



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas



Aislamiento y caracterización de un nuevo bacteriófago de *Escherichia coli* aislado desde aguas residuales Chilenas.

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Para optar al título de Biólogo

Maximiliano Eduardo Sandoval Carrasco

Concepción, Noviembre de 2024



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.



Prof. Guía

Dr. Andrés Opazo-Capurro

de 2024

Concepción, Noviembre

AGRADECIMIENTOS

A lo largo del camino recorrido para la realización de esta tesis, he contado con el apoyo, la guía y la inspiración de personas fundamentales en mi vida. Es por eso que quiero dedicar estas palabras para expresar mi más sincero agradecimiento a quienes, de una u otra manera, hicieron posible este logro. En primer lugar, a mi madre, quien ha sido y siempre será el mayor pilar en mi vida. Mamá, no hay palabras que alcancen para agradecer todo lo que has hecho por mí. Tu fortaleza, sacrificios y amor incondicional han sido la base sobre la cual construí mis sueños. Fuiste tú quien me enseñó a nunca rendirme, a creer en mí incluso cuando dudaba, y a luchar por lo que realmente amo. Siempre supiste encontrar la manera de estar presente, incluso en los momentos más oscuros, con tus palabras de aliento y tu inquebrantable fe en que podía lograrlo todo. Todo lo que soy y lo que he logrado es gracias a ti. Esta tesis, este logro, es tan tuyo como mío, porque nada de esto habría sido posible sin tu apoyo y tu amor infinito.

A mi familia, quienes, con su cariño y constante preocupación, me recordaron que nunca estoy solo. Aunque las distancias físicas a veces nos separaron, su apoyo siempre estuvo presente, brindándome fuerzas en los momentos más difíciles.

A mis amigos, quienes estuvieron ahí para celebrar mis logros, consolarme en mis fracasos y hacerme reír en los días más complicados. Gracias por ser mi red de apoyo, por comprender mis ausencias en los momentos de mayor presión y por siempre confiar en que podía alcanzar esta meta.

A los profesores que me recibieron en el laboratorio de investigación, quiero expresar mi gratitud por haberme abierto las puertas a un mundo lleno de desafíos y aprendizaje. Gracias por creer en mí, por compartir su conocimiento y por guiarme en este camino científico que tanto me apasiona. Su dedicación y disposición para enseñar no solo enriquecieron mi formación académica, sino también mi forma de enfrentar los retos con curiosidad y perseverancia.

Un agradecimiento muy especial a Boris Parra Verdugo, a quien llamo “mi sensei”, quien se convirtió en mi mentor en el fascinante mundo de los fagos. Sin ti, nada de esto habría sido posible. Gracias por tu paciencia, por enseñarme con pasión y por transmitirme ese amor por la ciencia que mueve cada uno de tus pasos. Tu guía fue clave para que pudiera transformar mi interés en esta área en algo concreto y significativo. Todo lo que aprendí de ti marcó un antes y un después en mi vida, y siempre estaré agradecido por ello.

Por último, pero no menos importante, A Gianella, mi compañera, mi amor y mi inspiración, quiero dedicarte un agradecimiento tan grande como lo que significas en mi vida. Desde que llegaste, has sido esa luz que ilumina mis días, ese motor que me impulsa a ser mejor y a luchar más fuerte por mis metas. Tus palabras de aliento, tu ternura y tu capacidad de entenderme como nadie lo hace han sido esenciales para llegar hasta aquí. En los momentos en que sentí que no podía más, tu sonrisa y tu amor me dieron la fuerza que necesitaba para seguir adelante. Te convertiste en una parte fundamental de este proceso, no solo acompañándome, sino también dándome un propósito adicional para esforzarme al máximo. Gracias por ser mi refugio, mi mayor apoyo y la persona que me enseña cada día el verdadero significado de compartir la vida. Este logro no es solo mío; es nuestro, porque sin ti, todo habría sido mucho más difícil y menos especial.

A todos ustedes, quienes de una manera u otra han formado parte de este viaje, les dedico esta tesis con todo mi corazón. Cada página de este trabajo está impregnada del apoyo, el amor y la guía que me brindaron. No tengo suficientes palabras para agradecerles, pero espero que este logro refleje lo mucho que significan para mí y lo profundo de mi gratitud.

Con cariño y admiración,

Maximiliano Eduardo Sandoval Carrasco.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3 y 4
INDICE.....	5 y 6
INDICE DE FIGURAS.....	7
INDICE DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCION.....	11
HIPÓTESIS.....	15
<i>Hipótesis de trabajo:</i>	15
<i>Hipótesis I:</i>	15
OBJETIVOS.....	16
<i>Objetivo general:</i>	16
<i>Objetivos específicos</i>	16
METODOLOGÍA.....	17
<i>Cepas bacterianas y medios de cultivo</i>	17
<i>Aislamiento y purificación de Bacteriófagos</i>	17
<i>Rango de Hospederos</i>	18
<i>Propagación, precipitación y concentración del fago EcoPhCCP1</i>	18
<i>Medición del Títer del fago</i>	18
<i>Ensayo de Termoestabilidad</i>	19
<i>Ensayo de estabilidad a distintos pH</i>	19

<i>Análisis Morfológico</i>	19
<i>Extracción de ADN y tratamiento con Dnasa y Rnasa</i>	19
<i>Secuenciación del Genoma</i>	20
<i>Análisis Bioinformático</i>	20
<i>Análisis comparativo del Genoma</i>	21
<i>Anotación del Genoma</i>	22
<i>Detección de genes de resistencia a antimicrobianos y de virulencia</i>	22
<i>Detección de sistemas Anti CRISPR-Cas</i>	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estabilidad térmica del fago EcoPhCCP1 bajo diferentes temperaturas.....	25
Figura 2. Porcentaje de partículas virales inactivadas del fago EcoPhCCP1 bajo diferentes valores de pH.....	26
Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión del fago EcoPhCCP1 (A). Placas de lisis del fago en el césped de la cepa <i>E. coli</i> UCO-452 (B)..	27
Figura 4. Mapa genómico del fago EcoPhCCP1 obtenido usando Proksee.....	28
Figura 5. Comparación del genoma entre EcoPhCCP1 y su pariente más cercano, vB_EcoS-Golestan, utilizando la alineación de todas las secuencias de proteínas anotadas con Clinker.....	29
Figura 6. Análisis del fago EcoPhCCP1 y sus parientes más cercanos mediante la filogenia basada en el genoma completo. El árbol se obtuvo usando VICTOR con el método de filogenia a distancia del genoma BLAST (GBDP). La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.	31
Figura 7. Mapa térmico de similitud intergenómica de EcoPhCCP1 y sus fagos parientes más cercanos en el género <i>Kagunavirus</i> basado en alineaciones BLASTn utilizando la herramienta VIRIDIC.....	32
Figura 8. Árbol filogenético del fago de <i>Escherichia coli</i> EcoPhCCP1. La filogenia del fago se construyó siguiendo el método de clasificación establecido por la ICTV. La estrella roja indica la ubicación filogenética del fago EcoPhCCP1.....	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fagos relacionados con EcoPhCCP1 pertenecientes al género <i>Kagunavirus</i>	29
Tabla 2. Proteínas putativas predichas con funciones Anti CRISPR-Cas utilizando PaCRISPR y AcRanker como predictores. El umbral de corte para PaCRISPR es > 0,5, y el umbral de corte para AcRanker > -5,0.....	37

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) supone una importante amenaza para la salud pública, agravada por la escasez de nuevos antibióticos y el aumento de superbacterias capaces de resistir a múltiples antibióticos. Para combatirla se necesitan esfuerzos urgentes y exhaustivos, así como estrategias alternativas. *E. coli* es una bacteria que vive en los intestinos de humanos y animales. Es el patógeno más frecuente que provoca cistitis no complicadas y da lugar a otras enfermedades extraintestinales, como neumonía, bacteriemia e infecciones abdominales como la peritonitis bacteriana espontánea. Los bacteriófagos se han considerado una alternativa potencial para tratar infecciones bacterianas que los antibióticos no pueden tratar. Nuestro objetivo era aislar fagos capaces de infectar cepas multirresistentes de *E. coli*. Aislamos un fago lítico mediante la técnica convencional de doble capa de agar (DLA), a partir de muestras de aguas residuales obtenidas de la planta de tratamiento de aguas residuales de Concepción, Chile. El fago, denominado EcoPhCCP1, fue observado por TEM y se determinó su rango de hospedador utilizando múltiples cepas de *E. coli* mediante DLA. Además, se secuenció su genoma. El fago EcoPhCCP1 pertenece al género *Kagunavirus*. La microscopía electrónica de transmisión (MET) reveló su morfología, con una cabeza icosaédrica y una larga cola no contráctil. El genoma del fago EcoPhCCP1 tiene 44.482 pb de longitud, con un contenido de GC del 50,71%, y codifica 87 ORF, 33 de ellos con funciones conocidas. El fago EcoPhCCP1 puede infectar 4 cepas de *E. coli*. Se predijeron 8 proteínas putativas con funciones Anti CRISPR. El análisis completo del genoma del fago EcoPhCCP1 reveló la ausencia de genes deletéreos, como los asociados a la resistencia a los antibióticos, la lisogenia, las toxinas o los factores de virulencia.

Palabras Clave: Bacteriófagos, resistencia antimicrobiana (RAM), *E. coli*, Aguas residuales.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) poses a significant public health threat, worsened by the scarcity of new antibiotics and the rise of superbugs that can withstand multiple antibiotics. Urgent, comprehensive efforts and alternative strategies are needed to combat AMR. *E. coli* is a bacterium that lives in the intestines of humans and animals. It is the most common pathogen leading to uncomplicated cystitis, and results in other extraintestinal illnesses, including pneumonia, bacteremia, and abdominal infections such as spontaneous bacterial peritonitis. Bacteriophages have been considered as a potential alternative to treat bacterial infections that antibiotics cannot. Our aim was to isolate phages able to infect multidrug-resistant strains of *E. coli*. We isolated one lytic phage by the conventional double layer agar technique (DLA), from wastewater samples obtained from wastewater treatment plant in Concepción, Chile. The phage, named EcoPhCCP1 was observed by TEM and its host range was determined using multiple strains of *E. coli* by DLA. Moreover, its genome was sequenced. Phage EcoPhCCP1 belongs to the *Kagunavirus* genus. Transmission electron microscopy (TEM) revealed his morphology, with an icosahedral head and a long non-contractile tail. The genome of phage EcoPhCCP1 is 44.482 bp in length with a GC content of 50.71%, encoding 87 ORFs, 33 of them with known functions. Phage EcoPhCCP1 can infect 4 strains of *E. coli*. 8 putative proteins were predicted with Anti CRISPR functions. The complete genome analysis of phage EcoPhCCP1 revealed the absence of deleterious genes, such as those associated with antibiotic resistance, lysogeny, toxins, or virulence factors.

Keywords: Bacteriophages, *Antimicrobial resistance* (AMR), *E. coli*, wastewater.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema mundial (Christaki et al. 2019) que se ha visto acelerado por el mal uso y el uso excesivo de antimicrobianos en humanos y animales, así como por una prevención inadecuada de las infecciones (Septimus 2018). Con esta capacidad, a pesar del éxito de los antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, aumenta la aparición de bacterias multirresistentes (Hoiby 2000). La evolución de la resistencia a los antibióticos depende intrínsecamente de la variación genética y de la posterior selección de genotipos derivados de esta variación (Couce 2009). Esto se debe a los mecanismos que emplean las bacterias para evolucionar su capacidad de intercambiar genes, lo que ahora se conoce como transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés), incluyendo la variación genética que luego puede introducir diversos rasgos genéticos en una población, incluyendo mutaciones y mecanismos de transferencia de genes, que pueden conferir resistencia a los antibióticos (Munita 2006). En este sentido, la presión de selección ejercida por la presencia de antibióticos puede favorecer la aparición de genotipos con rasgos ventajosos de resistencia a los antibióticos, lo que conduce a un aumento de su prevalencia y a la aparición de cepas bacterianas resistentes. Este proceso continuo subraya el papel crucial de la variación genética y las fuerzas selectivas en la evolución de la resistencia a los antibióticos. En resumen, la exposición a agentes antibacterianos provoca una selección adaptativa de rasgos ambientalmente favorables que se fijan en una población (Delbruck 1943; Newcombe 1949; Lederberg 1952).

Las plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) se consideran un punto crítico de exposición bacteriana a los agentes antibacterianos. Este último tratamiento implica el uso de microorganismos para eliminar compuestos orgánicos (como carbono, nutrientes y microcontaminantes) (Nguyen et al. 2021). Sin embargo, los procesos químicos son uno de los principales factores que favorecen la transmisión

y expresión de genes de resistencia a los antibióticos (ARG), induciendo la aparición, persistencia y proliferación de bacterias resistentes a los antibióticos (Guo et al. 2015).

E. coli es el indicador representativo de la resistencia antibacteriana en bacterias Gram negativas y es responsable de infecciones en humanos y animales (Simpson et al. 2002; Payment et al. 2003). Esto se debe a que *E. coli* forma parte de la microbiota intestinal y puede adquirir resistencia frente a los antibióticos consumidos por humanos y animales (Drugdova et al. 2013; Handrova et al. 2019). *E. coli* es un organismo causante de enfermedades diarreicas, incluidas la diarrea del viajero y la disentería. Es el patógeno más común que provoca infecciones en el tracto urinario (ITU) y recibe el nombre de *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés) (Medina & Castillo-Pino 2019). Las UPEC utilizan adhesinas como las fimbrias tipo 1 y P para adherirse a las células del tracto urinario y resistir la expulsión, además de producir toxinas como la hemolisina y el factor necrotizante citotóxico que dañan las células del hospedador y ayudan a evadir al sistema inmunológico. Las UPEC pueden formar biofilms, estructuras que les permite adherirse a superficies y resistir tratamientos antibióticos, lo que está asociado con una mayor persistencia y resistencia a los antibióticos (Tewawong et al. 2020; Qasemi et al. 2021; Whelan et al. 2023). Las enfermedades causadas por UPEC suponen una carga importante para los pacientes y el sistema sanitario, por lo que es necesario un reconocimiento rápido y un tratamiento adecuado. Los antibióticos no se recomiendan como tratamiento de primera línea para la enfermedad diarreica causada por *E. coli* en la mayoría de los pacientes debido a sus efectos secundarios nocivos y a su asociación con la resistencia a los antibióticos (Mueller 2023).

En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido que la crisis de resistencia a los antimicrobianos es un problema de «Una sola salud», subrayando la importancia de abordar esta cuestión desde una perspectiva integral que considere la salud humana, animal y ambiental (OMS 2014).

La creciente tasa de resistencia a los antimicrobianos ha llevado a la OMS a elaborar una lista de patógenos prioritarios que requieren el desarrollo de antimicrobianos alternativos. Dentro del grupo crítico se encuentran los Enterobacterales, un orden que incluye a *Escherichia coli*, que muestra resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (Park et al. 2012) y a los carbapenémicos (Huang et al. 2024). En 2019, seis patógenos fueron responsables de más de 250.000 muertes relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos. Estos patógenos, por orden de número de muertes, fueron *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Murray et al. 2022). Por este motivo, urge desarrollar nuevos mecanismos para el control de las cepas patógenas altamente resistentes.

Una de las estrategias propuestas para el control de bacterias resistentes corresponde al uso de bacteriófagos (Luong et al. 2020). Estos son un tipo de virus, capaces de infectar exclusivamente hospedadores bacterianos de forma altamente específica, ya que las bacterias diana presentan su receptor complementario, que determina de forma efectiva el rango de hospedador del fago lítico (Rakhuba et al. 2010), lo que los convierte en interesantes alternativas terapéuticas para el tratamiento de infecciones bacterianas (Hatfull et al. 2022). Los fagos pueden matar bacterias, pueden aumentar en cantidad durante el tratamiento, generalmente interfieren poco con la flora normal (Skurnik et al. 2007), son igualmente eficaces contra bacterias sensibles a los antibióticos y resistentes a los antibióticos (Liu et al. 2022), a menudo se encuentran fácilmente y parecen capaces de destruir biopelículas bacterianas y tienen baja toxicidad natural (Loc-Carrillo & Abedon 2011).

Los fagos, que son los organismos biológicos más prevalentes en la Tierra, se multiplican dentro de sus bacterias huésped utilizando su maquinaria de replicación, y liberan su progenie en el medio extracelular (Brüssow & Hendrix 2002; Breitbart et al. 2018). Por esta razón, las bacterias deben desarrollar estrategias de defensa para sobrevivir en ambientes donde los fagos son abundantes (Zou et al. 2022).

Estas estrategias antifágicas consisten, por ejemplo, en sistemas de restricción-modificación (Vasu & Nagaraja 2013), sistemas CRISPR-cas (Loureiro & da Silva 2019), infección abortiva (Aframian & Eldar 2023) y sistemas de toxina-antitoxina (LeRoux & Laub 2022), entre otros. En *E. coli* se han encontrado nuevos sistemas de defensa anti-fagos basados en nucleasas, como Gabija (Antine et al. 2023), Septu (Li et al. 2024), Shedu (Loeff et al. 2023), Druantia tipo III (Wang et al. 2023) y Ago (Zhen et al. 2024). Todos estos sistemas de defensa basados en nucleasas tienen la función principal de cortar o degradar el ADN del fago invasor para evitar que se replique dentro de la bacteria (Wang et al. 2022). Sin embargo, en respuesta, el fago T4, por ejemplo, modifica su genoma para contrarrestar la actividad nucleasa del sistema de defensa bacteriano mediante la hidroximetilación y la glicosilación del ADN (ADN ghmC) (Wang et al. 2023), lo que demuestra que esta modificación del genoma del fago T4 confiere un cierto nivel de resistencia a, por ejemplo, los mecanismos de defensa CRISPR-cas y de modificación de la restricción (Liu et al. 2020). Dado que este proceso no confiere una resistencia completa a los fagos, ni una inmunidad absoluta frente a las bacterias, puede ser la razón por la que existe tal grado de diversidad entre los bacteriófagos.

En este trabajo aislamos y caracterizamos un nuevo fago lítico *de Escherichia coli* EcoPhCCP1 de aguas residuales Chilenas en la ciudad de Concepción capaz de infectar 4 cepas uropatógenas de *E. coli*.

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo:

Los bacteriófagos son conocidos por su alta especificidad, lo que les permite atacar únicamente a las bacterias diana sin afectar la microbiota residente. Esto es una ventaja significativa sobre los antibióticos tradicionales, que pueden eliminar tanto bacterias patógenas como beneficiosas. Además, estudios han demostrado que los bacteriófagos pueden ser efectivos contra bacterias multirresistentes. Por ejemplo, investigaciones han mostrado que los fagos líticos pueden lisar eficazmente cepas de *Enterococcus* multirresistentes, lo que sugiere un potencial similar contra *E. coli*. La terapia con bacteriófagos se considera una alternativa prometedora para combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos, ya que los fagos pueden evolucionar junto con sus hospedadores bacterianos, manteniendo su eficacia a lo largo del tiempo. Ensayos clínicos han mostrado resultados positivos, destacando el potencial de los fagos como tratamiento alternativo y su eficacia en combinación con antibióticos. Considerando estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis I:

Los bacteriófagos aislados de muestras de aguas servidas del Gran Concepción presentan una alta especificidad y eficacia antimicrobiana contra cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, demostrando un potencial significativo como agentes terapéuticos alternativos a los antibióticos tradicionales.

OBJETIVOS

Objetivo general:

1. Aislar y caracterizar bacteriófagos líticos desde muestras de aguas servidas del Gran Concepción con actividad antimicrobiana contra distintas cepas de *E. coli*.

Objetivos específicos

- 1.1 Aislar bacteriófagos líticos desde muestras de agua servida.
- 1.2 Determinar el rango de hospedadores.
- 1.3 Evaluar la estabilidad de los bacteriófagos frente a distintas condiciones físico-químicas.
- 1.4 Secuenciar y analizar el genoma del bacteriófago.

METODOLOGÍA

Cepas bacterianas y medios de cultivo

Se probaron 56 cepas de *E. coli* de distintos orígenes (orina, sangre, secreción de heridas, piel) como hospedadores del fago EcoPhCCP1. Todas las cepas estaban disponibles en la colección de cepas del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. La cepa con la cual fue aislado el fago EcoPhCCP1 es una *E. coli* UCO-452, NDM+, Blee (-) aislada de un paciente del Hospital Clínico de la Universidad de Chile el año 2018. Todas las cepas se cultivaron en agar LB a 37°C durante la noche.

Aislamiento y purificación de Bacteriófagos

Para el aislamiento del fago EcoPhCCP1, se llevó a cabo el método convencional de doble capa de agar (DLA, por sus siglas en inglés) (Kropinski et al. 2009). Para el DLA se utilizaron placas con agar LB, en las que se mezclaron 3 mL de la solución de agar al 0,3% con 100 µL del caldo previamente inoculado con la cepa bacteriana *E. coli* UCO-452 la noche anterior, y 100 µL de muestras de aguas residuales previamente filtradas con una pirinola de 0,22 µm de diámetro de poro. Después de mezclar, la solución se vertió en una placa con agar LB. De manera paralela, las soluciones se trataron con Rnasa para determinar la naturaleza de los ácidos nucleicos. Todas las placas se incubaron a 37°C durante la noche. Se seleccionó al azar una placa de lisis y se sometió a un total de tres purificaciones seriadas. Las purificaciones consistieron en tomar un trozo del agar blando con la placa de lisis y disolverlo en 1 mL de tampón SM (MgSO₄-7H₂O 8 mM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM). Posteriormente, se realizaron diluciones para obtener placas de lisis aisladas. Lo anterior, a través de diluciones en diferentes factores, hasta completar las 3 purificaciones. El fago purificado se almacenó a 4°C en Buffer SM.

Rango de Hospederos

Se probaron 56 cepas de *E. coli* para determinar el rango de hospedadores del fago EcoPhCCP1. Se realizó DLA para determinar el rango de hospedadores. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche.

Propagación, precipitación y concentración del fago EcoPhCCP1

Para la propagación, se añadió 1 mL de Búfer SM con el fago EcoPhCCP1 a 100 mL de caldo LB con 1 mL de la bacteria huésped correspondiente más CaCl₂ (5 mM de concentración final) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, la solución se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y se descartó el precipitado con restos bacterianos. El sobrenadante se transfirió a 2 tubos falcon de 50 mL. Ambos tubos se filtraron con un filtro de 0,22 µm y la solución se transfirió a 2 tubos falcon estériles de 50 mL para el fago purificado. La precipitación se llevó a cabo mediante precipitación con PEG como indican Yamamoto et al. (1970), con algunas modificaciones. A cada tubo falcon se añadió un 10% de PEG8000 y 0,5 M de NaCl para precipitar los fagos y se almacenaron durante la noche a 4°C. Después, cada tubo se centrifugó a 8000 rpm durante 2 horas. El sobrenadante se desechó y el precipitado con fagos se resuspendió en 750 µl de Búfer SM para concentrarlo. Se almacenó a 4°C.

Medición del Títer del fago

Se empleó la técnica de doble capa de agar (DLA) para medir el título de fagos. Primero, se diluyó el fago EcoPhCCP1 (10⁻⁸) utilizando Búfer SM. Se mezclaron 100 µL de la dilución de fagos más 100 µL de la cepa *E. coli* UCO-452 cultivada previamente en caldo LB la noche anterior en 3 mL de agar blando derretido y se añadieron a la superficie de la placa que contenía agar LB al 4%. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizó el recuento de placas de

lisis. El resultado se expresó finalmente en unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/mL, por sus siglas en inglés).

Ensayo de Termoestabilidad

Para este ensayo, se incubó una dilución del fago EcoPhCCP1 (10^{-8}) durante 10 minutos a cada temperatura utilizada (25°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C y 75°C) y la técnica de DLA se realizó en triplicado para observar los efectos del aumento de la temperatura con respecto a la temperatura ambiente (25°C). Las placas de DLA se incubaron durante la noche a 37°C.

Ensayo de estabilidad a distintos pH

Para este ensayo, se suspendió una dilución de fago EcoPhCCP1 (10^{-8}) en Búfer PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, y 1.8 mM KH₂PO₄) 0,5 M a diferentes valores de pH (3,0, 4,5, 7,5, 9,3 y 11,5). Cada dilución de fago a diferente valor de pH se incubó durante 1 hora a 37°C y se realizó DLA por triplicado para observar los efectos generados por diferentes valores de pH. Las placas de DLA se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Análisis Morfológico

El microscopio electrónico de transmisión utilizado fue un microscopio JEOL JEM 2011 del Centro de Espectroscopía y Microscopía (CESMI) de la Universidad de Concepción para observar la morfología del fago aislado. Se utilizaron 50 µL de alícuota pura y diluida (10^{-8}) con el fago EcoPhCCP1. La muestra se colocó en rejilla EM y se tiñó con acetato de uranilo al 1%.

Extracción de ADN y tratamiento con Dnasa y Rnasa

La extracción de ADN se realizó con el minikit PureLink® Viral RNA/DNA (Invitrogen) siguiendo el manual del usuario, con ligeras modificaciones. Antes de

la extracción, los fagos se trataron con Dnasa y Rnasa para eliminar el material genético perteneciente a las bacterias. Se mezclaron 447 μL de caldo de fago concentrado con 50 μL de Búfer Dnasa, 3 μL de Dnasa turbo y 3 μL de Rnasa (5mg/mL). A continuación, se inactivó la DNasa con 20 μl de EDTA (0,5 M). La solución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto y 30 segundos. Una vez finalizada la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril.

Para la extracción de ADN, se mezcló la solución y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se utilizó un volumen inicial de 200 μl del caldo de fago concentrado tratado con Dnasa y Rnasa. El ADN purificado se observó en electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y la cuantificación del ADN se realizó mediante fluorómetro Qubit™ 4 (Thermo Fisher Scientific©).

Secuenciación del Genoma

La secuenciación se llevó a cabo en SeqCenter Inc. (Pittsburg, EE.UU). Las bibliotecas de secuenciación de Illumina se prepararon utilizando el kit Illumina DNA Prep basado en marcación y PCR, incorporando índices únicos duales (UDI, por sus siglas en inglés) IDT personalizados de 10 pb y con un tamaño de inserción objetivo de 280 pb. No fueron necesarios otros pasos para la fragmentación del ADN o la selección del tamaño. La secuenciación se llevó a cabo en un sistema Illumina NovaSeq X Plus, generando lecturas de 2x151 pb en uno o más ciclos multiplexados de celda de flujo compartido.

Análisis Bioinformático

Antes del análisis del genoma completo, se midió la calidad de las lecturas utilizando la herramienta FastQC v.0.12.1 (Andrews 2010). Los ensamblajes del genoma se realizaron *de novo* utilizando SPAdes v3.14 (Bankevich et al. 2012), siguiendo la recomendación de Turner et al. (2021) utilizando la plataforma Phage Galaxy (Afgan et al. 2018; Ramsey et al. 2020). La calidad del ensamblaje se comprobó utilizando

la herramienta Quast v5.2.0 (Gurevich et al. 2013). Los ensamblajes iniciales arrojaron múltiples contigs de diferentes tamaños con baja cobertura, lo que sugiere contaminación por ADN bacteriano y la necesidad de submuestreo. En consecuencia, las lecturas se submuestrearon aleatoriamente siguiendo las recomendaciones de Shen et al. (2021) utilizando seqtk v1.4 (Shen et al., 2016) para obtener el 2% de las lecturas totales. Después de esto, usamos SPAdes para reensamblar las lecturas, y la herramienta generó un contig grande con alta cobertura (>90) junto con varios contigs más cortos con baja cobertura (<4), indicando el ensamblaje exitoso de un genoma de fago completo (Shen et al. 2021).

Los contigs con baja cobertura, correspondientes a contaminación por ADN bacteriano, se eliminaron manualmente. Tras el mapeo, se descartaron las lecturas que no estaban asociadas al contig con la cobertura más alta. Los ensamblajes de alta calidad se utilizaron posteriormente para la anotación y el análisis.

Análisis comparativo del Genoma

Se realizó un análisis Megablast para evaluar la similitud del fago EcoPhCCP1 con otros genomas de fagos descritos, utilizando parámetros predeterminados y considerando únicamente genomas de fagos completos (Altschul et al. 1990). Las secuencias de fagos similares se comprobaron primero en la página web del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) y se descargaron de GenBank y se utilizaron como referencias para análisis posteriores. Las comparaciones por pares de secuencias de nucleótidos se realizaron utilizando el método de filogenia a distancia BLAST del genoma (Meier-Kolthoff et al. 2013). También se utilizó JSpecies (Richter et al. 2016) para calcular el porcentaje de identidad nucleotídica media (ANI, por sus siglas en inglés) de cada fago con su pariente más cercano. Para la clasificación de los fagos y la construcción del árbol filogenético, se utilizó el recurso en línea VirusTaxo (Raju et al. 2022). Además, se utilizaron los servicios en línea Virus Classification and Tree Building Online Resource (VICTOR) (Meier-Kolthoff & Göker 2017) y VIRIDIC (Moraru et al. 2020).

Anotación del Genoma

Los marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés) se predijeron con Phanotate (McNair et al. 2019) en el software pharokka v1.3.2 (Bouras et al. 2022), utilizando la base de datos PHROGs (Terzian et al. 2021), y posteriormente se validaron manualmente mediante búsquedas con BLAST v2.9.0 (Altschul et al. 1990) contra la base de datos no redundante del NCBI. Los ARNt se predijeron con ARAGORN v2.36 (Laslett & Canback 2004).

La comparación del fago EcoPhCCP1 con sus fagos más cercanos se realizó alineando todas las secuencias de proteínas anotadas utilizando Clinker (Gilchrist & Chooi 2021), y el mapa genómico del fago EcoPhCCP1 se generó con Proksee (Grant et al. 2023).

Detección de genes de resistencia a antimicrobianos y de virulencia

La búsqueda de genes que codifican factores de resistencia a los antibióticos se realizó utilizando Resfinder 4.6.0 (Bortolaia et al. 2020) y el identificador de genes de resistencia en la Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, por sus siglas en inglés), una herramienta reciente que utiliza el aprendizaje automático para la curación (Alcock et al. 2023). Además, se empleó la herramienta web VIRULENCEFINDER (Joensen et al. 2014) para identificar genes potencialmente asociados a factores de virulencia, utilizando un umbral de identidad del 98%.

Detección de sistemas Anti CRISPR-Cas

Dado que muchas bacterias emplean el sistema de defensa CRISPR-Cas para protegerse de elementos invasores como plásmidos y fagos (Makarova et al. 2020), estos invasores han evolucionado desarrollando proteínas anti-CRISPR, que inhiben la capacidad de las bacterias para generar inmunidad (Bondy-Denomy et al. 2013; Borges et al. 2017). Por este motivo, utilizamos dos predictores: PaCRISPR y acRanker. AcRanker facilita la clasificación de proteínas putativas como posibles

anti-CRISPRs (Eitzinger et al. 2022). Además, buscamos en bases de datos específicas como Anti-CRISPRdb v2.2 (Dong et al. 2022) y AcrDB (Huang et al. 2021). También empleamos algoritmos de inteligencia artificial, como AcrFinder, que permite la detección mediante métodos de culpabilidad por asociación y basados en la homología (Yi et al. 2020), así como el servidor PaCRISPR (Wang et al. 2020) y AcrPred (Dao et al. 2023).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rango de Hospederos

Como ocurre con todos los virus, los fagos son muy específicos del hospedador y, por lo general, sólo infectan a una especie bacteriana concreta o incluso a cepas específicas dentro de esa especie (Kasman y Porter 2022). El DLA demostró que EcoPhCCP1 solo era eficaz contra 4 de las 56 cepas utilizadas en este estudio. Este resultado apoya lo descrito por Kasman & Porter en cuanto al reducido rango de hospedadores, lo que nos permite entender que esta situación es un factor limitante a la hora de proponer a los fagos como alternativa terapéutica frente a infecciones causadas por *E. coli*. Esta situación se puede sobrellevar mediante cócteles con bacteriófagos (Yoo et al. 2023). Un cóctel de fagos es una mezcla de varios fagos que tiene como objetivo el ampliar el rango de hospedadores a más de una cepa bacteriana, y también permite que no se desarrolle resistencia a la infección (Chen et al. 2018),

Ensayo de Termoestabilidad

Numerosos estudios han evaluado las condiciones óptimas de almacenamiento de bacteriófagos para preservar su título, es decir, su capacidad infectiva, durante periodos prolongados (Golec et al. 2011; Merabishvili et al. 2013; Manohar et al. 2019). En general, los fagos de cola muestran estabilidad en un intervalo de temperaturas entre 4 y 80°C, así como en nitrógeno líquido, como describen Ackermann et al. (2004). Sin embargo, esta estabilidad depende en gran medida de la especie de fago (Zierdt 1988; Fortier & Moineau 2009; Lobočka et al. 2018). Los resultados del ensayo de estabilidad térmica a diferentes temperaturas se muestran en la **Figura 1**. Los resultados muestran que EcoPhCCP1 permanece estable entre 50°C y 65°C. A partir de 65°C, muestra una estabilidad decreciente del fago.

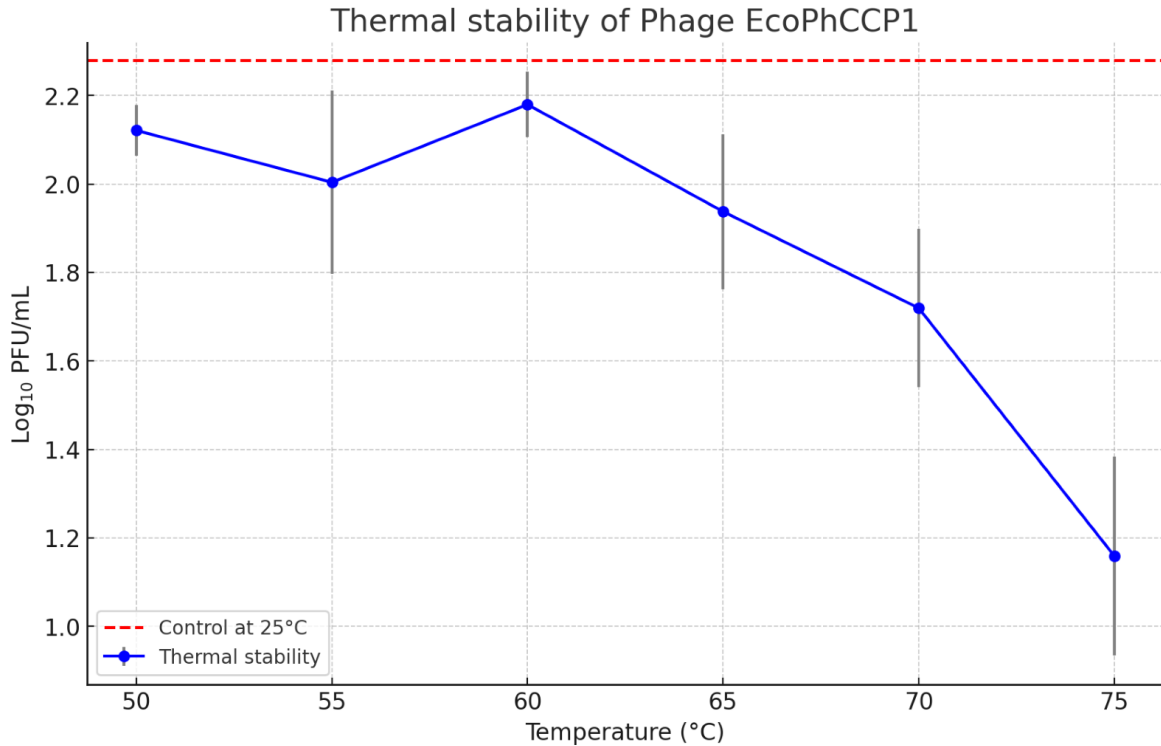


Figura 1. Estabilidad térmica del fago EcoPhCCP1 bajo diferentes temperaturas.

Ensayo de estabilidad a distintos pH

La respuesta de los bacteriófagos a diferentes niveles de pH es diversa, y el pH óptimo para el almacenamiento debe establecerse específicamente para cada bacteriófago. Los estudios han demostrado que un pH bajo puede ser perjudicial para determinados fagos (Jończyk et al. 2011; Ly-Chatain. 2014; Merabishvili et al. 2017) mientras que otros muestran una mayor estabilidad en condiciones ácidas (Lu Z et al. 2003). Además, se ha observado que algunos fagos son insensibles a las variaciones de pH (Jończyk 2011). En la **Figura 2** se muestran los resultados del ensayo de estabilidad frente a diferentes valores de pH. Se observa que EcoPhCCP1 muestra una estabilidad mínima a pH 3,0 y 11,5, lo que sugiere que a pH extremos (ácidos y muy alcalinos), EcoPhCCP1 pierde su estabilidad. En rangos de pH neutros a ligeramente alcalinos, el fago de *Escherichia* muestra una estabilidad óptima.

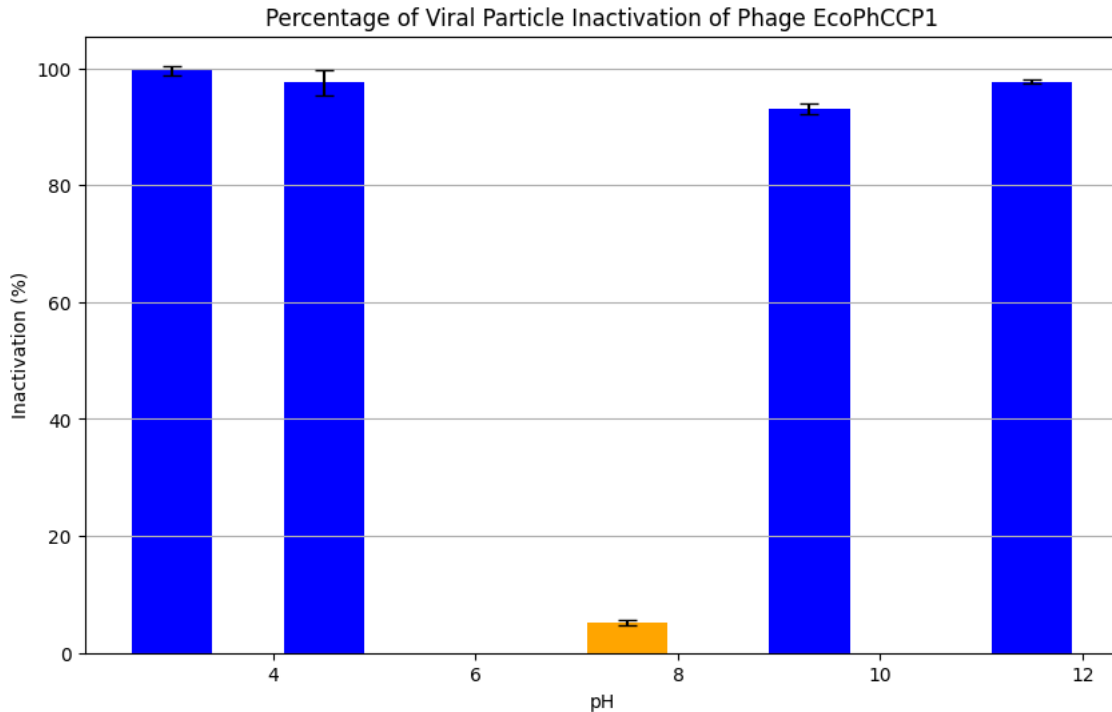


Figura 2. Porcentaje de partículas virales inactivadas del fago EcoPhCCP1 bajo diferentes valores de pH.

Análisis morfológico

El fago EcoPhCCP1 produjo placas de lisis claras y circulares, con un rango de diámetro de 1,7 a 2,8 mm en un cultivo en placa de la cepa *E. coli* UCO-452 (**Figura 3.B**). El análisis morfológico TEM mostró que el fago EcoPhCCP1 tenía una cápside hexagonal con un diámetro estimado de $50,96 \pm 0,3$ nm, y una larga cola flexible de $139,22 \pm 4,7$ nm de longitud y $10,13 \pm 0,4$ nm de diámetro (**Figura 3.A**). Basándose en las características morfológicas y en los criterios del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) (Fauquet et al. 2005), EcoPhCCP1 se clasificó en el orden *Caudovirales* y en la familia *Siphoviridae* (**Figura 9**).

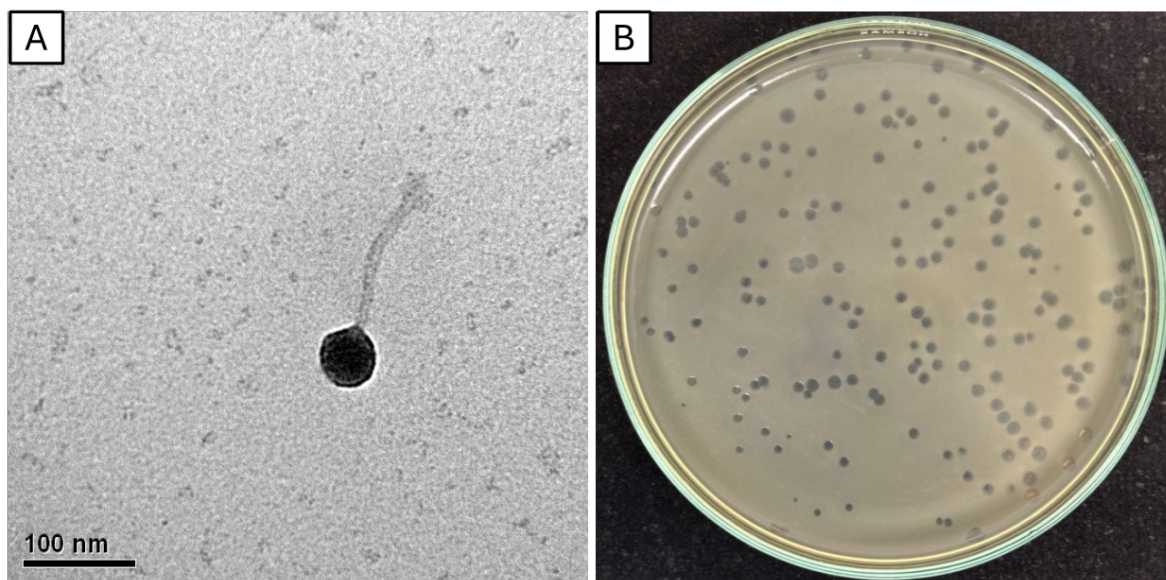


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión del fago EcoPhCCP1 (A). Placas de lisis del fago en el césped de la cepa *E. coli* UCO-452 (B).

Anotación del Genoma

El análisis completo del genoma del fago EcoPhCCP1 reveló la ausencia de genes deletéreos, como los asociados a la resistencia a los antibióticos, la lisogenia, las toxinas o los factores de virulencia. Estos resultados sugieren que el fago EcoPhCCP1 podría considerarse un candidato adecuado para controlar cepas su uso como agente virulento contra cepas susceptibles de *E. coli*.

El genoma del fago EcoPhCCP1 tiene un tamaño de 44.482 pb y un contenido de GC del 50,71%. El genoma del fago EcoPhCCP1 codifica 87 ORFs, de los cuales 33 ORFs (37,9%) coinciden con proteínas funcionales conocidas, incluidas proteínas estructurales, proteínas reguladoras lisogénicas, proteínas de lisis del hospedador y proteínas replicativas y de empaquetamiento del ADN (**Figura 4**). Los demás ORF se definieron como proteínas hipotéticas con funciones desconocidas. El mecanismo de lisis del huésped está codificado en las proteínas predichas de endolisina y holina. La función de la endolisina es lisar la membrana celular del hospedador y liberar la progenie del fago (Schmelcher et al. 2012), y la función de

la holina predicha es abrir pequeños poros en la membrana del hospedador y permeabilizarla (Cahill & Young 2021). No se encontraron genes codificantes para rRNA y tRNA en el genoma.

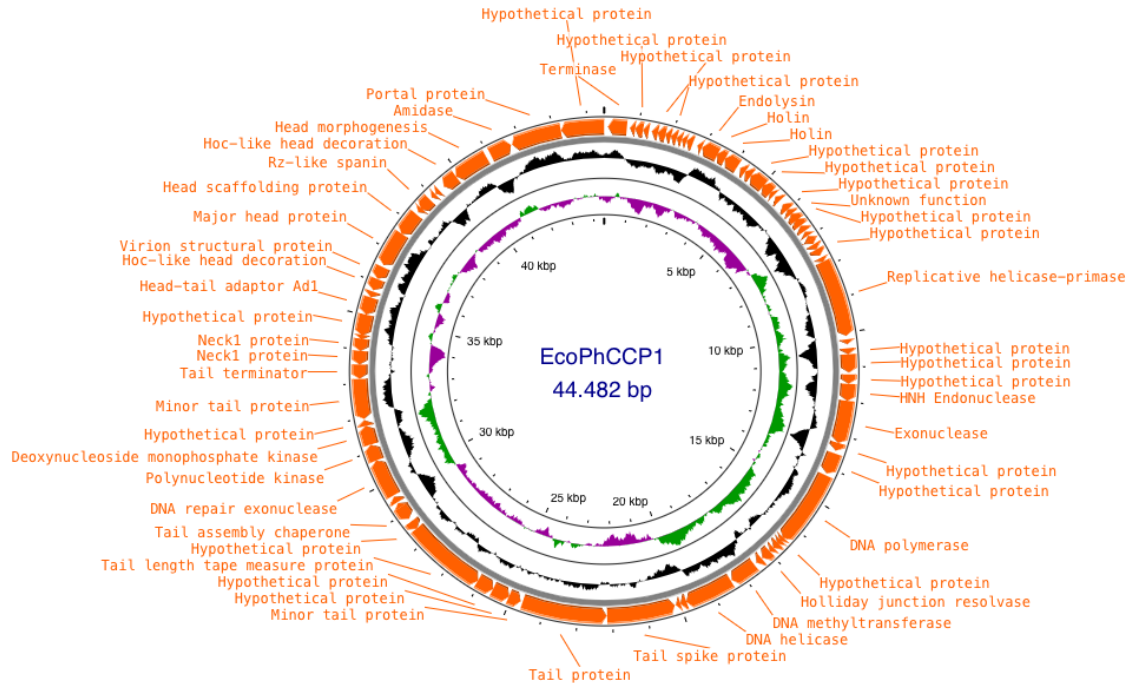


Figura 4. Mapa genómico del fago EcoPhCCP1 obtenido usando Proksee.

Análisis comparativo del Genoma

El genoma del fago EcoPhCCP1 es similar a 12 genomas de especies del género *Kagunavirus* (**Tabla 1**), comprobados en la página web del ICTV (Fauquet et al. 2005). Este género fue creado por Anani et al. (2015) con el antiguo nombre de *K1gvirus* bajo la propuesta 2015.044fB asignada por los responsables del ICTV y posteriormente rebautizado como *Kagunavirus*. Pertenece a la subfamilia *Guernseyvirinae* creada bajo la misma propuesta por los mismos autores. Su pariente más cercano es el fago vB_EcoS-Golestan (nº de acceso NC_042084.1) con el mayor alineamiento (64,65%), obtenido mediante ANIb usando JspeciesWS (Richter et al. 2016). Al comparar ambas secuencias genéticas con Clinker (**Figura**

5), se observa que ambos genomas comparten un alto porcentaje de identidad. La ausencia de regiones conectadas sugiere la ausencia de genes homólogos entre EcoPhCCP1 y vB_EcoS-Golestan.

Phage	ANI with EcoPhCCP1 (%)	Aligned with EcoPhCCP1 (%)	Accession	Genome size	GC content (%)	Host	Reference
EcoPhCCP1	x	x	PQ384582	44.482	50.71	<i>Escherichia coli</i> UCO-452	This work
K1ind1	87.70	53.08	GU196279	42.292	51.5	<i>Escherichia coli</i>	Bull et al. 2010
vB_EcoS-Golestan	87.53	64.65	NC_042084.1	44.829	50.5	<i>Escherichia coli</i>	Yazdi et al. 2020
UTI-CM001	87.25	60.86	OM810255.1	41.222	51	<i>Escherichia coli</i>	x
K1G	86.79	57.56	NC_027993.1	43.587	51	<i>Escherichia coli</i>	
UTI89UKE1	86.79	59.03	MZ234048.1	41.265	51	<i>Escherichia coli</i>	
K1ind2	86.42	58.71	GU196280	42.765	51.5	<i>Escherichia coli</i>	Bull et al. 2010
G_AB-2017	86.38	54.38	KY295895.1	41.519	51	<i>Escherichia coli</i>	Baig et al. 2017
L_AB-2017	86.20	58.76	KY295896.1	41.039	51	<i>Escherichia coli</i>	Baig et al. 2017
RP180	86.16	61.62	NC_048181.1	44.851	50.5	<i>Raoultella sp.</i>	Fofanov et al. 2019
K1H	86.01	52.81	NC_027994.1	43.587	51	<i>Escherichia coli</i>	Bull et al. 2010
ULINTec2	85.93	54.78	MZ997838.1	40.815	51	<i>Escherichia coli</i>	Antoine et al. 2021
P_AB-2017	85.87	51.11	KY295898.1	41.184	51.5	<i>Escherichia coli</i>	Baig et al. 2017

Tabla 1. Fagos relacionados con EcoPhCCP1 pertenecientes al genero *Kagunavirus*.

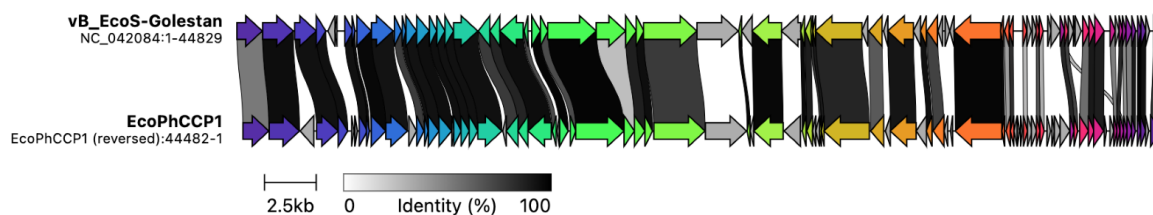
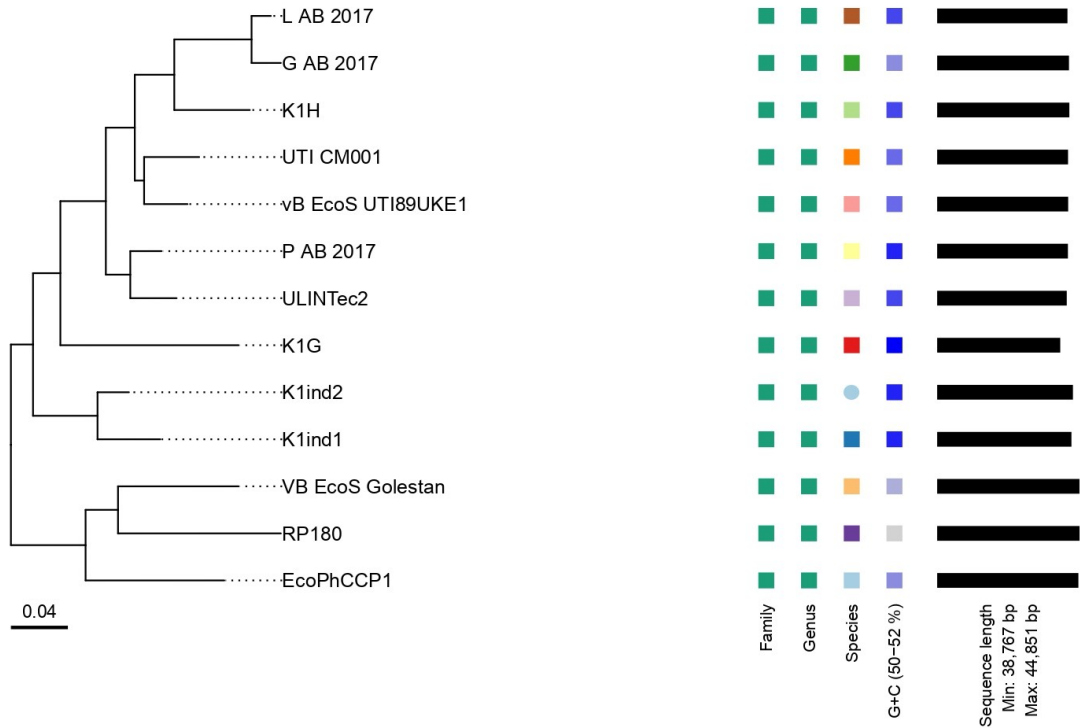


Figura 5. Comparación del genoma entre EcoPhCCP1 y su pariente mas cercano, vB_EcoS-Golestan, utilizando la alineación de todas las secuencias de proteínas anotadas con Clinker.

Según el Subcomité de Virus Bacterianos y Arqueales de la ICTV, se considera que dos fagos pertenecen a la misma especie si comparten una identidad de al menos el 95 % de sus genomas a nivel de nucleótidos de longitud completa en un análisis recíproco (Turner et al. 2021). El mismo comité estableció un umbral de identidad del genoma completo del 70 % para agruparlos en el mismo género, calculado de la misma manera. Estos niveles de identidad pueden evaluarse utilizando herramientas como BLASTn (donde el porcentaje de identidad se multiplica por el porcentaje de cobertura) o VIRIDIC. El análisis VIRIDIC (que emplea un algoritmo como el utilizado por el ICTV) mostró una similitud intergenómica baja ($\leq 70.6\%$) entre EcoPhCCP1 y todos los demás miembros del género *Kagunavirus* (K1ind1,

vB_EcoS-Golestan, UTI-CM001, K1G, UTI89UKE1, K1ind2, G_AB-2017, L_AB-2017, RP180, K1H, ULINTec2 y P_AB-2017) (**Figura 7**), lo que indica que el fago EcoPhCCP1 no pertenece a la misma especie que sus parientes pertenecientes al género *kagunavirus* (con umbrales por defecto para la demarcación de virus en especies (95%) y en géneros (~70%)). El análisis VIRIDIC también mostró que el fago del presente estudio (EcoPhCCP1) tenía la mayor similitud intergenómica (70,6%) con el fago vB_EcoS-Golestan (**Figura 7**). Según Simmonds et al. (2023), estos umbrales son aproximaciones al parentesco evolutivo y se recomienda el uso de métodos filogenéticos que calculan el soporte de clados, como VICTOR, para analizar la relación entre virus (Meier-Kolthoff & Goker, 2017). Aquí, empleamos VICTOR, diseñado para virus procariotas, ya que permite clasificaciones a nivel de especie, género y familia (**Figura 6**).

Nuestro análisis VICTOR mostró que todos los fagos clasificados dentro del género *Kagunavirus* son especies distintas (**Figura 6**). Basándonos en los análisis VIRIDIC y VICTOR, el fago EcoPhCCP1 se clasifica como una sola especie dentro del género *Kagunavirus*, pero esto puede reconsiderarse debido a su puntuación de similitud marginal del 70,6% con su pariente más cercano (puntuación obtenida con VIRIDIC), vB_EcoS-Golestan, que lo sitúa justo por encima del umbral para su inclusión dentro del mismo género. Esta proximidad al umbral sugiere que EcoPhCCP1 puede representar un linaje único con posibles diferencias genómicas, estructurales o funcionales con respecto al fago genéticamente más cercano vB_EcoS-Golestan, perteneciente al género *Kagunavirus*. Estas características distintivas podrían indicar que EcoPhCCP1 es lo suficientemente divergente como para justificar el establecimiento de un nuevo género. Se necesitan más análisis para confirmar si EcoPhCCP1 posee rasgos novedosos que justifiquen esta distinción taxonómica. Dicho esto, incluimos el fago EcoPhCCP1 dentro del género *Kagunavirus*.



VICTOR nt tree with suggested taxa (trimming, D0)

Figura 6. Análisis del fago EcoPhCCP1 y sus parientes más cercanos mediante la filogenia basada en el genoma completo. El árbol se obtuvo usando VICTOR con el método de filogenia a distancia del genoma BLAST (GBDP). La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

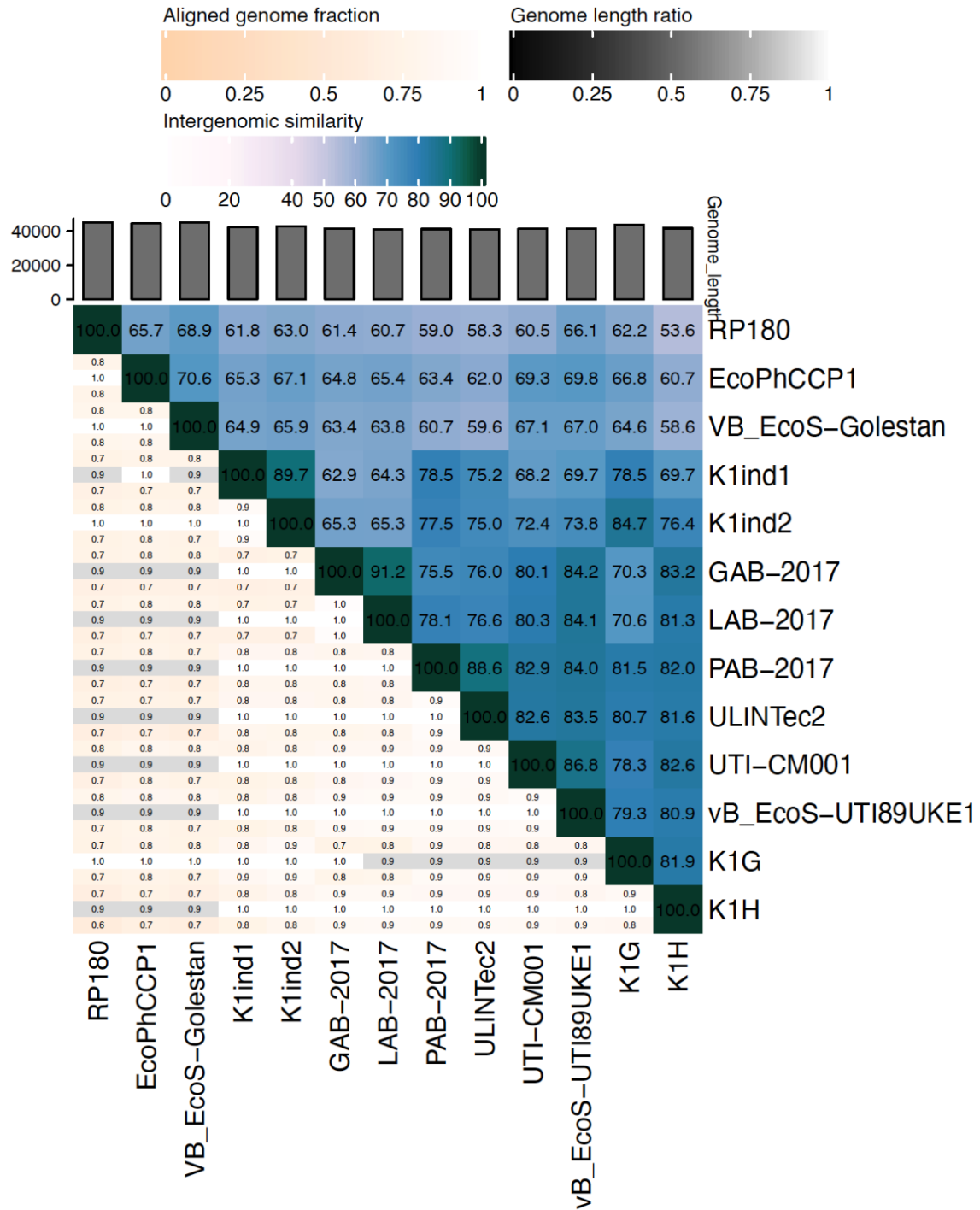


Figura 7. Mapa térmico de similitud intergenómica de EcoPhCCP1 y sus fagos parientes más cercanos en el género *Kagunavirus* basado en alineaciones BLASTn utilizando la herramienta VIRIDIC.

El pariente más cercano del fago EcoPhCCP1 dentro del género *Kagunavirus* es el fago vB_EcoS-Golestan (número de acceso NC_042084.1). Este fago tiene un genoma de 44,829 pb, un contenido de GC del 50.6%, y codifica 78 ORF. El fago VB_ecoS-Golestan mostró una alta estabilidad en un rango de temperatura de 37°C a 45°C y en un rango de pH de 5 a 10, lo que lo hace adecuado para diversas condiciones ambientales. Fue aislado de aguas residuales y pertenece a la familia Siphoviridae. Su cápside es hexagonal, con un diámetro de 35 nm y una cola no contráctil de 28 nm de longitud. Su actividad lítica es notable, con un tamaño de explosión de aproximadamente 100 unidades formadoras de placa (ufp) por célula infectada y un período de latencia de unos 40 minutos, lo que permite una rápida reducción de la población bacteriana. No se encontraron genes de resistencia a antibióticos ni factores de virulencia en su genoma. En relación con las fimbrias bacterianas, el artículo menciona que el fago VB_ecoS-Golestan reconoce y se une a las fimbrias de cepas de *E. coli*. La presencia de genes de adhesión como *fimH*, *pap*, *sfa* y *afa* en cepas de *E. coli* aumenta la susceptibilidad de estas bacterias a la actividad lítica del fago (Yazdi et al. 2020). Este factor de virulencia, como las fimbrias, es un buen receptor para la unión de bacteriófagos que poseen fibras de cola (León & Bastías 2015).

Cuatro fagos descritos dentro del género *Kagunavirus* y genómicamente similares a EcoPhCCP1 son los fagos K1 (K1ind1 con un tamaño de genoma de 42.292 pb, número de acceso GU196279; K1ind2 con un tamaño de genoma de 42.765 pb, número de acceso GU196280; K1G con un tamaño de genoma de 43.587 pb, número de acceso NC_027993.1; y K1H con un tamaño de genoma de 41.632 pb, número de acceso NC_027994.1). Estos fagos se caracterizan por contener en su genoma un gen que codifica para la endosialidasa, una enzima que degrada el ácido siálico presente en las cápsulas bacterianas de *Escherichia coli* K1 (cápsula K1). Esta cápsula proporciona un recubrimiento protector para ciertas cepas de *E. coli* contra la fagocitosis. En el artículo de Bull et al. (2010), en el que se estudió la

efectividad de la terapia con fagos sobre fagos dependientes de la cápsula K1 (fagos K1-dep, como K1G y K1H, formalmente llamados K1-dep4 y K1-dep1, respectivamente) y fagos independientes de la cápsula K1 (K1ind1 y K1ind2), se demostró que la actividad de la enzima endosialidasa es crítica para el éxito de la terapia con fagos contra *E. coli* con cápsula K1 en suero. Esto se debe a que los fagos K1-dep mostraron una mayor adaptación en suero que aquellos que eran K1-ind. Además, los genomas de los fagos K1-ind y K1-dep eran muy similares, excepto por el gen de la espiga de la cola que codifica la sialidasa en los fagos K1-dep. Esta diferencia en el gen de la cola es la principal responsable de la variación en la actividad de la sialidasa y, por lo tanto, en la mejor adaptación de los fagos K1-dep en suero. A todos los fagos K1 se les realizó un ensayo de adsorción y una curva de crecimiento en un solo paso, pero no se llevó a cabo ni la caracterización morfológica mediante microscopía electrónica ni la determinación del rango de hospedadores. Todos los fagos K1 fueron aislados de muestras de aguas residuales de diferentes regiones de los Estados Unidos, y de Rusia, como es el caso del fago K1ind2. Los puntajes obtenidos mediante VIRIDIC mostraron una baja similitud intergenómica entre los fagos K1 (K1ind1 con 65.3; K1ind2 con 67.1; K1G con 66.8 y K1H con 60.7) y el fago EcoPhCCP1.

Otro miembro del género *Kagunavirus* con similitud genómica con EcoPhCCP1 es el fago *E. coli* UTI-CM001 (número de acceso OM810255.1), aislado de aguas residuales en Suiza usando una cepa uropatógena de *E. coli* EC20 como hospedador. Es un fago de ADN lineal de doble hebra con un tamaño de genoma de 41.222 pb y un contenido GC de 51%. Su genoma contiene 67 ORFs, de los cuales 14 coinciden con proteínas funcionales conocidas, incluidas proteínas estructurales, proteínas reguladoras lisogénicas, proteínas de lisis del hospedador y proteínas replicativas y de empaquetamiento del ADN. 53 ORFs no forman parte de proteínas funcionales conocidas, por lo que se definieron como proteínas hipotéticas. Se realizó microscopía electrónica para este fago, pero no se llevaron

a cabo otras caracterizaciones, como la determinación del rango de hospedadores o ensayos de estabilidad. El puntaje obtenido mediante VIRIDIC mostró una baja similitud intergenómica entre UTI-CM001 (69.3) y el fago EcoPhCCP1.

Otro miembro descrito del género *Kagunavirus* con similitud de genoma con EcoPhCCP1 es el fago RP180 (número de acceso NC_048181.1). El fago RP180 es un fago lítico capaz de infectar la cepa de *Raoultella sp.* CEMTC 2544, obtenida de la Colección de Microorganismos Extremófilos y Cultivos Tipo (CEMTC, por sus siglas en inglés) del Instituto de Biología Química y Medicina Fundamental (ICBFM), Siberia, Rusia. Este fago tiene un genoma de ADN lineal de doble cadena con una longitud de 44.851 pb y un contenido de GC del 50.3%. Su genoma contiene 65 ORFs putativos, de los cuales 35 se predijeron como proteínas funcionales, tales como proteínas estructurales, proteínas de lisis del hospedador y proteínas replicativas y de empaquetado de ADN. Las otras 30 fueron clasificadas como proteínas hipotéticas. No se encontraron genes perjudiciales, como aquellos asociados con resistencia a antibióticos, lisogenia, toxinas o factores de virulencia en su genoma. El análisis genómico también mostró que el fago RP180 codifica una nucleasa tipo Cas4 similar a CRISPR. La proteína Cas4 es una de las principales proteínas asociadas con el sistema CRISPR (Cas) y participa en el módulo de adaptación en muchas variantes del sistema CRISPR-Cas en procariotas, protegiéndolos contra elementos genéticos invasores. Cas4 es conocida como una exonucleasa de ADN que contiene un dominio de nucleasa RecB y un módulo de unión de cluster Fe-S (Dixit et al. 2021). La microscopía electrónica del fago RP180 reveló su morfología, con una cabeza icosaédrica con un diámetro de 55-60 nm, conectada con una cola no contráctil de aproximadamente 120 nm de longitud, y una placa base de 20 nm de anchura con fibras de la cola situadas en el extremo de la misma. La puntuación obtenida mediante VIRIDIC mostró una baja similitud intergenómica entre el fago RP180 (65,7) y EcoPhCCP1, lo que demuestra que el

fago del presente estudio (EcoPhCCP1) no pertenece a la misma especie que el fago RP180.

El último fago caracterizado perteneciente al género *Kagunavirus* y genómicamente similar a EcoPhCCP1 es el fago vB_EcoS_K1-ULINTec2 (número de acceso MZ997838.1). Este fago tiene un genoma de 40.815 pb que parece codificar la actividad endosialidasa, lo que le permite dirigirse a la cápsula K1 de *E. coli*, y se aisló utilizando *E. coli* O18:K1 (APEC 45) como hospedador. Es dependiente del tipo capsular K1 como los fagos K1G y K1H mencionados en Bull et al. (2010). Se determinó el rango de hospedadores de otros fagos aislados utilizando *E. coli* O18:K1, siendo el fago vB_EcoS_K1-ULINTec2 el que tiene el rango de hospedadores más estrecho según Antoine et al. (2021). El análisis del genoma de este fago mostró que se trata de un sifovirus relacionado con el género *Kagunavirus*. Se realizó una caracterización completa de este fago, incluyendo la Eficiencia de Placado (EoP), el rango de hospedador, el tiempo de adsorción, la estabilidad a temperatura y pH y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), que reveló la morfología del fago, caracterizada por una cabeza icosaédrica simétrica no envuelta con un diámetro de aproximadamente 50 nm, y una cola flexible no contráctil de aproximadamente 150 nm de longitud, atribuida a la familia Siphoviridae. Este fago demostró su eficacia in vitro al mostrar su capacidad para lisar cepas K1.

El resto de fagos pertenecientes al género *Kagunavirus* (G_AB-2017, número de acceso KY295895.1; L_AB-2017, número de acceso KY295896.1 y P_AB-2017, número de acceso KY295898.1) no fueron caracterizados más allá de su genoma cargado en la base de datos GenBank. El puntaje obtenido con VIRIDIC están por debajo de la puntuación de corte para ser clasificadas como la misma especie con EcoPhCCP1 (G_AB-2017, 64.8; L_AB-2017, 65.4 y P_AB-2017 con 63.4, respectivamente).

La identificación de proteínas putativas con funciones Anti CRISPR-Cas se realizó utilizando dos herramientas de predicción: PaCRISPR y acRanker. En el análisis inicial, PaCRISPR predijo un total de 13 proteínas con posible función Anti CRISPR-

Cas (utilizando un umbral de corte por defecto de $> 0,5$, que puede considerarse como una proteína putativa Anti CRISPR-Cas), mientras que acRanker identificó 29 proteínas (el umbral de corte de AcRanker se estableció en $> -5,0$). Una proteína putativa con una puntuación de predicción superior a -5 se considerará anti-CRISPR). Sin embargo, para aumentar la confianza en los resultados, se aplicó un segundo filtro que consistía en seleccionar sólo aquellas proteínas que fueran identificadas simultáneamente por ambos predictores. A partir de este criterio más estricto, se obtuvieron un total de 8 proteínas que podrían desempeñar un papel como inhibidores de los sistemas CRISPR-Cas (**Tabla 2**).

Protein	Score using PaCRISPR	Score using AcRanker	Protein Sequence
EcoPhCCP1			
CDS_0085	0.810	-4.7110577	MKLQTLFFPYGEITFDRENFINVNELVDQMNRWRLDNGMGTRELQVMTDGGFKIFKEEKEKQLGIENAIRATK GRNGRTFACFLHAVYIAEQSAYFHLVIDRFITQRQVELRNIGAVSFVELNAAVSRMIERTTEGRIGHSGHFIQVAK AVKESVDIRDVTGFDTWDSQDAKTNQLRSDIQKALVTLDDMEAVNTWGELKEAIPRVVRKCAANIR
CDS_0066	0.801	-2.7830238	MRECTMGTIFVIRVYDEEWDEWWDIYAVGSKEEAAKEMTERSDRGQLTNFYEMPFKSE
CDS_0051	0.644	-3.2495449	MKLNVDGEIYSIHSFNTFTIEYISKDGNFVLSVSSNGKYEKSRCYLSDIKRSFKKREGKK
CDS_0007	0.606	-3.2433	MTNNEYEKLVSVESATGESEIAWIDANIERYLRQVDILMERRRELINRFNLNKGDGNA
CDS_0037	0.588	-4.880656	MIQLYRAVDRRDSTEALWLLRAPSGAHQMEEMAYLGKVPKPKDIGRHVSQIKRTTFAPPDFVFESMYGWAMH CEHKTRHLIDQWENRV
CDS_0025	0.548	-1.6661181	MQIIITDNTVYETTNDTLENIGVNIIGDIFDVLDSCEGGWWIKVRHYKVPVTKAEAEIYTTASNHDARADDSGGC RVK
CDS_0016	0.547	-3.6444783	MVQRYNYTREPDDVGVFVEYEDYKLEAELQKYKQFPDYVEACNGSVTHVEGVE
CDS_0004	0.501	-4.0752497	MFSDINAAIEEAIWRRYNGEQQRHFCLVQRGNIAVVQDRDNKYPNAMWTRNRLG

Tabla 2. Proteínas putativas predichas con funciones Anti CRISPR-Cas utilizando PaCRISPR y AcRanker como predictores. El umbral de corte para PaCRISPR es $> 0,5$, y el umbral de corte para AcRanker $> -5,0$.

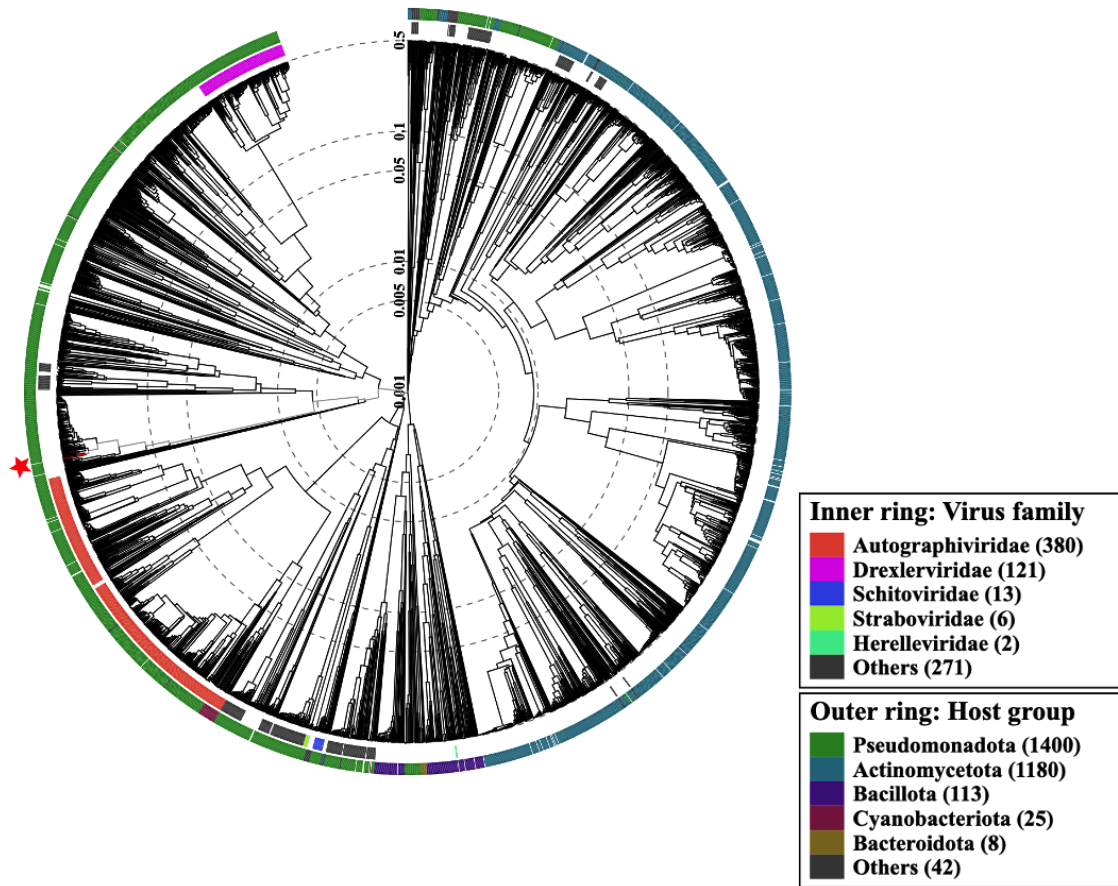


Figura 8. Árbol filogenético del fago de *Escherichia coli* EcoPhCCP1. La filogenia del fago se construyó siguiendo el método de clasificación establecido por la ICTV. La estrella roja indica la ubicación filogenética del fago EcoPhCCP1.

CONCLUSIÓN

Aislamos y caracterizamos el genoma completo del fago lítico con ADN doble hebra (dsDNA, por sus siglas en inglés) de *E. coli*. EcoPhCCP1 es un bacteriófago que pertenece a la clase Caudoviricetes, género *Kagunavirus*. EcoPhCCP1 se aisló a partir de una muestra de aguas residuales de la planta de tratamiento de aguas residuales de Concepción (Chile). Este fago tiene un estrecho rango de hospedadores, capaz de infectar 4 cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC). Permanece estable entre los 50 y 65 °C y a temperaturas superiores, su estabilidad se reduce significativamente, al igual que en condiciones de pH extremas (muy ácido o muy alcalino). El análisis genómico del fago EcoPhCCP1 demostró que carece de genes nocivos, incluidos los relacionados con la resistencia a los antibióticos, la lisogenia, las toxinas o los factores de virulencia. Esto indica que EcoPhCCP1 podría ser un candidato viable para su uso como agente virulento contra *E. coli*.

BIBLIOGRAFÍA

Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltmann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>

Aframian, N., & Eldar, A. (2023). Abortive infection antiphage defense systems: separating mechanism and phenotype. *Trends in Microbiology*, *31*(10), 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.05.002>

Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., . . . McArthur, A. G. (2022). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)

Antine, S. P., Johnson, A. G., Mooney, S. E., Leavitt, A., Mayer, M. L., Yirmiya, E., Amitai, G., Sorek, R., & Kranzusch, P. J. (2023). Structural basis of Gabija anti-phage defence and viral immune evasion. *Nature*, *625*(7994), 360–365. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06855-2>

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, 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>

Behzadi, P., Urbán, E., & Gajdács, M. (2020). Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic Escherichia coli (UPEC): An In Vitro Study. *Diseases*, 8(2), 17. <https://doi.org/10.3390/diseases8020017>

Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K. L., & Davidson, A. R. (2012). Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*, 493(7432), 429–432. <https://doi.org/10.1038/nature11723>

Borges, A. L., Davidson, A. R., & Bondy-Denomy, J. (2017). The discovery, mechanisms, and evolutionary impact of Anti-CRISPRs. *Annual Review of Virology*, 4(1), 37–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041616>

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., . . . Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>

Bouras, G., Nepal, R., Houtak, G., Psaltis, A. J., Wormald, P., & Vreugde, S. (2022). Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool. *Bioinformatics*, 39(1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac776>

Breitbart, M., Bonnain, C., Malki, K., & Sawaya, N. A. (2018). Phage puppet masters of the marine microbial realm. *Nature Microbiology*, 3(7), 754–766. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0166-y>

Brüssow, H., & Hendrix, R. W. (2002). Phage Genomics. *Cell*, 108(1), 13–16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00637-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00637-7)

- Cahill, J., & Young, R. (2020). Release of phages from prokaryotic cells. In *Elsevier eBooks* (pp. 501–518). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814515-9.00074-6>
- Chen, L., Yuan, S., Liu, Q., Mai, G., Yang, J., Deng, D., Zhang, B., Liu, C., & Ma, Y. (2018). In Vitro Design and Evaluation of Phage Cocktails Against *Aeromonas salmonicida*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01476>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2019). Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Couce, A., & Blázquez, J. (2009). Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(3), 531–538. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00165.x>
- Dao, F., Liu, M., Su, W., Lv, H., Zhang, Z., Lin, H., & Liu, L. (2022). AcrPred: A hybrid optimization with enumerated machine learning algorithm to predict Anti-CRISPR proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 228, 706–714. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.250>
- Dong, C., Wang, X., Ma, C., Zeng, Z., Pu, D., Liu, S., Wu, C., Chen, S., Deng, Z., & Guo, F. (2022). Anti-CRISPRdb v2.2: an online repository of anti-CRISPR proteins including information on inhibitory mechanisms, activities and neighbors of curated anti-CRISPR proteins. *Database*, 2022. <https://doi.org/10.1093/database/baac010>
- Drugdová, Z., & Kmeť, V. (2012). Prevalence of β -lactam and fluoroquinolone resistance, and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chickens in Slovakia. *Biologia*, 68(1), 11–17. <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0142-6>
- Eitzinger, S., Asif, A., Watters, K. E., Iavarone, A. T., Knott, G. J., Doudna, J. A., & Minhas, F. U. a. A. (2020). Machine learning predicts new anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Research*, 48(9), 4698–4708. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa219>

Fauquet, C., & Fargette, D. (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology Journal*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/1743-422x-2-64>

Fortier, L., & Moineau, S. (2009). Phage production and maintenance of stocks, including expected stock lifetimes. *Methods in Molecular Biology*, 203–219. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_19

Gilchrist, C. L. M., & Chooi, Y. (2021). clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, 37(16), 2473–2475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab007>

Golec, P., Dąbrowski, K., Hejnowicz, M. S., Gozdek, A., Łoś, J. M., Węgrzyn, G., Łobocka, M. B., & Łoś, M. (2011). A reliable method for storage of tailed phages. *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 486–489. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.007>

Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W484–W492. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad326>

Guo, M., Yuan, Q., & Yang, J. (2015). Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater. *Environmental Science & Technology*, 49(9), 5771–5778. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00644>

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>

Handrova, L., & Kmet, V. (2019). Antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* from eagles and goshawks. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 54(7), 605–614. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1608103>

Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2021). Phage therapy for Antibiotic-Resistant bacterial infections. *Annual Review of Medicine*, 73(1), 197–211. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208>

Hoiby, N. (2000). Ecological antibiotic policy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(90001), 59–62. https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl_1.59

Hrudey, S., Payment, P., Huck, P., Gillham, R., & Hrudey, E. (2003). A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science & Technology*, 47(3), 7–14. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0146>

Huang, J., Lv, C., Li, M., Rahman, T., Chang, Y., Guo, X., Song, Z., Zhao, Y., Li, Q., Ni, P., & Zhu, Y. (2024). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* exhibit diverse spatiotemporal epidemiological characteristics across the globe. *Communications Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05745-7>

Huang, L., Yang, B., Yi, H., Asif, A., Wang, J., Lithgow, T., Zhang, H., Minhas, F. U. a. A., & Yin, Y. (2020). AcrDB: a database of anti-CRISPR operons in prokaryotes and viruses. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D622–D629. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa857>

Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., & Aarestrup, F. M. (2014). Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1501–1510. <https://doi.org/10.1128/jcm.03617-13>

Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>

Kasman, L. M., & Porter, L. D. (2022, September 26). *Bacteriophages*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>

- Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods in Molecular Biology*, 69–76. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_7
- 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>
- Lederberg, J., & Lederberg, E. M. (1952). REPLICA PLATING AND INDIRECT SELECTION OF BACTERIAL MUTANTS. *Journal of Bacteriology*, 63(3), 399–406. <https://doi.org/10.1128/jb.63.3.399-406.1952>
- LeRoux, M., & Laub, M. T. (2022). Toxin-Antitoxin systems as phage defense elements. *Annual Review of Microbiology*, 76(1), 21–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020722-013730>
- Li, Y., Shen, Z., Zhang, M., Yang, X., Cleary, S. P., Xie, J., Marathe, I. A., Kostelic, M., Greenwald, J., Rish, A. D., Wysocki, V. H., Chen, C., Chen, Q., Fu, T., & Yu, Y. (2024). PtuA and PtuB assemble into an inflammasome-like oligomer for anti-phage defense. *Nature Structural & Molecular Biology*, 31(3), 413–423. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01172-8>
- Liu, C., Hong, Q., Chang, R. Y. K., Kwok, P. C. L., & Chan, H. (2022). Phage–Antibiotic therapy as a promising strategy to combat Multidrug-Resistant infections and to enhance antimicrobial efficiency. *Antibiotics*, 11(5), 570. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050570>
- Liu, Y., Dai, L., Dong, J., Chen, C., Zhu, J., Rao, V. B., & Tao, P. (2020). Covalent modifications of the bacteriophage genome confer a degree of resistance to bacterial CRISPR systems. *Journal of Virology*, 94(23). <https://doi.org/10.1128/jvi.01630-20>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>

Loeff, L., Walter, A., Rosalen, G. T., & Jinek, M. (2023). DNA end sensing and cleavage by the Shedu anti-phage defense system. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2023.08.10.552762>

Loureiro, A., & Da Silva, G. (2019). CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics*, 8(1), 18. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8010018>

Lu, Z., Breidt, F., Plengvidhya, V., & Fleming, H. P. (2003). Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3192–3202. <https://doi.org/10.1128/aem.69.6.3192-3202.2003>

Luong, T., Salabarria, A., & Roach, D. R. (2020). Phage therapy in the resistance era: Where do we stand and where are we going? *Clinical Therapeutics*, 42(9), 1659–1680. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.014>

Luria, S. E., & Delbrück, M. (1943). MUTATIONS OF BACTERIA FROM VIRUS SENSITIVITY TO VIRUS RESISTANCE. *Genetics*, 28(6), 491–511. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.6.491>

Ly-Chatain, M. H. (2014). The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00051>

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnyš, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., . . . Koonin, E. V. (2019). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>

Manohar, P., & Ramesh, N. (2019). Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51742-4>

- McNair, K., Zhou, C., Dinsdale, E. A., Souza, B., & Edwards, R. A. (2019). PHANOTATE: a novel approach to gene identification in phage genomes. *Bioinformatics*, *35*(22), 4537–4542. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz265>
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Meier-Kolthoff, J. P., & Göker, M. (2017). VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics*, *33*(21), 3396–3404. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx440>
- Merabishvili, M., Monserez, R., Van Belleghem, J., Rose, T., Jennes, S., De Vos, D., Verbeken, G., Vaneechoutte, M., & Pirnay, J. (2017). Stability of bacteriophages in burn wound care products. *PLoS ONE*, *12*(7), e0182121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182121>
- Merabishvili, M., Vervaet, C., Pirnay, J., De Vos, D., Verbeken, G., Mast, J., Chanishvili, N., & Vaneechoutte, M. (2013). Stability of Staphylococcus aureus Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization). *PLoS ONE*, *8*(7), e68797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068797>
- 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>
- Mueller, M., & Tainter, C. R. (2023, July 13). *Escherichia coli Infection*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta,

M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. a. P., McManigal, B., . . . Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)

Newcombe, H. B. (1949). Origin of bacterial variants. *Nature*, 164(4160), 150–151. <https://doi.org/10.1038/164150a0>

Nguyen, A. Q., Vu, H. P., Nguyen, L. N., Wang, Q., Djordjevic, S. P., Donner, E., Yin, H., & Nghiem, L. D. (2021). Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. *The Science of the Total Environment*, 783, 146964. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146964>

Park, Y. S., Adams-Haduch, J. M., Shutt, K. A., Yarabinec, D. M., Johnson, L. E., Hingwe, A., Lewis, J. S., Jorgensen, J. H., & Doi, Y. (2012). Clinical and Microbiologic Characteristics of Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* at Three Centers in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1870–1876. <https://doi.org/10.1128/aac.05650-11>

Qasemi, A., Rahimi, F., & Katouli, M. (2021). Genetic diversity and virulence characteristics of biofilm-producing uropathogenic *Escherichia coli*. *International Microbiology*, 25(2), 297–307. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00221-w>

Raju, R. S., Nahid, A. A., Dev, P. C., & Islam, R. (2022). VirusTaxo: Taxonomic classification of viruses from the genome sequence using k-mer enrichment. *Genomics*, 114(4), 110414. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110414>

Rakhuba, D., Kolomiets, E., Dey, E. S., & Novik, G. (2010). Bacteriophage Receptors, Mechanisms of Phage Adsorption and Penetration into Host Cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145–155. <https://doi.org/10.33073/pjm-2010-023>

Ramsey, J., Rasche, H., Maughmer, C., Criscione, A., Mijalis, E., Liu, M., Hu, J. C., Young, R., & Gill, J. J. (2020). Galaxy and Apollo as a biologist-friendly interface for

high-quality cooperative phage genome annotation. *PLoS Computational Biology*, 16(11), e1008214. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008214>

Richter, M., Rosselló-Móra, R., Glöckner, F. O., & Peplies, J. (2015). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>

Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (2012). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147–1171. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>

Septimus, E. J. (2018). Antimicrobial resistance. *Medical Clinics of North America*, 102(5), 819–829. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.04.005>

Shen, A., & Millard, A. (2021). Phage genome annotation: where to begin and end. *PHAGE*, 2(4), 183–193. <https://doi.org/10.1089/phage.2021.0015>

Shen, W., Le, S., Li, Y., & Hu, F. (2016). SeqKit: a Cross-Platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLoS ONE*, 11(10), e0163962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>

Simmonds, P., Adriaenssens, E. M., Zerbini, F. M., Abrescia, N. G. A., Aiewsakun, P., Alfenas-Zerbini, P., Bao, Y., Barylski, J., Drosten, C., Duffy, S., Duprex, W. P., Dutilh, B. E., Elena, S. F., García, M. L., Junglen, S., Katzourakis, A., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., . . . Vasilakis, N. (2023). Four principles to establish a universal virus taxonomy. *PLoS Biology*, 21(2), e3001922. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001922>

Simpson, J. M., Domingo, J. W. S., & Reasoner, D. J. (2002). Microbial source tracking: State of the science. *Environmental Science & Technology*, 36(24), 5279–5288. <https://doi.org/10.1021/es026000b>

Skurnik, M., Pajunen, M., & Kiljunen, S. (2007). Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnology Letters*, 29(7), 995–1003. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9346-1>

Terzian, P., Ndela, E. O., Galiez, C., Lossouarn, J., Bucio, R. E. P., Mom, R., Toussaint, A., Petit, M., & Enault, F. (2021). PHROG: families of prokaryotic virus proteins clustered using remote homology. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/nargab/lqab067>

Tewawong, N., Kowaboot, S., Pimainog, Y., Watanagul, N., Thongmee, T., & Poovorawan, Y. (2020). Distribution of phylogenetic groups, adhesin genes, biofilm formation, and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients in Thailand. *PeerJ*, 8, e10453. <https://doi.org/10.7717/peerj.10453>

Turner, D., Adriaenssens, E. M., Tolstoy, I., & Kropinski, A. M. (2021). Phage Annotation Guide: Guidelines for Assembly and High-Quality Annotation. *PHAGE*, 2(4), 170–182. <https://doi.org/10.1089/phage.2021.0013>

Vasu, K., & Nagaraja, V. (2013). Diverse functions of Restriction-Modification systems in addition to cellular defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 53–72. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00044-12>

Wang, J., Dai, W., Li, J., Xie, R., Dunstan, R. A., Stubenrauch, C., Zhang, Y., & Lithgow, T. (2020). PaCRISPR: a server for predicting and visualizing anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W348–W357. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa432>

Wang, S., Sun, E., Liu, Y., Yin, B., Zhang, X., Li, M., Huang, Q., Tan, C., Qian, P., Rao, V. B., & Tao, P. (2022). The complex roles of genomic DNA modifications of bacteriophage T4 in resistance to nuclease-based defense systems of *E. coli*. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2022.06.16.496414>

Wang, S., Sun, E., Liu, Y., Yin, B., Zhang, X., Li, M., Huang, Q., Tan, C., Qian, P., Rao, V. B., & Tao, P. (2023). Landscape of New Nuclease-Containing Antiphage Systems in *Escherichia coli* and the Counterdefense Roles of Bacteriophage T4 Genome Modifications. *Journal of Virology*, 97(6). <https://doi.org/10.1128/jvi.00599-23>

Whelan, S., Lucey, B., & Finn, K. (2023). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. *Microorganisms*, 11(9), 2169. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092169>

Yamamoto, K. R., Alberts, B. M., Benzinger, R., Lawhorne, L. W., & Treiber, G. (1970). Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40(3), 734–744. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90218-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90218-7)

Yi, H., Huang, L., Yang, B., Gomez, J., Zhang, H., & Yin, Y. (2020). AcrFinder: genome mining anti-CRISPR operons in prokaryotes and their viruses. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W358–W365. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa351>

Yoo, S., Lee, K., Kim, N., Vu, T. N., Abadie, R., & Yong, D. (2023). Designing phage cocktails to combat the emergence of bacteriophage-resistant mutants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 12(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01258-23>

Zhen, X., Xu, X., Ye, L., Xie, S., Huang, Z., Yang, S., Wang, Y., Li, J., Long, F., & Ouyang, S. (2024). Structural basis of antiphage immunity generated by a prokaryotic Argonaute-associated SPARSA system. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44660-7>

Zierdt, C. H. (1988). Stabilities of lyophilized *Staphylococcus aureus* typing bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2590. <https://doi.org/10.1128/aem.54.10.2590-1988>

Zou, X., Xiao, X., Mo, Z., Ge, Y., Jiang, X., Huang, R., Li, M., Deng, Z., Chen, S., Wang, L., & Lee, S. Y. (2022). Systematic strategies for developing phage resistant *Escherichia coli* strains. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31934-9>