<i>Escherichia coli</i>	ECO 148	Estuario	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^R , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^I
<i>Escherichia coli</i>	ECO 160	Estuario	AK ^S , AMP ^I , AMC AUG ^S , CAZ ^S , CIP ^I , CN ^S , CTX ^S , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^I , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^I
<i>Escherichia coli</i>	ECO 163	Estuario	AK ^S , AMP ^R , AMC AUG ^I , CAZ ^S , CIP ^R , CN ^S , CTX ^I , ETP ^S , FEP ^S , FOX ^S , IMP ^S , KZ ^R , MEM ^S , TOB ^S , TZP ^R
<i>Salmonella typhimurium ATCC 14028</i>	-	-	-

Nota: AK: amikacina; AMP: ampicilina; AMC AUG: amoxicilina- ácido clavulánico; CAZ: Ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; CN: gentamicina; CTX: cefotaxima, ETP:ertapenem; FEP: cefepime; FOX: cefoxitina; IMP: imipenem; KZ: cefazolin; MEM: meropenem; TOB: tobramicina; TZP: piperacilina-tazobactam; STX: trimetoprima-sulfametoxazol; NOR: norflaxacina; ATM: aztreonam.

ANEXO III

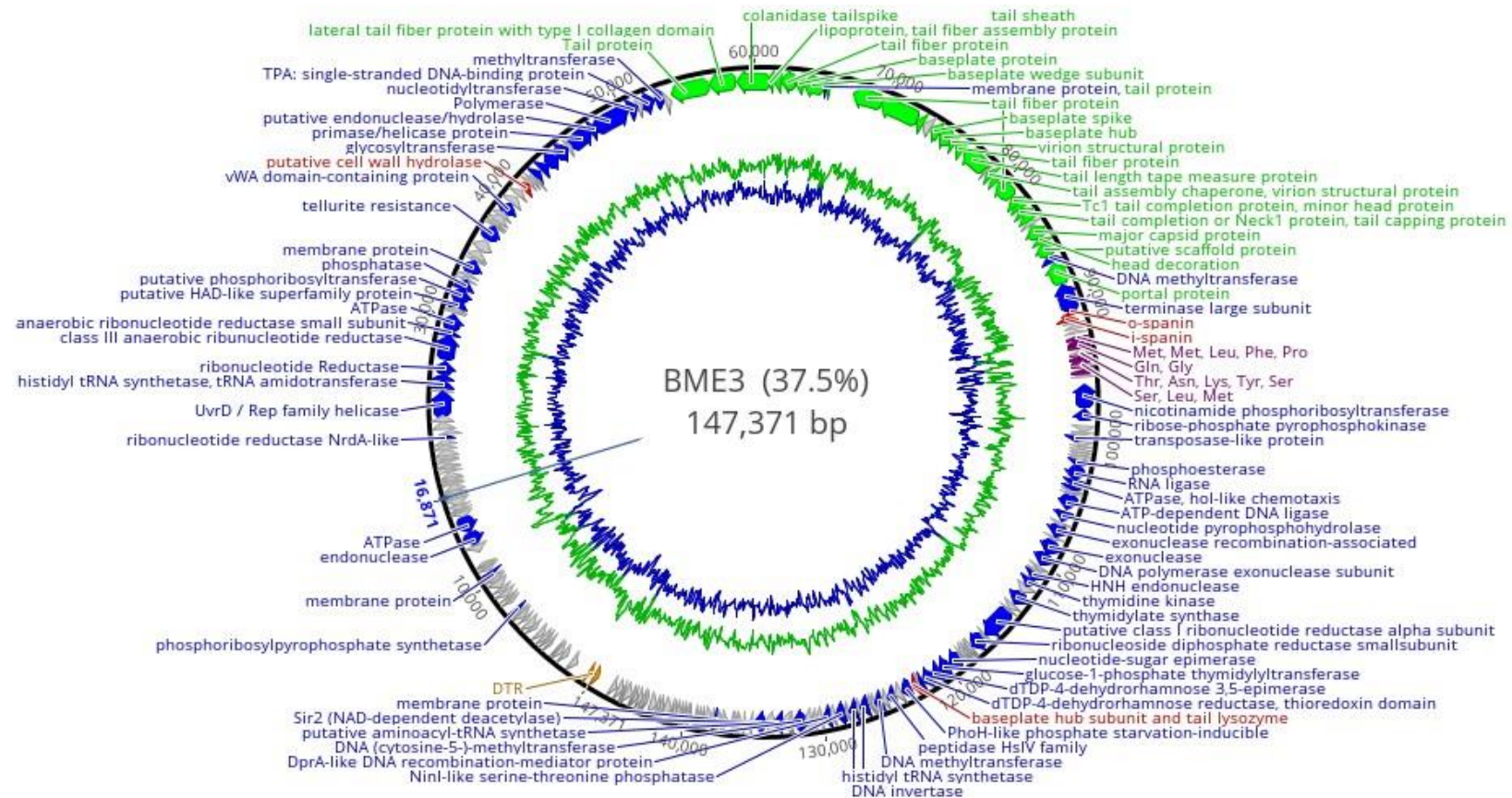


Figura AIII. 1. Mapa del genoma del fago BME3. La asignación de las funciones para cada secuencia codificante (CDS) son las siguientes: proteínas estructurales (verde), proteínas de replicación, regulación y empaquetamiento (azul), ARNt (morado), lisis (rojo) y proteínas hipotéticas (gris). Además, se incluye las repeticiones terminales directas (DTR) (naranja).

Tabla AIII. 1. Anotaciones de CDS del genoma del bacteriófago BME3

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E- values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
1483	1866	Rever se	127	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	96	4×10^{-90}	100	YP_00901 2581.1	14.778
2327	2752	Rever se	141	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD114	99	2.00×10^{-87}	99.29	AXY8160 1.1	16.492
2806	3192	Rever se	128	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	6.00×10^{-78}	98.44	YP_00998 5227.1	14.174
3189	3413	Rever se	74	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	94	2.00×10^{-42}	98.59	WBF5425 3.1	8.507
3784	4053	Rever se	89	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage arall	98	1.00×10^{-57}	97.75	QHR6755 3.1	9.905
4102	4272	Rever se	56	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phAPEC8	98	7.00×10^{-33}	100	YP_00734 8377.1	6.433
4354	4638	Rever se	94	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	98	1.00×10^{-61}	100	YP_00998 5222.1	10.966
4721	5044	Rever se	107	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	1.00×10^{-71}	98.13	YP_00998 5221.1	12.492
5374	5676	Rever se	100	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	1.00×10^{-52}	100	YP_00901 2573.1	11.015
5724	6125	Rever se	133	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-90}	99.25	YP_00901 2572.1	14.216
6435	6572	Rever se	45	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phiWec187	97	7.00×10^{-22}	100	BDU1311 3.1	5.628
6588	6947	Rever se	119	Hypothetical protein	Enterobacteria phage ECGD1	99	2.00×10^{-79}	99.16	AMM433 35.1	14.158
7034	7204	Rever se	56	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-20}	100	YP_00901 2568.1	6.091
7296	7511	Rever se	71	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase	<i>Salmonella</i> phage UAB_1	98	2.00×10^{-41}	100	UIS31601. 1	8.164
8004	8243	Rever se	79	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	98	7.00×10^{-51}	100	YP_00998 5215.1	9.080
8329	8511	Rever se	60	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	6.00×10^{-35}	100	YP_00998 4590.1	6.718

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
8600	8965	Rever se	121	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage VEcB	99	1.00×10^{-83}	100	YP_009987438.1	13.716
9061	9240	Rever se	59	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	98	5.00×10^{-31}	98.31	YP_009985213.1	6.923
9388	9942	Rever se	184	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage PaulScherrer	99	9.00×10^{-100}	98.91	QXV83854.1	20.867
9944	10204	Rever se	86	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phiWec187	98	5.00×10^{-57}	98.84	BDU13105.1	9.763
10207	10353	Rever se	48	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	97	2.00×10^{-26}	100	YP_009012561.1	5.537
10432	10794	Rever se	120	Membrane protein	<i>Escherichia</i> phage JLBYU50	99	9.00×10^{-83}	97.5	UGL62073.1	13.909
10880	11152	Rever se	90	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	2.00×10^{-57}	97.78	YP_009984586.1	9.877
11211	11354	Rever se	47	Hypothetical protein	<i>Salmonella</i> phage UAB_1	79	4.00×10^{-17}	97.37	UIS31592.1	5.660
11402	11614	Forw ard	70	Hypothetical protein	<i>Salmonella</i> phage UAB_1	98	5.00×10^{-43}	97.14	UIS31591.1	7.750
12428	12979	Rever se	183	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage VEcB	99	5.00×10^{-132}	100	YP_009987431.1	21.738
12980	13969	Rever se	329	Endonuclease	<i>Escherichia</i> phage VEcB	98	0.00	100	YP_009987430.1	37.513
14044	15171	Rever se	375	ATPase	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	0.00	100	YP_009012554.1	41.748
15183	15620	Rever se	145	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	1.00×10^{-89}	99.31	YP_009985203.1	16.473
15635	15808	Rever se	57	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	92	3.00×10^{-29}	100	YP_009012552.1	6.644
15829	16080	Rever se	83	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-50}	98.8	YP_009012551.1	9.535
16080	16631	Rever se	183	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phiWec187	99	7.00×10^{-131}	97.27	BDU13095.1	21.656
16751	17041	Forw ard	96	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage JohannJBalmer	98	$1.00 \times 10E-61$	98.96	QXV81445.1	10.803
17054	17341	Forw ard	95	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phAPEC8	98	7.00×10^{-62}	100	YP_007348612.1	10.779

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
17338	17691	Forw ard	117	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	4.00×10^{-80}	99.15	YP_009012547.1	13.887
17704	17859	Forw ard	51	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	9.00×10^{-29}	98.04	YP_009012546.1	5.938
17856	18056	Forw ard	66	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage muut	98	1.00×10^{-39}	100	YP_009985774.1	7.602
18057	18203	Forw ard	48	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO32	97	9.00×10^{-24}	97.92	UPW38609.1	5.416
18200	18628	Forw ard	142	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	2.00×10^{-101}	99.3	YP_009984571.1	16.522
18632	18904	Forw ard	90	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	1.00×10^{-58}	98.89	YP_009984570.1	11.065
18934	19059	Forw ard	41	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	97	5.00×10^{-20}	97.56	YP_009984569.1	4.464
19069	19335	Forw ard	88	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	98	5.00×10^{-36}	100	YP_009985191.1	10.809
19396	19560	Forw ard	54	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-30}	100	YP_009012540.1	6.256
19571	19864	Forw ard	97	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage VEcB	94	2.00×10^{-61}	98.92	YP_009987413.1	11.699
19866	20321	Forw ard	151	Hypothetical protein	Enterobacteria phage phi92	99	7.00×10^{-108}	99.34	CAH7774764.1	17.684
20323	20685	Forw ard	120	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	1.00×10^{-70}	100	YP_009012537.1	13.784
20686	21036	Forw ard	116	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	1.00×10^{-80}	100	YP_009012536.1	13.358
21038	21424	Forw ard	128	DUF4326 domain-containing protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	2.00×10^{-84}	100	YP_009984643.1	15.068
21402	21767	Forw ard	121	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	8.00×10^{-82}	99.17	YP_009984562.1	13.720
21789	22304	Forw ard	171	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_Eco_PATM	99	1.00×10^{-124}	99.42	CAH7774759.1	20.422
22313	22789	Forw ard	158	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	4.00×10^{-111}	99.37	YP_009984646.1	18.631
22791	24527	Forw ard	578	UvrD / Rep family helicase	<i>Escherichia</i> phage EmilieFrey	99	0.00	99.83	QXV78209.1	65.267

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
24538	24789	Forw ard	83	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	5.00×10^{-52}	97.59	YP_009984558.1	9.363
24786	25358	Forw ard	190	Histidyl tRNA synthetase	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	99	2.00×10^{-137}	99.47	WBF54203.1	21.524
25371	25805	Forw ard	144	tRNA amidotransferase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-99}	100	YP_009012528.1	16.175
25823	26773	Forw ard	316	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage arall	98	0.00	99.68	QHR67505.1	36.575
26863	28662	Forw ard	599	Class III anaerobic ribonucleotide reductase	<i>Enterobacteria</i> phage ECGD1	99	0.00	100	AMM43526.1	67.367
28659	29129	Forw ard	156	Class III anaerobic ribonucleotide reductase small subunit	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	1.00×10^{-110}	98.72	YP_009984553.1	18.013
29150	30310	Forw ard	386	ATPase	<i>Escherichia</i> phage muut	98	0.00	100	YP_009985792.1	43.468
30357	30548	Forw ard	63	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-35}	100	YP_009012521.1	7.150
30560	30715	Forw ard	51	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	92	2.00×10^{-27}	100	YP_009012520.1	6.061
30718	31374	Forw ard	218	Haloacid dehydrogenase	<i>Escherichia</i> phage PaulScherrer	99	3.00×10^{-148}	100	QXV83807.1	20.315
31367	32224	Forw ard	285	Putative phosphoribosyltransferase	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	98.6	YP_009984548.1	33.225
32217	32933	Forw ard	238	phosphatase	<i>Escherichia</i> phage alia	99	1.00×10^{-172}	99.58	YP_009985169.1	26.192
32943	33149	Forw ard	68	Holin	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-29}	100	YP_009012516.1	7.663
33164	33412	Forw ard	82	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage PaulScherrer	98	2.00×10^{-51}	100	QXV83803.1	9.081
33490	34467	Forw ard	325	Tellurium resistance protein TerC	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	0.00	100	YP_009984663.1	35.753
34507	34713	Forw ard	68	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	94	4.00×10^{-41}	100	YP_009012513.1	8.119
34700	35290	Forw ard	196	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage VEcB	82	2.00×10^{-30}	99.38	YP_009987386.1	20.968
35326	36177	Forw ard	283	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phiWec187	99	0.00	99.29	BDU13057.1	32.676

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
36246	37349	Forw ard	367	tellurite resistance	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	100	YP_00998 4540.1	41.260
37363	37569	Forw ard	68	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	4.00×10^{-41}	100	YP_00998 4539.1	7.945
37569	37769	Forw ard	66	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	93	3.00×10^{-40}	100	YP_00901 2508.1	7.678
37769	38332	Forw ard	187	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	1.00×10^{-133}	98.4	YP_00998 4537.1	21.188
38325	38594	Forw ard	89	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage VEcB	98	3.00×10^{-46}	96.63	YP_00998 7380.1	10.178
38596	39390	Forw ard	264	vWA domain-containing protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	0.00	100	YP_00998 4671.1	29.618
39463	40059	Forw ard	198	Hypothetical protein	<i>Serratia</i> phage KKP_3263	78	5.00×10^{-141}	100	UES35883 .1	22.090
40124	40726	Forw ard	200	Hypothetical protein	<i>Salmonella</i> phage UAB_1	99	1.00×10^{-125}	100	UIS31540. 1	22.980
40819	41328	Forw ard	169	Putative cell wall hydrolase	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	99	4.00×10^{-121}	98.82	WBF5417 8.1	19.490
41339	41617	Forw ard	92	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	6.00×10^{-60}	100	YP_00998 4531.1	10.739
41617	41847	Forw ard	76	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-46}	100	YP_00901 2500.1	8.727
41825	42019	Forw ard	64	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	2.00×10^{-39}	100	YP_00901 2499.1	7.434
42077	42640	Forw ard	187	Glycosyltransferase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-135}	100	YP_00901 2498.1	21.562
42650	43336	Forw ard	228	Glycosyltransferase	<i>Enterobacteria</i> phage ECGD1	99	3.00×10^{-167}	99.56	AMM435 00.1	26.487
43323	44297	Forw ard	324	Glycosyltransferase	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	99.69	YP_00998 4526.1	36.498
44309	45253	Forw ard	314	Glycosyltransferase	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD114	99	0.00	100	AXY8152 4.1	36.183
45253	45522	Forw ard	89	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	4.00×10^{-57}	100	YP_00901 2494.1	10.828
45535	47307	Forw ard	590	Primase/helicase protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	99.83	YP_00998 4523.1	66.756

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
47318	47713	Forw ard	131	Putative endonuclease/hydrolase	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	4.00×10^{-90}	99.24	YP_00998 4684.1	14.492
47804	50383	Forw ard	859	Polymerase	<i>Escherichia</i> phage vB_Eco_PATM	99	0.00	99.88	CAH7774 719.1	98.538
50521	51114	Forw ard	197	Nucleotidyltransferase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	2.00×10^{-145}	100	YP_00901 2490.1	23.419
51158	51556	Forw ard	132	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	4.00×10^{-89}	100	YP_00998 4518.1	15.161
51573	52520	Forw ard	315	TPA: single-stranded DNA-binding protein	<i>Escherichia</i> phage outra	99	0.00	100	QHR7539 5.1	34.416
52581	53312	Forw ard	243	methyltransferase	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	0.00	100	YP_00998 4690.1	27.926
53269	53700	Forw ard	143	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	4.00×10^{-99}	100	YP_00901 2486.1	16.034
53736	56555	Rever se	939	Tail protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	98.83	YP_00998 4514.1	99.791
56595	58556	Rever se	653	Lateral tail fiber protein with type I collagen domain	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO32	99	0.00	99.08	UPW3866 8.1	69.088
58597	61011	Rever se	804	colanidase tailspike	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	0.00	99.63	YP_00998 4694.1	86.764
61011	61352	Rever se	113	Lipoprotein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-73}	100	YP_00901 2481.1	13.072
61362	61913	Rever se	183	Tail fiber assembly protein	<i>Escherichia</i> phage muut	99	2.00×10^{-129}	99.45	YP_00998 5833.1	20.958
61923	62906	Rever se	327	Tail fiber protein	Salmonella phage UAB_1	99	0.00	100	UIS31517.1	35.608
62920	63549	Rever se	209	Baseplate protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	3.00×10^{-152}	100	YP_00998 4508.1	23.299
63552	65039	Rever se	495	Baseplate wedge subunit	<i>Escherichia</i> phage alia	99	0.00	100	YP_00998 5129.1	53.981
65039	65284	Rever se	81	Membrane protein/ holin	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	4.00×10^{-52}	100	YP_00998 4506.1	9.468
65281	65589	Rever se	102	Tail spike protein	<i>Klebsiella</i> phage ZCKP1	99	1.00×10^{-67}	100	YP_00980 3406.1	10.765
65639	67297	Rever se	552	Tail spike protein						59.159

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
67306	69465	Reverse	719	Tail fiber protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	0.00	99.03	YP_00998 5125.1	81.619
69474	72350	Reverse	958	Tail fiber protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO8	99	0.00	99.58	UPW3747 6.1	108.44 3
72350	72823	Reverse	157	Tail fiber protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	9.00×10^{-108}	100	YP_00901 2472.1	16.743
72816	73451	Reverse	211	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	3.00×10^{-138}	100	YP_00998 4499.1	23.635
73455	74192	Reverse	245	Baseplate spike	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	9.00×10^{-177}	100	YP_00998 4498.1	25.732
74195	75205	Reverse	336	Baseplate hub	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	100	YP_00998 4497.1	37.016
75222	75641	Reverse	139	Virion structural protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	5.00×10^{-84}	99.28	YP_00998 5119.1	15.999
75653	76363	Reverse	236	Tail fiber protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	3.00×10^{-149}	100	YP_00998 4710.1	26.069
76479	78458	Reverse	659	Tail length tape measure protein	<i>Escherichia</i> phage JLBYU50	97	0.00	99.38	UGL6216 0.1	72.876
78478	78651	Reverse	57	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	8.00×10^{-32}	98.25	YP_00998 4493.1	6.757
78753	79235	Reverse	160	Tail assembly chaperone	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-112}	100	YP_00901 2464.1	18.092
79279	79758	Reverse	159	Virion structural protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	4.00×10^{-110}	99.37	YP_00901 2463.1	17.326
79817	81223	Reverse	468	Tail sheath	<i>Escherichia</i> phage phi92	96	0.00	100	YP_00901 2462.1	51.103
81244	81900	Reverse	218	Tc1 tail completion protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO9	99	2.00×10^{-156}	99.08	UPW3769 0.1	25.038
81893	82309	Reverse	138	Minor head protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	89	1.00×10^{-87}	100	YP_00901 2460.1	15.735
82354	82842	Reverse	162	Tail completion or Neck1 protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-115}	100	YP_00901 2459.1	18.151
82842	83390	Reverse	182	Tail capping protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	6.00×10^{-120}	100	YP_00998 4719.1	20.139
83403	83753	Reverse	116	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-80}	100	YP_00901 2457.1	13.016

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
83839	84840	Reverse	333	Major capsid protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	100	YP_009984484.1	37.086
84862	85254	Reverse	130	Head decoration	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	8.00×10^{-87}	100	YP_009984483.1	13.841
85273	86388	Reverse	371	Putative scaffold protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	96	0.00	99.44	YP_009984723.1	41.014
86391	86870	Reverse	159	DNA methyltransferase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	7.00×10^{-114}	100	YP_009012453.1	18.217
86967	88535	Reverse	522	Portal protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	0.00	99.81	YP_009012452.1	58.019
88633	90717	Reverse	694	Terminase large subunit	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	0.00	99.86	YP_009012451.1	79.201
90726	91010	Reverse	94	o-spanin	<i>Escherichia</i> phage EmilieFrey	98	6.00×10^{-61}	100	QXV78131.1	10.307
90961	91377	Reverse	138	i-spanin	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	99	2.00×10^{-93}	97.1	WBF54129.1	15.650
91428	91601	Reverse	57	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	4.00×10^{-33}	100	YP_009012448.1	6.948
91740	92030	Reverse	96	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	2.00×10^{-62}	100	YP_009012447.1	11.037
92137	92406	Reverse	89	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	6.00×10^{-59}	100	YP_009012446.1	10.562
92740	92818	Reverse		Met						
92834	92909	Reverse		Met						
92998	93082	Reverse		Leu						
93159	93233	Reverse		Phe						
93239	93314	Reverse		Pro						
93322	93396	Reverse		Gln						
93496	93570	Reverse		Gly						

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
93626	93949	Reverse	107	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phiWec187	99	4.00×10^{-70}	98.13	BDU12993.1	12747
93973	94047	Reverse		Thr						
94138	94222	Reverse		Asn						
94230	94316	Reverse		Tyr						
94322	94397	Reverse		Lys						
94523	94608	Reverse		Ser						
94617	94769	Reverse	50	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	9.00×10^{-27}	98	YP_009984471.1	5.699
94788	94877	Reverse		Ser						
95203	95288	Reverse		Leu						
95320	95395	Reverse		Met						
95403	95669	Reverse	88	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	1.00×10^{-54}	100	YP_009984470.1	9.794
96143	97876	Reverse	577	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD114	99	0.00	99.83	AXY81467.1	65.050
97948	98841	Reverse	297	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	<i>Escherichia</i> phage alia	99	0.00	99.66	YP_009985334.1	33.576
99252	99620	Forward	122	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	2.00×10^{-84}	99.18	YP_009012437.1	14.118
99687	99884	Forward	65	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	2.00×10^{-39}	100	YP_009012436.1	7.625
99881	100120	Forward	79	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	2.00×10^{-51}	100	YP_009012435.1	9.154
100074	100409	Forward	111	Transposase-like protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-72}	100	YP_009012434.1	12.649
100406	100684	Forward	92	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	6.00×10^{-60}	100	YP_009012433.1	10.505

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
100684	100875	Forw ard	63	Hypothetical protein	<i>Serratia</i> phage KKP_3263	98	2.00×10^{-36}	100	UES35815.1	7.239
100878	101219	Forw ard	113	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	2.00×10^{-75}	98.23	YP_009985327.1	13.135
101229	101378	Forw ard	49	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD114	98	9.00×10^{-27}	97.96	AXY81458.1	5.957
101378	101737	Forw ard	119	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage inny	99	3.00×10^{-83}	100	QHR69742.1	13.723
101737	102288	Forw ard	183	phosphoesterase	<i>Escherichia</i> phage outra	99	9.00×10^{-134}	100	QHR75342.1	21.428
102290	103222	Forw ard	310	RNA ligase	<i>Escherichia</i> phage muut	99	0.00	99.35	YP_009985640.1	35.604
103223	103627	Forw ard	134	ATPase	<i>Salmonella</i> phage UAB_1	99	5.00×10^{-94}	100	UIS31464.1	15.680
103637	103957	Forw ard	106	Hol-like chemotaxis	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	1.00×10^{-66}	100	YP_009012425.1	12.196
103961	104185	Forw ard	74	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	2.00×10^{-44}	100	YP_009012424.1	8.564
104194	104382	Forw ard	62	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	7.00×10^{-38}	100	YP_009012423.1	7.084
104369	105484	Forw ard	371	ATP-dependent DNA ligase	<i>Escherichia</i> phage JLBYU50	99	0.00	99.19	UGL62203.1	42.156
105682	106404	Forw ard	240	Nucleotide pyrophosphohydrolase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	1.00×10^{-174}	100	YP_009012420.1	27.374
106441	106719	Forw ard	92	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	5.00×10^{-60}	100	YP_009984450.1	10.646
106730	107614	Forw ard	294	Exonuclease recombination-associated	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	0.00	100	YP_009012418.1	33.141
107689	107901	Forw ard	70	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	2.00×10^{-42}	100	YP_009012417.1	7.762
107994	109028	Forw ard	344	Exonuclease	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	99.42	YP_009984447.1	39.811
109025	109987	Forw ard	320	DNA polymerase exonuclease subunit	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	0.00	99.69	YP_009984446.1	36.356
110026	110427	Forw ard	133	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	4.00×10^{-92}	100	YP_009984445.1	15.362

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
110411	110605	Forw ard	64	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	5.00×10^{-39}	100	YP_009012413.1	7.292
110595	111170	Forw ard	191	HNH endonuclease	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	1.00×10^{-137}	98.43	YP_009984443.1	22.032
111216	111779	Forw ard	187	Thymidine kinase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	5.00×10^{-136}	100	YP_009012411.1	21.239
111763	112353	Forw ard	196	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	1.00×10^{-131}	99.49	YP_009984441.1	22.704
112363	113334	Forw ard	323	Thymidylate synthase	<i>Escherichia</i> phage JohannJBalmer	99	0.00	99.38	QXV81565.1	37.012
113432	113842	Forw ard	136	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	2.00×10^{-84}	100	YP_009012408.1	15.673
113855	114103	Forw ard	82	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	9.00×10^{-54}	100	YP_009012407.1	9.373
114115	116376	Forw ard	753	Class I ribonucleotide reductase alpha subunit	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	99	0.00	99.87	WBF54087.1	85.911
116417	116752	Forw ard	111	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage EmilieFrey	99	6.00×10^{-78}	100	QXV78350.1	12.721
116739	117824	Forw ard	361	Class I ribonucleoside diphosphate reductase small subunit	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	0.00	100	YP_009012404.1	41.686
117824	118042	Forw ard	72	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	7.00×10^{-44}	100	YP_009012403.1	7.996
118035	118217	Forw ard	60	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	9.00×10^{-33}	100	YP_009012402.1	6.794
118220	118366	Forw ard	48	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	97	2.00×10^{-19}	100	YP_009984773.1	5.226
118356	118682	Forw ard	108	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	99	1.00×10^{-71}	99.07	WBF54081.1	12.355
118696	118893	Forw ard	65	Hypothetical protein	<i>Enterobacteria</i> phage ECGD1	98	2.00×10^{-39}	100	AMM43405.1	7.608
118890	119879	Forw ard	329	Nucleotide-sugar epimerase	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	0.00	100	YP_009984776.1	37.343
119888	120757	Forw ard	289	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO32	99	0.00	100	UPW38504.1	31.961
120770	121324	Forw ard	184	dTDP-4-dehydrorhamnose 3.5-epimerase	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	5.00×10^{-133}	100	YP_009984427.1	21.236

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
121321	122151	Forw ard	276	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD114	99	0.00	99.64	AXY81424.1	30.267
122154	122414	Forw ard	86	Thioredoxin domain	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	1.00×10^{-56}	100	YP_009984425.1	9.998
122419	122562	Forw ard	47	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	97	2.00×10^{-24}	100	YP_009012393.1	5.482
122575	123075	Forw ard	166	Baseplate hub subunit and tail lysozyme	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	99	2.00×10^{-117}	99.4	WBF54073.1	18.879
123114	123866	Forw ard	250	PhoH-like phosphate starvation-inducible	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	0.00	100	YP_009012391.1	27.865
123903	124397	Forw ard	164	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	2.00×10^{-115}	100	YP_009012390.1	19.129
124394	125047	Forw ard	217	Peptidase HslV family	<i>Escherichia</i> phage muut	99	2.00×10^{-128}	99.54	YP_009985679.1	23.777
125089	125517	Forw ard	142	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	6.00×10^{-99}	100	YP_009012388.1	16.796
125507	126016	Forw ard	169	DNA methyltransferase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	4.00×10^{-109}	98.82	YP_009012387.1	19.614
126030	126260	Forw ard	76	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	4.00×10^{-47}	100	YP_009012386.1	8.528
126260	126463	Forw ard	67	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	98	4.00×10^{-40}	100	YP_009985282.1	7.518
126521	127183	Forw ard	220	DNA invertase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	8.00×10^{-160}	100	YP_009012384.1	24.683
127193	127396	Forw ard	67	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	3.00×10^{-40}	100	YP_009012383.1	7.690
127408	127980	Forw ard	190	Histidyl tRNA synthetase	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	2.00×10^{-135}	99.47	YP_009012382.1	20.878
127991	128317	Forw ard	108	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	99	3.00×10^{-71}	100	YP_009012381.1	12.590
128317	129060	Forw ard	247	NinI-like serine-threonine phosphatase	<i>Escherichia</i> phage JohannJBalmer	99	0.00	99.6	QXV81536.1	28.173
129060	129380	Forw ard	106	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO8	82	2.00×10^{-50}	94.32	UPW37317.1	12.442
129391	129969	Forw ard	192	DprA-like DNA recombination-mediator protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	4.00×10^{-141}	100	YP_009985275.1	21.687

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
129956	130474	Forw ard	172	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage outra	99	2.00×10^{-121}	98.84	QHR75536.1	19.654
130471	130728	Forw ard	85	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	3.00×10^{-53}	100	YP_009012376.1	9.651
130814	131227	Forw ard	137	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage PaulScherrer	99	7.00×10^{-95}	100	QXV83925.1	16.009
131227	132216	Forw ard	329	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase	<i>Escherichia</i> phage arall	99	0.00	99.7	QHR67598.1	37.830
132216	132338	Forw ard	40	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage VEcB	97	7.00×10^{-18}	97.5	YP_009987248.1	4.940
132340	132948	Forw ard	202	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO8	99	3.00×10^{-148}	99.5	UPW37323.1	23.682
133003	133536	Forw ard	177	Putative aminoacyl-tRNA synthetase	<i>Escherichia</i> phage muut	99	5.00×10^{-124}	98.87	YP_009985696.1	20.403
133533	134273	Forw ard	246	Hypothetical protein	<i>Serratia</i> phage KKP_3263	99	9.00×10^{-158}	99.59	UES35992.1	28.718
134263	135078	Forw ard	271	Sir2 (NAD-dependent deacetylase)	<i>Serratia</i> phage KKP_3263	99	0.00	98.89	UES35991.1	30.866
135123	135380	Forw ard	85	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	6.00×10^{-57}	100	YP_009984402.1	9.587
135556	135777	Rever se	73	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	2.00×10^{-45}	100	YP_009012367.1	8.428
135862	136185	Rever se	107	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	99	5.00×10^{-70}	97.2	YP_009984400.1	12.245
136194	136481	Rever se	95	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-62}	100	YP_009012365.1	11.144
136491	136664	Rever se	57	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage muut	98	2.00×10^{-33}	100	YP_009985703.1	6.618
136821	137420	Rever se	199	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage arall	99	1.00×10^{-140}	98.99	QHR67588.1	22.171
137434	137706	Rever se	90	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	3.00×10^{-59}	100	YP_009012361.1	10.381
137708	137920	Rever se	70	membrane protein	<i>Escherichia</i> phage muut	98	4.00×10^{-29}	100	YP_009985707.1	8.070
137922	138104	Rever se	60	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	83	3.00×10^{-28}	100	YP_009012359.1	7.087

Mini mum	Maxi mum	Direc tion	Lengh t (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identif y (%)	Accession	MW (kDa)
138098	138508	Reverse	136	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO9	99	1.00×10^{-93}	100	UPW37547.1	15.634
138614	138862	Reverse	82	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage inny	98	1.00×10^{-52}	100	QHR69673.1	9.487
138859	139122	Reverse	87	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage arall	98	5.00×10^{-57}	100	QHR67582.1	9.753
139122	139340	Reverse	72	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	1.00×10^{-44}	98.61	YP_009012355.1	8.351
139548	139790	Reverse	80	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	1.00×10^{-35}	98.75	YP_009984389.1	9.158
139783	140007	Reverse	74	Hypothetical protein	<i>Enterobacteria</i> phage ECGD1	98	2.00×10^{-23}	98.65	AMM43363.1	8.663
140061	140234	Reverse	57	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	7.00×10^{-35}	100	YP_009012352.1	6.838
140231	140482	Reverse	83	Hypothetical protein	<i>Enterobacteria</i> phage ECGD1	98	7.00×10^{-52}	100	AMM43361.1	9.454
140479	140778	Reverse	99	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage muut	99	6.00×10^{-65}	100	YP_009985717.1	12.180
140778	141017	Reverse	79	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	3.00×10^{-49}	100	YP_009012349.1	8.881
141008	141202	Reverse	64	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	98	5.00×10^{-40}	100	YP_009984384.1	7.324
141204	141662	Reverse	152	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage alia	99	2.00×10^{-110}	100	YP_009985246.1	17.878
141679	142023	Reverse	114	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage JohannJBalmer	99	3.00×10^{-55}	100	QXV81505.1	13.051
142025	142198	Reverse	57	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_PHB05	94	9.00×10^{-32}	100	YP_009984381.1	7.063
142198	142782	Reverse	194	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage EC_OE_11	99	5.00×10^{-143}	99.48	WBF54270.1	23.154
142961	143185	Reverse	74	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage muut	97	7.00×10^{-47}	100	YP_009985727.1	8.430
143195	143413	Reverse	72	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage phi92	98	9.00×10^{-33}	95.83	YP_009012338.1	8.524
143406	143756	Reverse	116	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_EcoM_ESCO32	99	6.00×10^{-82}	100	UPW38561.1	13.990

Minimum	Maximum	Direction	Length (aa)	Putative function	Best-matchBLASTp Result	Query cover (%)	E-values	Identity (%)	Accession	MW (kDa)
143770	144069	Reverse	99	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage vB_vPM_PD06	99	1.00×10^{-67}	100	YP_009984833.1	11.317
144066	144197	Reverse	43	Hypothetical protein	<i>Enterobacteria</i> phage ECGD1	97	9.00×10^{-21}	100	AMM43348.1	5.017
144282	144734	Reverse	150	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage outra	99	8.00×10^{-103}	98	QHR75496.1	17.380
144750	144965	Reverse	71	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage muut	98	4.00×10^{-33}	98.59	YP_009985734.1	8.065
144967	145425	Reverse	152	Hypothetical protein	<i>Escherichia</i> phage EmilieFrey	99	9.00×10^{-108}	97.37	QXV78275.1	17.499
145496	145861	Reverse	121	Hypothetical protein	<i>Salmonella</i> phage UAB_1	99	1.00×10^{-85}	100	UIS31372.1	14.130

ANEXO IV

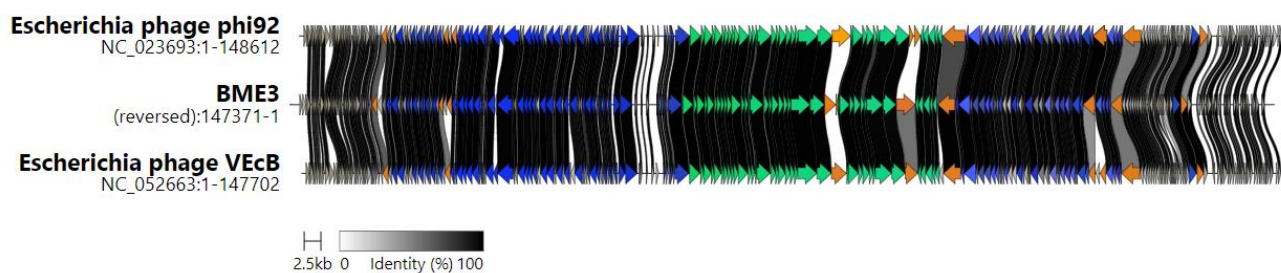


Figura AIV 1.-Comparación del genoma de los bacteriófagos phi92, BME3 y VEcB con Clinker. Las flechas indican las secuencias codificantes; el color verde representa las proteínas estructurales y el color azul, las proteínas de replicación, reguladoras y de empaquetamiento. Las flechas están unidas por regiones sombreadas que señalan el porcentaje de identidad de aminoácidos. Las flechas naranjas simbolizan proteínas con un porcentaje de identidad distinto del 100%, como histona deacetilasa dependiente de NAD, peptidasas HslV, fosfato inducible por inanición tipo PhoH, espiga de la cola, fibra de la cola, ribonucleótido reductasa anaerobia de clase III, helicasa de la familia UvrD/Rep y endonucleasa (color naranja de izquierda a derecha). Entre estas proteínas, de la púa y la fibra de la cola no mostraron ninguna conservación en relación con sus homólogas